

Gdański Uniwersytet Medyczny

**DIAGNOSTYKA
LABORATORYJNA**

TOM II

**pod redakcją
Andrzeja Szutowicza i Anny Raszei-Specht**

Gdańsk 2011

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Recenzent
prof. dr hab. Wiesława Łysiak-Szydłowska

© Copyright by Medical University of Gdańsk
ISBN 978-83-602537-7-9

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Zlecenie KW/282/11

SPIS TREŚCI

1. MOCZ JAKO MATERIAŁ DIAGNOSTYCZNY. BADANIA PRZYŁÓŻKOWE (<i>POINT OF CARE TESTING</i>).....	9
1.1. Badanie ogólne i złożone moczu	9
1.2. Rodzaje próbek moczu.....	9
1.3. Badanie ogólne moczu	10
1.3.1. Skład moczu i objętość moczu	11
1.3.2. Właściwości fizyczne moczu.....	11
1.3.3. Właściwości chemiczne moczu	13
1.4. Badania specjalistyczne moczu.....	15
1.4.1. Ocena funkcji filtracyjnej nerek na podstawie 24-godzinnej zbiórki moczu	16
1.5. Laboratoryjna diagnostyka stanów nagłych.....	22
1.5.1. Przyczyny zlecenia badań laboratoryjnych w trybie pilnym	23
1.5.2. Zalecenia ogólne dotyczące stosowania badań przyłóżkowych (rozproszonych)	24
1.5.3. Zespoły chorobowe wymagające obsługi laboratoryjnej w trybie pilnym.....	24
1.5.4. Dokumentacja badań POCT	26
1.6. Ćwiczenie.....	26
2. LABORATORYJNE WSKAŹNIKI ZABURZEŃ METABOLIZMU BIAŁEK	28
2.1. Podział białek osocza	28
2.2. Funkcje białek osocza	29
2.2.1. Ciśnienie onkotyczne.....	29
2.2.2. Funkcje transportowe.....	30
2.2.3. Aktywności enzymatyczne i regulatorowe	30
2.2.4. Odporność swoista i nieswoista.....	31
2.3. Podstawowe parametry metabolizmu białek osocza.....	31
2.3.1. Dystrybucja białek osocza	31
2.3.2. Synteza i degradacja	32
2.3.3. Wartości referencyjne dla białek surowicy.....	34
2.4. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń gospodarki białkowej	35
2.4.1. Hipoproteinemie – hypoalbuminemie	35
2.4.2. Ocena niedoborów białek osocza	37
2.4.3. Hiperproteinemie	37
2.4.4. Szybkość opadania krwinek czerwonych (odczyn Biernackiego; ESR, <i>erythrocyte sedimentation rate</i>)	38
2.5. Prawidłowy obraz rozdziału elektroforetycznego białek surowicy krwi	40
2.6. Indywidualne białka osocza – znaczenie diagnostyczne	43
2.6.1. Albumina	43
2.6.2. Białka ostrej fazy	46

2.6.3.	Białka związane z ostrymi uszkodzeniami narządowymi.....	55
2.7.	Inne białka indywidualne osocza	59
2.7.1.	Alfa ₂ -makroglobulina (AMG)	59
2.7.2.	Transferyna (TF)	60
2.7.3.	Transtyretyna (TTR, prealbumina)	61
2.8.	Immunoglobuliny.....	61
2.8.1.	Budowa, klasy i zmienność immunoglobulin.....	62
2.8.2.	Właściwości klas immunoglobulin.....	63
2.8.3.	Zaburzenia układu immunologicznego.....	66
2.9.	Białka moczu	75
2.9.1.	Białkomocz przednerkowy	76
2.9.2.	Białkomocz kłębkowy – albuminuria.....	77
2.9.3.	Białkomocz kanalikowy	78
2.9.4.	Białkomocz pazanerkowy.....	80
2.10.	Znaczenie diagnostyczne białek surowicy krwi.....	80
2.11.	Przypadki kliniczne.....	81
3.	LABORATORYJNE WSKAŹNIKI CHOROÓB NOWOTWOROWYCH	86
3.1.	Patomechanizmy chorób nowotworowych	86
3.1.1.	Wpływ środowiska i warunków życia	86
3.1.2.	Rola czynników genetycznych	88
3.1.3.	Mechanizmy immunologiczne.....	96
3.2.	Efekty metaboliczne i endokrynne nowotworów.....	97
3.2.1.	Hiperkalcemia.....	99
3.2.2.	Hiponatremia (zespół nieodpowiedniego wydzielania ADH) ..	100
3.2.3.	Hipokalcemia (hiperkortyzolemia).....	100
3.2.4.	Hipoglikemia i hiperglikemia	101
3.2.5.	Anemia i policytomia.....	102
3.2.6.	Serotonina.....	103
3.2.7.	Aminy biogenne	103
3.2.8.	Gastryna.....	104
3.2.9.	Kalcytonina.....	104
3.2.10.	Zespoły mnogiej gruczolakowatości endokrynnej	105
3.2.11.	Erytropoetyna	106
3.2.12.	Krew utajona w kale	106
3.3.	Markery nowotworowe.....	107
3.3.1.	Znaczenie markerów w diagnostyce i obserwacji leczenia nowotworów	107
3.3.2.	Indywidualne markery nowotworowe	112
3.4.	Podsumowanie	123
3.5.	Opis przypadków	126
4.	DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA WYBRANYCH ZABURZEŃ HEMATOLOGICZNYCH.....	131
4.1.	Niedokrwistości (<i>Anaemiae</i>).....	131
4.1.1.	Niedokrwistość z niedoboru żelaza	134

4.1.2.	Niedokrwistość makrocytowa	136
4.1.3.	Niedokrwistość hemolityczna.....	139
4.1.4.	Niedokrwistość aplastyczna.....	142
4.2.	Nadkrwistości (<i>Polycythemiae</i>)	143
4.3.	Zaburzenia układu granulocytowego	144
4.3.1.	Przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne (<i>chronic myeloproliferative neoplasms</i> , MPN).....	144
4.3.2.	Czerwienica prawdziwa (PRV)	146
4.3.3.	Białaczki ostre	148
4.4.	Nowotworowy rozrost układu limfatycznego.....	151
4.4.1.	Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (B-CLL) ...	151
4.4.2.	Szpiczak plazmocytowy (Plasmocytoma)	153
4.5.	Wybrane przypadki kliniczne	154
5.	DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ KRZEPNIĘCIA... 163	
5.1.	Błąd przedlaboratoryjny.....	163
5.2.	Wrodzone skazy krwotoczne	165
5.3.	Nabyte skazy krwotoczne	171
5.4.	Badania laboratoryjne hemostazy przed zabiegami operacyjnymi	174
5.5.	Trombofilia	177
5.6.	Monitorowanie leczenia przeciwzakrzepowego doustnymi antykoagulantami.....	182
5.7.	Monitorowanie leczenia heparyną	185
6.	DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ WODNO-ELEKTROLITOWYCH, KWASOWO-ZASADOWYCH I WAPNIOWO-FOSFORANOWYCH.....	188
6.1.	Parametry pomiarowe gospodarki wodno-elektrolitowej	188
6.2.	Albumina jako wskaźnik nawodnienia	189
6.3.	Znaczenie diagnostyczne oznaczania jonów potasu w surowicy.....	190
6.4.	Znaczenie diagnostyczne oznaczanie jonów sodu w surowicy.....	191
6.5.	Znaczenie diagnostyczne oznaczania jonów chlorkowych w surowicy	195
6.6.	Obliczenia	197
6.7.	Przypadki kliniczne.....	198
7.	DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ METABOLIZMU LIPOPROTEIN OSOCZA.....	207
7.1.	Lipidowe czynniki ryzyka w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego	207
7.2.	Zaburzenia metabolizmu lipoprotein nie ujęte w raporcie ATP III – opis przypadku nasilonej hipertriglicydemii	213
7.3.	Homozygotyczna postać rodzinnej hipercholesterolemii	218
8.	BIOCHEMICZNE MARKERY ZAWAŁU SERCA	222
8.1.	Uniwersalna definicja zawału	222
8.2.	Biomarkery w wykrywaniu dorzutu zawału	223
8.3.	Problemy analityczne pomiarów cTn	224

8.4. Omówienie przypadków	227
9. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA WYBRANYCH ZESPOŁÓW ENDOKRYNOLOGICZNYCH	230
9.1. Epidemiologia zaburzeń endokrynologicznych	230
9.2. Wybrane przypadki kliniczne	231
10. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA OSTRYCH ZATRUĆ. TERAPIA MONITOROWANA	241
10.1. Zatrucia lekami	243
10.1.1. Zatrucia lekami przeciwbólowymi i lekami przeciwzapalnymi	243
10.1.2. Zatrucia lekami działającymi na ośrodkowy układ nerwowy	247
10.1.3. Zatrucie barbituranami	249
10.2. Zatrucia alkoholami	252
10.3. Wybrane przypadki ostrych zatruc	259
10.4. Terapeutyczne monitorowanie leków (TML)	262
10.4.1. Najważniejsze wskazania do monitorowania stężenia leków	264
10.4.2. Grupy leków, których stężenia są monitorowane	264
10.4.3. Kiedy rozpoczynamy TML?	265
10.4.4. Pobieranie próbek krwi w TML	266
10.4.5. Jak wyznaczamy dawkę obciążającą leku?	266
10.4.6. Przypadki kliniczne	267
11. TRANSFUZJOLOGIA. BADANIA LABORATORYJNE W ZAPOBIEGANIU I DIAGNOSTYCE POWIKŁAŃ POPRZETOCZENIOWYCH	269
11.1. Wczesne powikłania poprzetoczeniowe	269
11.2. Późne powikłania poprzetoczeniowe	274
11.3. Powikłania związane z masywną transfuzją	276
11.4. Czynniki zakaźne przenoszone przez krew	277
11.5. Przechowywanie materiału do przetoczeń	279
11.5.1. Krwinki czerwone	279
11.5.2. Płytki krwi	280
11.5.3. Granulocyty	280
11.6. Autotransfuzja	280
11.7. Wskazania do stosowania krwi i jej składników	281
12. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA CHORÓB UWARUNKOWANYCH WRODZONYMI DEFEKTAMI GENETYCZNYMI	283
12.1. Zespół łamliwego chromosomu X	283
12.1.1. Podłoże molekularne	283
12.1.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych	285
12.1.3. Dostępne analizy molekularne	286
12.1.4. Interpretacja wyników testów molekularnych	286
12.2. Dystrofie mięśniowe Duchenne'a i Beckera	287
12.2.1. Podłoże molekularne	287

12.2.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	289
12.2.3. Dostępne analizy molekularne.....	289
12.2.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	290
12.3. Rdzeniowy zanik mięśni	290
12.3.1. Podłoże molekularne	291
12.3.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	292
12.3.3. Dostępne analizy molekularne.....	292
12.3.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	293
12.4. Mukowiscydoza (zwyrodnienie włóknisto-torbielowate).....	293
12.4.1. Podłoże molekularne	294
12.4.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	295
12.4.3. Dostępne analizy molekularne.....	297
12.4.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	297
12.5. Fenylketonuria	298
12.5.1. Podłoże molekularne	299
12.5.2. Badania przesiewowe i diagnostyka molekularna	299
12.5.3. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	301
12.6. Głuchota wrodzona	301
12.6.1. Podłoże molekularne	302
12.6.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	303
12.6.3. Dostępne analizy molekularne.....	304
12.6.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	304
12.7. Hemofilia A	305
12.7.1. Podłoże molekularne	305
12.7.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	308
12.8. Choroba von Willebranda.....	308
12.8.1. Podłoże molekularne	309
12.8.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	312
12.8.3. Dostępne analizy molekularne.....	313
12.8.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	313
12.9. Trombofilia	313
12.9.1. Podłoże molekularne	313
12.9.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	316
12.9.3. Dostępne analizy molekularne.....	317
12.9.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	317
12.10. Wrodzony rak piersi i jajnika.....	318
12.10.1. Podłoże molekularne	318
12.10.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	320
12.10.3. Dostępne analizy molekularne	323
12.10.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	323
12.11. Wrodzona polipowatość jelita grubego	324
12.11.1. Podłoże molekularne	324
12.11.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	326
12.11.3. Dostępne analizy molekularne	327

12.11.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	327
12.12. Dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego (zespół Lyncha)...	328
12.12.1. Podłoże molekularne	328
12.12.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych.....	330
12.12.3. Dostępne analizy molekularne	330
12.12.4. Interpretacja wyników testów molekularnych.....	331
12.13. Wrodzona niedoczynność tarczycy.....	332
12.13.1. Podłoże molekularne	332

1. MOCZ JAKO MATERIAŁ DIAGNOSTYCZNY. BADANIA PRZYŁÓŻKOWE (POINT OF CARE TESTING)

Hanna Bielarczyk, Anna Ronowska, Sylwia Gul-Hinc

Rozwój technologiczny w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej sprawia, że liczba testów laboratoryjnych może być wykonywana przy łóżku lub w punkcie przyjęcia pacjenta, a więc poza laboratorium medycznym.

Jednym z badań, którego technologia stała się identyczna zarówno w przypadku jej wykonania w laboratorium jak i przy łóżku pacjenta jest badanie ogólne moczu przy użyciu testów paskowych. Należy jednak podkreślić, że w tym drugim przypadku musi ona spełniać warunki dobrej praktyki laboratoryjnej wymienione w punktach 1.5.2 i 1.5.4 tego rozdziału.

1.1. Badanie ogólne i złożone moczu

Do najczęstszych przyczyn zlecenia badań laboratoryjnych moczu należą:

- kontrola stanu zdrowia pacjenta, badanie przesiewowe
- diagnostyka chorób nerek i/lub dróg moczowych
- diagnostyka wtórnych uszkodzeń nerek w przebiegu chorób układowych, metabolicznych, krążeniowych itp.
- diagnostyka chorób pozanerkowych (np. porfirie – porfiry, nadciśnienie – aminy katecholowe, choroby rdzenia nadnerczy – kwas wanilino-migdałowy, choroby kory nadnerczy – kortyzol)

Najczęściej wykonywanym badaniem laboratoryjnym moczu jest badanie ogólne, wykonywane testem paskowym. Test paskowy spełnia wszystkie kryteria testu przesiewowego w kierunku chorób nerek oraz dróg moczowych. Ważne jest, że badanie to pozwala również wykryć niektóre choroby jeszcze w okresie bezobjawowym. W związku z powyższym test ten jest często zlecany do wykonania w rutynowej praktyce lekarskiej. Badanie ogólne moczu określa fizyko-chemiczne właściwości moczu oraz identyfikuje znajdujące się w nim różnego rodzaju komórki i kryształy. Osobnym zagadnieniem jest badanie bakteriologiczne moczu, którego opis wykracza poza ramy tego rozdziału.

1.2. Rodzaje próbek moczu

W diagnostyce laboratoryjnej wykorzystuje się następujące rodzaje próbek moczu:

- pierwsza poranna próbka moczu: używana do wykonania badania ogólnego moczu,
- mocz przygodny: diagnozowanie stanów ostrej

- dobowa zbiórka moczu: ocena filtracji kłębuszkowej, ilościowego wydalania białka, hormonów, elektrolitów.

Mocz do analizy uzyskuje się w procesie:

- mikcji
- cewnikowania
- nakłucia nadłonowego

Próbki moczu należy dostarczyć do laboratorium jak najszybciej po ich pobraniu. Badanie ogólne moczu należy przeprowadzić w czasie do 2 godzin od pobrania. Mocz do badań biochemicznych jest przydatny do 10 godzin od pobrania. W przypadku, gdy opóźnienie w dostarczeniu próbki moczu do laboratorium przekracza dopuszczalny, należy ją zabezpieczyć przez schłodzenie do temperatury 4-8°C. Niska temperatura może jednak powodować wytrącanie kryształów moczanów, fosforanów lub innych związków endo i egzogennych (np. leki). Dopuszczalne jest również stosowanie środków konserwujących takich jak tymol, kwas borny, formalina. Należy jednak pamiętać, że w moczu poddanym konserwacji może dochodzić do rozmaitych zmian, szczególnie elementów upostaciowanych.

1.3. Badanie ogólne moczu

Badanie ogólne moczu najczęściej wykonuje się przy użyciu wieloparametrowych testów paskowych. Wykorzystują one metody kolorymetryczne tzw. „suchej chemii”. Dostępne są paski jednoparametrowe np. do wykrywania glukozy, białka (albumina), „mikroalbuminurii”, leków i substancji odurzających itp. Najczęściej stosowane paski 10-parametrowe, które wykrywają jednocześnie glukozę, związki ketonowe, albuminę, leukocyty, azotyny, erytrocyty/hemoglobinę, bilirubinę, urobilinogen, pH i ciężar właściwy moczu. Używa się ich rutynowo w przesiewowym badaniu moczu. Pasek do badania jest wykonany z tworzywa sztucznego, na którym umieszczone są higroskopijne pola testowe nasączone odpowiednimi odczynnikami (ryc. 1.1). Po zanurzeniu i wyjęciu paska z moczu, na poszczególnych polach zachodzą reakcje chemiczne ze składnikami zawartymi w moczu. Odczyt następuje poprzez ocenę zmiany zabarwienia pola w porównaniu ze skalami barwnymi, po upływie czasu rekomendowanego przez producenta pasków. Oceny zabarwienia można dokonać wzrokowo, lub za pomocą automatycznego czytnika pasków. Odczyty dają wynik półilościowy z wyjątkiem ciężaru właściwego (dokładność 0,005 g/mL) i pH (dokładność 0,5 jednostki) (ryc. 1.1).



Ryc. 1.1. Pasek testowy i porównawcza skale barwne do odczytu przybliżonych stężeń różnych analitów w moczu

1.3.1. Skład moczu i objętość moczu

Objętość moczu zależy przede wszystkim od diety pacjenta oraz objętości wypijanych przez niego płynów, jego aktywności fizycznej oraz stanu zdrowia. Przeciętnie zdrowy człowiek, w zależności od podaży płynów, wydała od 600-2500 mL moczu/dobę. Głównymi składnikami suchej masy moczu są mocznik oraz NaCl. Ponadto w skład suchej masy moczu wchodzi również: potas, sole amonowe, fosforany, siarczany, kreatynina, glukoza, albumina/białka, hormony, jak również różne spożywane ksenobiotyki.

1.3.2. Właściwości fizyczne moczu

- Barwa: prawidłowa barwa moczu- od słomkowej do żółtej. Zabarwienie moczu jest wypadkową zagęszczenia, obecności barwników endogennych takich jak urochrom, urobilina, uroerytyna, a także produktów przemian metabolicznych, przyjmowanych leków oraz innych związków pochodzenia egzogenne. Wpływ niektórych związków na barwę moczu przedstawia tabela 1.1.
- Przezroczystość: przezroczystość wraz z barwą opisuje wygląd ogólny próbki moczu. Przezroczystość, często nazywana zmętnieniem, opisuje stopień zmętnienia moczu spowodowanego cząstkami zawieszonymi w roztworze, które rozpraszają światło. Tabela 1.2 zawiera zdefiniowane pojęcia dotyczące przezroczystości moczu oraz wykaz substancji, które powodują zmianę przezroczystości próbki moczu.

Tabela 1.1. Związki wpływające na zabarwienie moczu

Barwa moczu	Przyczyna
Żółta	Wit. B ₂
Żółtozielona	Bilirubina/biliwerdyna, wit. B ₂ , tymol
Żółtopomarańczowa	Bilirubina, urobilina, rabarbar, leki (np. salozopiryny, fenacytyny)
Żółtobrazowa	Bilirubina/biliwerdyna, leki (np. nitrofurantoiny)
Niebieskozielona	biliwerdyna, <i>Pseudomonas</i> , leki (np. arbutyn, błękit metylenowy, triamteren, kreozał, guajakol)
Czerwona; brązowa	Hemoglobina wolna, erytrocyty mioglobina, urobilina, porfiryne, rabarbar, karoteny, buraki, pochodne aniliny. Leki: np. aminofenazon, aminopiryne, antypiryne, chinina, chlorochinon, hydrochinon, L-dopa, naftol, fenytoina, metronidazol, azotany, nitrofurantoina, fenacetyne, fenoloftaleina, fenotiazyna, salazopiryne,
Czerwono różowa	moczany
Brązowo czarna	methemoglobina, kwas homogentyzynowy, melanina

Tabela 1.2. Określenia związane z przejrzystością moczu

Przejrzystość	Definicja	Przykłady
Klarowny	Brak widocznych cząsteczek zawieszonego osadu	Prawidłowy mocz, składniki obecne w moczu są rozpuszczalne
Lekko mętny	Widoczne cząsteczki zawieszone w próbce; druk gazetowy jest widoczny i czytelny przez próbkę lub druk gazetowy jest widoczny, ale nieczytelny przez próbkę lub zamazany	Przyczyną zmętnienia moczu mogą być elementy morfotyczne (np. leukocyty, erytrocyty, bakterie, drożdże, ropa), składniki mineralne (kryształy fosforanowe, moczanowe) i organiczne (śluz, kuleczki tłuszczu), kontrast radiologiczny oraz domieszka chłonki lub stolca.
Mętny	Druk gazetowy nie jest widoczny przez próbkę	

- Zapach: świeżo oddany mocz ma swoisty zapach, który może się zmieniać w rozmaitych stanach chorobowych

Zmianę woni moczu mogą wywołać:

- procesy bakteryjne toczące się w drogach moczowych – zapach gnilny, amoniakalny
 - związki ketonowe – zapach owocowy,
 - choroby genetycznie uwarunkowane
 - choroba syropu klonowego – zapach syropu klonowego/karmelu,
 - fenylketonuria – zapach mysi,
 - kwasica izowalerianowa i kwasica glutarowa – zapach spoconych stóp,
 - hipermetioninemia – zapach kapusty,
 - trimetyloaminemia – zapach zepsutej ryby,
 - tyrozynemia – zapach zjełzłego masła
- Zagęszczenie/osmolalność: najczęściej wyrażane jest pośrednio za pomocą ciężaru właściwego lub rzadko przez bezpośredni pomiar osmolarności. Zależność pomiędzy tymi dwoma parametrami została szczegółowo opisana w rozdziale: Gospodarka wodno-elektrolitowa (t. I., rozdz. 6).

Określenie ciężaru właściwego polega na jego bezpośrednim pomiarze urometrem (metoda referencyjna, dokładność 0,001 g/mL), lub dużo mniej dokładnym pomiarze kolorymetrycznym metodą „suchej chemii” (dokładność 0,005 g/mL, ryc. 1.1). Na osmolalność oraz ciężar właściwy prawidłowego moczu mają wpływ związki występujące w nim w wysokich stężeniach, a więc mocznik, sól i towarzyszące aniony oraz kreatynina. Na ciężar właściwy mogą również wpływać składniki nieprawidłowe, takie jak: glukoza, białka, środki cieniujące i inne ksenobiotyki oraz związki konserwujące. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w przypadku obecności glukozy i białka w moczu stosowanie metod bezpośrednich pomiaru ciężaru właściwego wymaga dodatkowego oznaczenia w celu odpowiedniej korekty wyniku badania.

1.3.3. Właściwości chemiczne moczu

- Białko: w warunkach prawidłowych wydalane jest w ilości do 150 mg/24 godz. Obecność zwiększonej ilości białka w moczu jest pierwszym wskaźnikiem schorzenia nerek. Rodzaje białek moczu są szczegółowo opisane w rozdziale 2, tom II. Test paskowy wykrywa niemal wyłącznie albuminę w stężeniach wyższych od 200 mg/L. Wykrywanie niższych stężeń albuminy (termin techniczny – mikroalbuminuria) oraz innych białek wymaga stosowania czulszych i bardziej specyficznych metod (patrz rozdz. 2, tom II).
- Glukoza: w warunkach fizjologicznych filtrowana do ultraprzesącza glukoza jest w całości wchłaniana zwrotnie w bliższej części kanalików nerkowych za pomocą sprzężonego z sodem czynnego wchłaniania zwrotnego. Szybkość maksymalna transportu zwrotnego wynosi średnio 350 mg/min, gdy stężenie glukozy w osoczu, a tym samym i w filtracie kłębowym przekroczy wartość

180 mg/dL (próg nerkowy), w wydalonym moczu pojawia się glukoza. Glukozuria może być spowodowana zmianami przednerkowymi (cukrzyce/hiperqlikemia, choroby wątroby, zaburzenia hormonalne) lub nabytymi i wrodzonymi uszkodzeniami kanalików bliższych obniżającymi próg nerkowy dla glukozy oraz dla innych związków (wrodzone i nabyte zespoły Fanconi – glukozuria z ketoamino acidurią. Związki „ketonowe”: to β -hydroksymaślan, acetoctan i aceton. Ketonuria występuje, gdy tkanki pozbawione dopływu glukozy zaczynają zużywać kwasy tłuszczowe do pokrycia swych potrzeb energetycznych. Przyczynami ketonemii i ketonurii mogą być: cukrzyca, dieta o wysokiej zawartości tłuszczów, głodzenie, wysiłek fizyczny i wychłodzenie, zespół Fanconi, oraz choroby genetycznie uwarunkowane. Należy pamiętać, że test paskowy nie wykrywa wszystkich trzech związków ketonowych. Test paskowy wykrywa jedynie acetoctan.

- Bilirubina i urobilinogen: głównym źródłem bilirubiny jest pierścień hemowy uwalniany z hemoglobiny w układzie siateczkowo-śródbłonkowym śledziony ze starych hemolizowanych tam erytrocytów. Uwalniany hem ulega przemianie do bilirubiny. Jest ona nierozpuszczalna w wodzie i ulega odwracalnemu wiązaniu z albuminą. Połączenie to zwiększa rozpuszczalność w wodzie, ale uniemożliwia przechodzenie przez barierę błony podstawnej kłębków nerkowych.

Do moczu jest natomiast wydalana, rozpuszczalna w wodzie bilirubina, sprzężona w wątrobie z kwasem glukuronowym. W warunkach fizjologicznych glukuronian bilirubiny jest wydalany do przewodu żółciowego skąd trafia do jelita cienkiego. W jelicie cienkim bilirubina zostaje zredukowana przez bakterie do urobilinogenu. Urobilinogen ulega wchłanianiu zwrotnemu, po czym zostaje ponownie wydalony przez wątrobę z żółcią. Obecność bilirubiny w moczu stwierdza się chorobach wątroby, niedrożności dróg żółciowych oraz cholestazie wewnątrzwątrobowej.

- pH: W warunkach fizjologicznych pH moczu wynosi 4,5-8,0. Mocz osób zdrowych najczęściej jest słabo kwaśny (pH ok. 6,5). Takie pH odzwierciedla zwykle sytuację, w której 1/3 nietlotnych jonów wodorowych jest wydalane z moczem w postaci kwasności miareczkowej a 2/3 jako jon amonowy (tom 1, rozdz. 6) . Odczyn moczu jest wypadkową stosowanej diety oraz procesów metabolicznych jakie zachodzą w nerkach, wątrobie i płucach. Dieta bogatobiałkowa powoduje zakwaszenie moczu, natomiast dieta wegetariańska sprzyja alkalizacji moczu. Nerki odgrywają główną rolę w regulacji i homeostazie kwasowo-zasadowej organizmu. Dlatego, pH moczu spada w kwasicach metabolicznych poza nerkowych, kwasicach oddechowych, przy stosowaniu leków zakwaszających, gorączce, a także w zasadowicy metabolicznej wywołanej hiperaldosteronizmem. Obojętny lub zasadowy odczyn moczu obserwuje się w stanach: zasadowicy metabolicznej, zasadowicy oddechowej, chorobach nerek (zakazenie dróg moczowych – bakterie zawierające ureazę, rozkładające mocznik do amoniaku) kwasica kanalikowa dystalna, nadczynność przytarczyc. Krew: w

badaniu przesiewowym testem paskowym, nie można odróżnić hematurii od mioglobinurii i hemoglobinurii. Stan ten może być spowodowany przez różne choroby nerek lub dróg żółciowych (kłębkowe zapalenie nerek, odmiedniczkowe zapalenie nerek, zapalenie pęcherza, kamica, nowotwory), choroby pozanerkowe (nadciśnienie tętnicze, nowotwory), uraz, intensywny wysiłek fizyczny. Hemoglobinuria może być wywołana masywną hemolizą wewnątrznaczyniową, spowodowaną rozległymi oparzeniami, zakażeniami, konfliktem maczyno-łożyskowym, zespołami autohemolitycznymi, gdy ilość uwalnianej hemoglobiny przekracza pojemność wiązania haptoglobiny (tom II, rozdz. 2). Należy również wykluczyć zanieczyszczenie krwią miesiączkową.

Mioglobinuria pojawia się po uszkodzeniu mięśni szkieletowych przez intensywny wysiłek fizyczny, zakażenia, toksyny zwierzęce (jady żmij, owadów), zespoły zmiążdżenia, zapalenie wielomięśniowe, niektóre choroby genetycznie uwarunkowane.

- Leukocyty: zwiększona liczba leukocytów w moczu wskazuje na występowanie stanu zapalnego dróg moczowych. Zwiększenie liczby leukocytów często towarzyszy bakteriurii. W warunkach fizjologicznych prawidłowa liczba leukocytów wynosi 0-5 w polu widzenia. Testy paskowe wykrywają obecność esterazy leukocytowej, enzymu zlokalizowanego w granulocytach obojętnochłonnych i monocytach. Testem tym nie można natomiast wykryć limfocyturii. Podwyższona liczba leukocytów w moczu może czasem pochodzić z zanieczyszczenia moczu wydzieliną z pochwy, stanami zapalnymi w okolicy cewki moczowej, lub przyjmowaniem leków, które mogą dodatkowo interferować z testem (substancje, które w pH kwaśnym zabarwiają mocz na czerwono: fenazopirydyna, nitrofurantoina).
- Azotyny: dodatni wynik testu wskazuje na bakteryjne zakażenie układu moczowego bakteriami Gram-ujemnymi należącymi do fizjologicznej flory układu pokarmowego z grupy *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.* i *Staphylococcus spp.* Bakterie te posiadają enzym-reduktazę azotynową, która redukuje azotany pokarmowe do azotynów.

1.4. Badania specjalistyczne moczu

Zakres i rodzaj badania specjalistycznego moczu jest ustalany indywidualnie u każdego pacjenta. Badanie specjalistyczne może ograniczać się jedynie do wykrycia obecności danej substancji w moczu (badanie jakościowe) lub też może polegać na określeniu jej stężenia lub dobowego wydalania z moczem (badanie ilościowe). Do drugiego typu badań na ogół wymagane jest dostarczenie do laboratorium próbki moczu zebranego w ściśle określonym przedziale czasu (najczęściej w czasie 24 godzin).

Do badań specjalistycznych moczu należą:

- określenie wydalania dobowego elektrolitów: np. sodu, potasu, wapnia, magnezu, fosforanów;
- określenie wydalania dobowego końcowych produktów przemiany materii (tzw. związków azotu): mocznika, amoniaku, jonu amonowego, kreatyniny, kwasu moczowego;
- określenie wielkości filtracji kłębkowej, parametr ten zwykle ustala się w oparciu o pomiar tzw. klirensu endogennej kreatyniny (współczynnik oczyszczania osocza = liczba mililitrów osocza oczyszczonego z danego związku w ciągu 1 minuty i wyrażony jest w mL/min)
- pomiar stężenia albuminy/ wydalania dobowego w moczu (przy stężeniach albuminy poniżej progu czułości testu paskowego w zakresie od 30-300 mg/dobę, oznaczenie to nosi nazwę „mikroalbuminuria”);
- pomiar wydalania różnych białek specyficznych moczu (beta₂-mikroglobulina, łańcuchy lekkie immunoglobulin, mioglobina, amylaza, lipokalina, glukozaminidaza)
- określenie wydalania hormonów lub ich metabolitów np.: hormonów kory lub rdzenia nadnerczy (kortyzol, adrenalina), hormonu wzrostu (GH), gonadotropiny kosmówkowej (beta-HCG), hormonu luteinizującego (LH), kwasu 5-hydrokso-indoloocetowego, kwasu wanilino-migdałowego;
- pomiar wydalanych leków, jak np. litu, barbituranów, salicylanów, sulfonamidów;
- wykrycie obecności środków narkotycznych, jak np. amfetaminy, kokainy, morfiny; sterydów anabolicznych
- wykrycie obecności toksyn muchomorów sromotnikowego (amanityny, falloidyny);
- ocena wydalania toksycznych związków organicznych, np. fenolu oraz metali ciężkich, np. ołowiu, rtęci;
- ocena wydalania związków powstałych w wyniku wrodzonych zaburzeń metabolicznych, np. fenylopirogronianu;

Znaczenie diagnostyczne i prognostyczne wymienionych parametrów pomiarowych moczu i ich rola w obserwacji przebiegu leczenia, zostało omówione w odpowiednich rozdziałach skryptu.

1.4.1. Ocena funkcji filtracyjnej nerek na podstawie 24-godzinnej zbiórki moczu

Prawidłowo wykonana zbiórka dobowa moczu jest podstawowym warunkiem uzyskania wiarygodnego wyniku oznaczania wydalania wszystkich wyżej wymienionych związków oraz badań klirensowych.

Wbrew powszechnie panującej opinii, procedura ta jest trudna do samodzielnego wykonania przez pacjenta w warunkach ambulatoryjnych. Jednak, z uwagi na dobowe zmiany wydalania wielu substancji czy też zmiany ich funkcji ustrojowych, wykonanie takiej zbiórki może być koniecznością.

Badanie to jest szczególnie przydatne przy określaniu szybkości przesączania kłębuszkowego, a także oznaczaniu stężenia hormonów i białek w moczu. Zazwyczaj zleca się wykonanie 12 lub 24-godzinnej zbiórki moczu. Prawidłowe wykonanie okresowej zbiórki moczu jest kluczowe dla uzyskania miarodajnych wyników. W tym celu pacjent powinien otrzymać pisemną instrukcję dotyczącą zasad przeprowadzenia okresowej zbiórki moczu (tabela 1.3).

Tabela 1.3. Procedura dobowej zbiórki moczu

SCHEMAT WYKONYWANIA DOBOWEJ PRÓBKİ MOCZU
Zbiórkę należy rozpocząć o ustalonej godzinie (najlepiej rano) od opróżnienia pęcherza poprzez oddanie moczu do muszli klozetowej (z uwagi na to, że jest to mocz, który powstał przed okresem trwania zbiórki dobowej)
Wszystkie kolejne porcje pacjent zbiera do przeznaczzonego na ten cel pojemnika. Jeżeli z jakiegó przyczyny choćby jedna porcja moczu oddana w czasie dokonywanej zbiórki, nie została przeniesiona do pojemnika przeznaczzonego do zbierania moczu, badanie nie będzie dokładne i powinno być powtórzone innego dnia
Pojemnik w czasie przeprowadzanej zbiórki powinien znajdować się w chłodnym i zacienionym pomieszczeniu.
Po 24 godzinach od rozpoczęcia zbiórki, pacjent raz jeszcze opróżnia pęcherz, oddając tą porcję również do pojemnika.

1.4.1.1. Oznaczanie szybkości przesączania kłębuszkowego - klirens kreatyniny endogennej

Dobowa zbiórka moczu jest badaniem szczególnie przydatnym do oceny szybkości przesączania kłębuszkowego. Jego miarą jest tzw. klirens nerkowy (współczynnik oczyszczania osocza). Do obliczenia tego parametru należy zmierzyć stężenie odpowiedniego analitu w surowicy. Musi to być związek, który całkowicie filtruje się w kłębkach nerkowych oraz nie jest wchłaniany zwrotnie w kanalikach nerkowych. Kryteria takie spełnia kreatynina.

Procedura oznaczania klirensu endogennej kreatyniny:

- pobrać krew i oznaczyć stężenie kreatyniny objętość surowicy
- zmierzyć objętość dobową zebranego moczu i pobrać próbkę na oznaczanie kreatyniny
- zmierzyć stężenie kreatyniny w zebranej próbce moczu
- obliczyć klirens nerkowy kreatyniny endogennej ze wzoru:

$$\text{klirens} = \frac{U \cdot V}{S} \text{ (mL / min)} \quad [1]$$

gdzie:

U – stężenie danej substancji w moczu (mg/dL)

S – stężenie danej substancji w surowicy (mg/dL)

V – objętość moczu wydalonego w ciągu 1 minuty, obliczona z całkowitej objętości moczu zebranego w ciągu 24 godzin (mL/min).

Oznaczenie klirensu nerkowego wymaga zastosowania substancji nieulegającej ani reabsorpcji, ani wydzielaniu w kanalikach nerkowych. Wówczas klirens takiej substancji jest równy współczynnikowi filtracji kłębkowej GFR (ang. *glomerular filtration rate*). Warunki takie spełniają związki egzogenne takie jak, inulina. Metoda ta stwarza jednak pewne problemy, ponieważ inulina musi być podawana pacjentowi dożylnie przez cały czas trwania zbiórki, a ponadto może powodować skutki uboczne. Dlatego endogenną substancją z wyboru, stosowaną do oceny filtracji kłębkowej jest kreatynina. Kreatynina jest syntetyzowana ze stałą szybkością głównie w mięśniach. Jej stężenie w osoczu, w okresie wykonywania badania, pozostaje na względnie stałym poziomie, a zmiany jej poziomu wywołane przez zmiany diety nie przekraczają 10%. Kreatynina znajduje się we wszystkich płynach ustrojowych, podlega filtracji kłębkach, i nie podlega resorpcji zwrotnej. Około 7-10% kreatyniny ulega sekrecji do światła kanalików (wartość klirensu wyższa 1,1-1,2 razy od klirensu inuliny). Udział sekrecji rośnie ze wzrostem stężenia kreatyniny w osoczu, (przy wysokich stężeniach w surowicy wartość klirensu kreatyniny może być > 2 razy wyższa od klirensu inuliny). W celu skorygowania różnicy pomiędzy klirensem kreatyniny i inuliny podaje się cymetydynę, która hamuje sekrecję kreatyniny poniżej 7%. Szybkość produkcji kreatyniny spada ze wzrostem jej stężenia w osoczu (konwersja do kreatyny i innych metabolitów, zahamowanie przemiany z kreatyny). Należy jednak pamiętać, że stężenie kreatyniny w osoczu rośnie z wiekiem oraz, że czynniki inne niż GFR wpływają na stężenie kreatyniny w surowicy: wiek, płeć, rasa, masa ciała, dieta, leki. Ponadto poziom kreatyniny zależy bezpośrednio od masy mięśniowej pacjenta.

1.4.1.2. Pośrednie metody oceny klirensu kreatyniny endogennej

Opisane wyżej metody oznaczania klirensu są dokładne jednak pod warunkiem poprawnego przeprowadzenia zbiórki dobowej moczu. Wbrew pozorom nie jest to czynność łatwa. Dlatego w codziennej praktyce stosuje się algorytmy wykorzystujące fakt, że stężenie kreatyniny w osoczu pozostaje w odwrotnej, chociaż nie w prostoliniowej zależności od jej wydalania z moczem (ryc. 1.2). W zależności od ustaleń lokalnych gremiów naukowych i decyzji lekarzy w poszczególnych jednostkach służby zdrowia stosuje się przynajmniej 5 algorytmów w kilku odmianach dostosowujących je wymienionych niżej zmiennych. Uwzględniają one oprócz stężenia kreatyniny w surowicy i moczu również inne parametry takie jak, wiek, waga, wzrost, płeć i rasa pacjenta. Wyniki są normalizowane do standardowej powierzchni ciała $1,73 \text{ m}^2$.

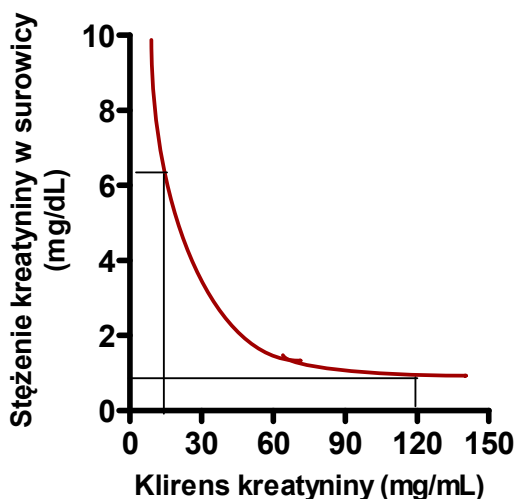
$$Klirens_{skoryg} = \frac{1,73 \cdot klirens_{akt.}}{Powierzchnia\ ciala} \quad [ml/min \cdot 1,73m^2] \quad [2]$$

Dość powszechnie oblicza się klirens metodą pośrednią (*estimated clearance*) za pomocą algorytmu Crockcroft-Gault, który uwzględnia stężenie kreatyniny w surowicy, wiek, masę ciała oraz płeć pacjenta.

$$eKlirens = \frac{(140 - \text{wiek}) \cdot \text{masa\ ciala}}{72 \cdot \text{kreatynina}_{surow.}} \quad [ml/min] \quad [3]$$

Gdzie:

- masa ciała wyrażona w kg
- stężenie kreatyniny wyrażone w mg/dL
- wiek wyrażony w latach
- w przypadku kobiet wynik należy pomnożyć przez 0,85



Ryc. 1.2. Zależność między poziomem kreatyniny w surowicy a jej endogennym klirensem

Innym algorytmem jest algorytm zalecany przez MDRD (Modification of Diet in Renal Disease Study Group), który uwzględnia 4 parametry: stężenie kreatyniny w surowicy, wiek, płeć i rasę pacjenta. Oryginalny algorytm MDRD 6-parametrowy uwzględnia jeszcze stężenia mocznika i albuminy w surowicy i odpowiada filtracji kłębuszkowej.

$$eGFR = 175 \times [Kreatynina_{surow.}]^{-1.154} \cdot wiek^{-0.203} \quad [mL/min/1.73 m^2] \quad [4]$$

Uzyskany wynik należy pomnożyć przez:

- 0,742 w przypadku kobiet
- 1,000 w przypadku mężczyzn
- 1,212 w przypadku Afroamerykanów

Ponieważ wzór ten nie uwzględnia masy ciała, uzyskany wynik można znormalizować do powierzchni 1,73 m² mnożąc go przez współczynnik korekcyjny powierzchni ciała wyliczony z równania [2] lub też tylko z masy ciała.

Tabela 1.3. Zastosowanie klirensu endogennej kreatyniny w ustalaniu stadium zaawansowania przewlekłej niedomogi nerek

Stadium	Opis	eGFR (mL/min/1,73 m ²)	Postępowanie
0	Osoby zwiększonego ryzyka	≥60 (przy czynnikach ryzyka, przewlekłej niedomodze nerek)	Badanie przesiewowe i zmniejszenie ryzyka
1	Uszkodzenie nerek normalnym lub podwyższonym GFR	≥ 90	Diagnostyka i leczenie Leczenie współistniejących patologii. Zwolnienie progresji zmian. Redukcja ryzyka chorób sercowo-naczyniowych
2	Uszkodzenie nerek z nieznacznie obniżonym GFR	60-89	Określenie progresji
3	Średnie obniżenie GFR	30-59	Ocena i leczenie powikłań
4	Ciężkie obniżenie GFR	15-29	Przygotowanie do transplantacji nerek
5	Niedomoga nerek	<15 lub dializoterapia	Transplantacja (w przypadku mocznicy)

Należy pamiętać, że algorytmy te zaniżają wartości filtracji >60 mL/min. Nie wykrywają, więc stanów nieznacznego upośledzenia filtracji kłębowej istotnych z punktu widzenia prewencji lub/i wczesnego leczenia. Większość analizatorów, które automatycznie obliczają GFR, podaje wówczas wynik >60 mL/min. Natomiast przy wartościach poniżej 60 mL/min algorytm daje wyniki bliskie rzeczywistości.

Klirens kreatyniny można również oszacować w przybliżeniu, jako procent wartości prawidłowej ustalonej dla jej stężenia w surowicy = 1 mg/dL.

$$eKlirens (\%) = \frac{I \text{ (mg/dL)} \cdot 100\%}{Kreatynina_{sur.} \text{ (mg/dL)}} \quad [5]$$

Np. przy stężeniu kreatyniny w surowicy 2 mg/dL klirens wynosi 50% wartości prawidłowej

Wartości klirensu endogennej kreatyniny stanowią istotny element w ustalaniu stopnia ciężkości przewlekłej niedomogi nerek (tabela 1.3). Należy przy tym zaznaczyć, że przyjęte poziomy odcięcia są arbitralne, lecz pomagają w zastosowaniu leczenia odpowiedniego do stanu zaawansowania niedomogi nerek.

1.4.1.3. jGFR – glomerular filtration rate (przyczyny spadku szybkości filtracji kłębuszkowej wg National Kidney Foundation. *Am. J. Kidney Dis.*39:S1-s266, 2002, supl. 1)

Zmiany chorobowe powodujące:

- obniżenie ciśnienia filtracyjnego (przednerkowe niedomogi nerek),
- uszkodzenie lub zniszczenie kłębków nerkowych (przyczyny wewnątrz-nerkowe),
- utrudniające odpływ moczu (zmiany pozanerkowe),

zmniejszają wielkość przepływu krwi przez kłębki nerkowe upośledzając zdolność nerek do usuwania kreatyniny i innych produktów przemiany materii z krwi. Poziom w surowicy kreatyniny wtedy wzrasta. I tak, spadek klirensu kreatyniny może wystąpić w przypadku zmniejszenia dopływu krwi do nerek w zastoinowej niewydolności serca, niedrożności naczyń w obrębie nerki, jak i w zakrzepicy tętnic czy też żył nerkowych, w ostrej lub przewlekłej niewydolności nerek. Natomiast podwyższony klirens kreatyniny może występować u kobiet w ciąży, osób spożywających dużo mięsa, po intensywnym wysiłku fizycznym, w początkowych stadiach cukrzycy i w nadciśnieniu tętniczym.

1.4.1.4. Określenie ilości wydalanych osmolitów

Pośrednią miarą osmolalności moczu jest jego ciężar właściwy (tom 1, rozdz. 6). Złotym standardem jest bezpośredni pomiar za pomocą osmometru. Okresowa zbiórka moczu pozwala również na obliczenie wydalania z moczem głównych osmolitów, takich jak mocznik, jony sodowy i potasowy, kreatynina a tym samym na ocenę zdolności zagęszczania moczu. Jednoczesny pomiar tych parametrów w surowicy umożliwia obliczenie maksymalnego transportu zwrotnego danego związku w kanalikach.

Ogólną zasadą postępowania przy ocenie wydalania z moczem określonej substancji jest:

- przeprowadzenie dobowej zbiórki moczu

- określenie diurezy (V w L/24godz.)
- pomiar stężenia badanej substancji w moczu (U_x ; mmol/24 godz.)

Całkowite wydalanie określonej substancji (np. sodu) z moczem oblicza się według następującego wzoru:

$$U_{Na} \cdot V_{mocz} \quad [\text{mmol}/24\text{godz.}] \quad [6]$$

gdzie:

U_{Na} – stężenie jonów sodu w moczu w mmol/L

V_{mocz} – objętość dobową moczu w litrach

1.4.1.5. Ocena zdolności nerek do zagęszczania moczu.

Dokonyje się jej poprzez ocenę diurezy (objętości wydalonego moczu w ciągu 12 godz. (L/12 godz. lub L/min), ciężaru właściwego moczu (g/L) oraz osmolalności moczu (U_{osm}). Osmolalność moczu wylicza się wiedząc, że zmiana ciężaru właściwego moczu o 1 g/L odpowiada zmianie osmolalności o 40 mosmol/L. W tym celu dwie ostatnie znaczące cyfry z ciężaru właściwego mnoży się przez 40.

Np. ciężar właściwy moczu (c.w.) jest równy 1020 g/mL to osmolalność jest równa wówczas:

$$U_{osm} = 20 \times 40 = 800 \text{ mosmol/L}$$

Algorytm nie ma zastosowań w przypadku proteinurii.

Aby wyliczyć, ile razy przesącz kłębuszkowy uległ zagęszczeniu w kanalikach nerkowych należy osmolalność moczu (U_{osm}) podzielić przez osmolalność osocza (P_{osm}):

$$\text{Współczynnik zagęszczania moczu} = U_{osm}/P_{osm} \quad [5]$$

1.4.1.6. Obliczenie transportu maksymalnego (T_m):

Parametr ten określa maksymalną wydolność kanalikowego wchłaniania zwrotnego. Odpowiada ona ilości substancji znajdującej w moczu pierwotnym (filtracie kłębowym), jaka ulega wchłanianiu zwrotnemu w ciągu minuty (wyrażana w mg lub mmol/min). Transport kanalikowy maksymalny oblicz się z różnicy między ilością związku filtrowanego w kłębkach w ciągu minuty, a ilością tego związku wydalanego z moczem. Stężenie badanego związku w osoczu musi przy tym być równe lub wyższe od jego progu nerkowego.

1.5. Laboratoryjna diagnostyka stanów nagłych

Współczesne procedury medyczne wymagają bardzo często oceny parametrów laboratoryjnych w czasie rzeczywistym, w celu natychmiastowego podjęcia działań odpowiednich do stanu pacjenta, szczególnie w stanach nagłych. Procedurę tę określa się mianem *Point Of Care Testing* (POCT), czyli badania przy pacjencie lub badania w miejscu opieki nad pacjentem. Badania w trybie POCT stanowią ważny dział współczesnej analityki medycznej i medycyny klinicznej. Specyfika badań przyłóżkowych jest odmienna od badań wykonywanych w laboratorium. Materiałem do badań z reguły jest świeża, pełna krew lub mocz, a pomiaru dokonuje się natychmiast po pobraniu materiału.

Zaletą POCT jest maksymalne skrócenie czasu oczekiwania na wynik, zwykle do 2-10 min. Równie istotne jest zmniejszenie objętości krwi koniecznej do wykonania badania. Ma to znaczenie w doraźnej diagnostyce w izbie przyjęć, w gabinecie lekarskim lub na zapleczu sali operacyjnej lub na oddziale intensywnej opieki medycznej. Potencjalnie testy POCT mogą zmniejszać koszty diagnostyki laboratoryjnej poprzez ograniczenie profilu zlecanych badań. Zmniejszenie objętości krwi potrzebnej do wykonania badań może mieć znaczenie w przypadku chorych z utratą krwi. Podkreśla się również, że wykonanie badania w czasie bieżącej opieki lekarza nad pacjentem ułatwia organizację pracy i zwiększa satysfakcję zarówno lekarza, jak i samego chorego.

1.5.1. Przyczyny zlecenia badań laboratoryjnych w trybie pilnym

Najczęściej badania przyłóżkowe wykonywane są w celu:

- ustalenia rozpoznania w przypadkach nagłych zachorowań
- oceny ciężkości choroby
- oceny najbliższego rokowania
- wdrożenia i wyboru odpowiedniego leczenia
- monitorowania efektów wdrożonego leczenia

Należy jednak podkreślić, że nadużywanie szybkich testów przyłóżkowych lub niewłaściwe ich stosowanie niesie ryzyko błędu diagnostycznego leczniczego i w efekcie zwiększa koszty opieki medycznej. Dlatego też opracowano kryteria dotyczące posługiwania się testami przyłóżkowymi w podstawowej opiece medycznej (tabela 1.2).

1.5.2. *Zalecenia ogólne dotyczące stosowania badań przyłóżkowych (rozproszonych)*

Tabela 1.4. Zalecenia Towarzystwa Patologów Amerykańskich (CAP) dotyczące badań rozproszonych (POCT)

Lp.	Zalecenia dotyczące diagnostyki przy łóżku pacjenta
1	Istnienie medycznej potrzeby
2	Jakość analogiczna jak w laboratorium rutynowym
3	Technologia dostosowana do niefachowego personelu
4	Aparatura spełnia kryteria dopuszczalności
5	Okresowe szkolenia personelu obsługującego aparaty, dzięki którym, personel kliniczny ma umiejętność prowadzenia kontroli jakości i prowadzenia dokumentacji badań oraz utrzymania aparatury.
6	Utrzymanie aparatu i testów należy do przeszkolonego personelu wykonawczego oddziału. Kontrola zewnętrzna, wykrywanie i usuwanie usterek należy do pracowników fachowych laboratorium rutynowego
7	Centralne Laboratorium komunikuje wyniki kontroli ordynatorowi/dyrektorowi – kwalifikuje do dalszego używania lub wycofania.

Nieprzestrzeganie w/w zasad może stwarzać zagrożenie dla życia i zdrowia pacjenta. Takie same zasady obowiązują przy użyciu urządzeń i materiałów POCT w gabinetach lekarskich i przychodniach.

1.5.3. *Zespoły chorobowe wymagające obsługi laboratoryjnej w trybie pilnym*

- Choroby układu sercowo-naczyniowego (zawał/niedotlenienie mięśnia sercowego, mózgu, hipo i hiperwolemie, krwawienia)
- Urazy
- Zespoły niewydolności oddechowej
- Ostra niedomoga nerek
- Encefalopatia wątrobowa
- Przełomy hormonalne – zaburzenia metaboliczne (cukrzyca, tyreotoksykoza, SIADH- zespół nieadekwatnego wydzielania wazopresyny, hipoadosteronizm, moczówka)
- Ostre stany zapalne (zapalenie otrzewnej, trzustki)
- Zakażenia (sepsa)
- Patologie ciąży i porodu (rzucawka, koagulopatie)
- Zatrucia / przedawkowanie leków.
- Pacjenci nieprzytomni

Dużą zaletą systemu przyłóżkowego jest uzyskiwanie wyniku w czasie rzeczywistym, co znacznie zmniejsza możliwość popełnienia błędu przedlaboratoryjnego wynikającego z długiego czasu przechowywania i transportu próbki przed wykonaniem testu.

Badania POCT można z punktu widzenia ich zastosowania podzielić na różne grupy.

Pierwsza, to badania tzw. parametrów krytycznych wykonywanych dla chorych w stanie zagrożenia życia. Do grupy tej należą pomiary: parametrów gospodarki kwasowo-zasadowej, wodno-elektrolitowej, stężenia mleczanu, glukozy, hematokrytu/hemoglobiny, narkotyków i innych ksenobiotyków, troponiny T/I, prokalcytoniny a nawet TSH, D-dimerów, czy też czasu protrombinowego (PT), wyrażonego jako INR.

Druga grupa to badania monitorujące stan pacjenta wykonywane przez personel medyczny na oddziałach szpitalnych lub/i w ambulatorium. W tej grupie znajdują badania stężenia glukozy we krwi, a także rzadziej do tej pory wykonywane w warunkach ambulatoryjnych pomiary stężenia kreatyniny, mocznika, sodu, potasu oraz ocena hematokrytu.

Tabela 1.5. Funkcje i sposób wykonania wybranych badań przyłóżkowych (POCT)

Badanie	Oddział	Cel badania	Aparatura/testy
RKZ, pO ₂ , jony	OIOM, SOR	Monitorowanie oddechu wspomaganego, i innych stanów krytycznych	Analizator gazometryczny i jonowy + mleczan
Glukometria	Izba przyjęć, SOR OIOM	Diagnostyka śpiączek, monitorowanie cukrzycy	Glukometr klasy <i>bedside</i>
Markery uszkodzenia mięśnia sercowego	Izba przyjęć, SOR Oddz. Nadzoru Kardiologicznego	Potwierdzenie/wykluczenie niedrożności tętnic wieńcowych w czasie „okna terapeutycznego”	Sucha immunochemia (Troponina T)
Monitorowanie krzepnięcia krwi (PT-INR)	Nadzór kardiologiczny/ kardiologia interwencyjna	Bieżąca ocena poziomu antykoagulacji przy zabiegach na tętnicach wieńcowych	Koagulometr (PT-INR, APTT)
Monitorowanie krzepnięcia krwi (tromboelastografia)	Kardiochirurgia	Ocena zużycia czynników krzepnięcia (płuco-serce)	Tromboelastograf
Różnicowanie stanów septycznych (sepsy)	OIOM, Oddz. septyczne	Wykrycie przyczyn, prognoza, leczenie ukierunkowane	Prokalcytonina, CRP (suche testy)
Ksenobiotyki	SOR, OIOM	Różnicowanie przyczyn utraty przytomności, wykrycie rodzaju zatrucia	Związki odurzające (suche testy)

Trzecia grupa badań rozproszonych obejmuje badania wykonywane przez samych pacjentów w celu samodzielnego monitorowania leczenia. W grupie tej znajdują się badania takie jak: oznaczanie glukozy czy ciał ketonowych przez pacjentów chorych na cukrzycę, czy oznaczanie czasu protrombinowego (PT-INR) u osób leczonych antagonistami witaminy K. Również lekarze pierwszego kontaktu i pracujący w przychodniach mogą posługiwać się wyselekcjonowanymi testami w celu podjęcia decyzji terapeutycznych podczas jednej wizyty pacjenta. Badania te podlegają tym samym zasadom dobrej praktyki laboratoryjnej, co badania POCT wykonywane na oddziałach szpitalnych

Badania POCT mają również ograniczenia. Wynikają one zarówno z natury tego typu badań, implikujących jakościowy lub ilościowy charakter wyniku, jak również z problemów organizacyjnych. Niezbędne jest precyzyjne wystandaryzowanie sposobu pobierania próbki krwi.

Droższe urządzenia POCT, oparte o technologię jednorazowych mikroelektrod, elektrod selektywnych dokonują pomiarów: Na, K, Cl, HCO_3 , pH, glukozy, mocznika, kreatyniny, mleczanu, troponiny I, hemoglobiny z precyzją zbliżoną do osiąganą przez wysokosprawne analizatory laboratoryjne. Użycie urządzeń POCT wymaga przeszkolenia personelu pielęgniarskiego, potwierdzonego certyfikatem i podlega ciągłemu nadzorowi przez odpowiednie Laboratorium Medyczne.

1.5.4. Dokumentacja badań POCT

Badanie laboratoryjne, tak jak każda procedura medyczna wykonywana na pacjencie, musi mieć dokumentację. Podstawowymi dokumentami POCT są: rejestr wykonanych badań, dokumentacja kontroli jakości badań, dokumentacja serwisowa aparatu POCT, potwierdzenie kompetencji personelu wykonującego badanie. Jej prowadzenie należy do obowiązków personelu medycznego wykonującego badanie. Przedstawiony niżej formularz stanowi jedynie przykład. W zależności od potrzeb może on zawierać więcej niż jeden parametr pomiarowy tak jak to ma miejsce w badaniu równowagi kwasowo zasadowej, czy w przypadku kaset wieloparametrowych (np. glukoza, Na, K, RKZ, kreatynina)

1.6. Ćwiczenie

Na ćwiczenia należy przynieść fartuch i kalkulator oraz przyjść na czczo w drugim dniu ćwiczenia, w związku z pobraniem krwi.

Należy również wydrukować tabelę 1.6 – Formularz rejestracji badań rozproszonych.

2. LABORATORYJNE WSKAŹNIKI ZABURZEŃ METABOLIZMU BIAŁEK

Andrzej Szutowicz, Hanna Bielarczyk

2.1. Podział białek osocza

Komórki organizmu człowieka zawierają około 27 tysięcy genów, które dzięki mechanizmowi alternatywnego składania kodują sekwencje kilkakrotnie większej liczby mRNA i białek. Wiele białek w różnorodnych procesach potranslacyjnej modyfikacji nabywa nowych cech strukturalnych i funkcjonalnych. Każde białko ma specyficzną budowę i może pełnić jedną lub kilka funkcji. Większość białek to białka wewnątrzkomórkowe. Znajdują się one w różnych przedziałach strukturalnych komórek (błony plazmatyczne, cytoplazma, retikulum endoplazmatyczne, pęcherzyki wydzielnicze, macierz i błony mitochondriów oraz jądro komórkowe). Występują znaczne różnice w poziomach (ekspresji) białek, w różnych typach komórek poszczególnych tkanek. Ich poziom może zmieniać się w rozwoju ontogenetycznym, jak również różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. Dla przykładu głównym białkiem osocza płodowego jest białko płodowe alfa (AFP), które po urodzeniu zostaje zastąpione przez albuminę. Mioglobina jest syntetyzowana w różnych typach miocytów, a nie ma jej w fibroblastach, hepatocytach czy też neuronach. Białka te mogą wydostawać się z uszkodzonych komórek do płynu śródmiąższowego i do osocza. Dzięki temu są one laboratoryjnymi wskaźnikami różnych patologii narządowych. Liczba białek o pierwotnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej stanowi <95% ogólnej liczby białek osocza. Natomiast znaczną większość (>90%) masy białek osocza stanowią białka wydzielnicze syntetyzowane głównie w wątrobie i limfocytach/plazmocytach. Są one przeznaczone do funkcjonowania w osoczu krwi krążącej i płynie śródmiąższowym.

Przy użyciu technik proteomicznych: wielokierunkowej chromatografii i dwukierunkowej elektroforezie, trawienia poszczególnych pól trypsyną z następczą chromatografią i identyfikacją fragmentów białek za pomocą spektrometrii masowej jak również przeglądu literatury zidentyfikowano w osoczu 1175 różnych produktów genów. Przy tym metody te nie wykrywają peptydów i białek występujących w niskich stężeniach takich jak cytokiny czy też większość hormonów peptydowych. Po restrykcyjnej walidacji uzyskanych wyników z wysokim prawdopodobieństwem wykazano istnienie w osoczu krwi około 700 białek. Należy pamiętać, że większość białek osocza występuje w kilkunastu różnorodnie glikozylowanych formach. Każde z białek ma średnio 5 mas cząsteczkowych wynikających z istnienia form prekursorowych, dojrzałych czy też degradowanych, oraz wariantów alternatywnego składania. Daje to kilkadziesiąt tysięcy form molekularnych klasycznych białek osocza. Stosunkowo mała część tych białek i ich form jest używana do podstawowej lub

wysoko specjalistycznej diagnostyki laboratoryjnej (patrz niżej). Ze względu na miejsce syntezy i funkcję białka można podzielić na szereg grup (tabela 2.1).

Tabela 2.1. Podział narządowo-czynnościowy białek osocza.

Charakterystyka grupy		Przykładowe białka
1.	Białka wydzielane przez tkanki lite (wątroba, jelita) i funkcjonujące w osoczu	Albumina, transferyna, białko C-reaktywne, aminotransferazy AST i ALT
2.	Immunoglobuliny, produkowane przez plazmocyty i limfocyty B	Immunoglobuliny A, E, G, M
3.	Ligandy receptorów o charakterze endokrynnym	Insulina, erytropoetyna, hormon wzrostu
4.	Ligandy receptorów o działaniu miejscowym	Cytokiny, neurotropiny
5.	Białka transportowane przez krew do miejsca działania	Białka lizosomalne
6.	Produkty wycieku z komórek lub uwalniane w wyniku ich uszkodzenia	Mioglobina, troponiny, kinaza kreatynowa
7.	Białka wydzielane lub uwalniane z nowotworów i patologicznie zmienionych tkanek	Markery nowotworowe
8.	Białka obce	Antygeny bakteryjne i wirusowe

Wg Human Blood Plasma Proteins. Structure and Function (Red. Schaller i wsp.) 2008

2.2. Funkcje białek osocza

2.2.1. Ciśnienie onkotyczne

Śródbłonek naczyń włosowatych nie przepuszcza cząstek białkowych o masie cząsteczkowej większej od 40kD. Dzięki temu stężenie białek w płynie wewnątrznaczyniowym (osoczu) jest czterokrotnie wyższe niż w przestrzeni śródmiąższowej. Odpowiada to stężeniu wolnych cząsteczek rzędu 1.5 mmol/L co powoduje powstanie w naczyniach kapilarnych ciśnienia onkotycznego rzędu 30 mmHg (tom I, rozdz. 5). Równoważy ono ciśnienie hydrostatyczne wynoszące w kapilarach naczyniowych około 30 mmHg. Pozwala to na utrzymanie odpowiedniej objętości osocza w krwioobiegu. Dzięki zawartości aminokwasów dwukarboksyłowych białka osocza są polianionami, które mają zdolność akceptowania jonów wodorowych i stanowią 8% pojemności buforowej krwi (tom I, rozdz. 5).

2.2.2. *Funkcje transportowe*

Albumina dzięki zawartości aminokwasów dwu karboksylowych i wysokiemu stężeniu stanowi układ o dużej pojemności wiązania szeregu związków drobnocząsteczkowych takich jak wapń, magnez, cynk, kwasy tłuszczowe, bilirubina, lipidy jak również leki, toksyny środowiskowe i różne ksenobiotyki. Szereg białek występujących w stężeniach 10 i więcej razy niższych od albuminy spełnia funkcję specyficznych transporterów o wysokim powinowactwie do różnych substancji biologicznie czynnych. Transferyna transportuje żelazo dwuwartościowe, tyreoglobulina – tyroksynę i trijodotyroninę, haptoglobina – hemoglobinę wolną, a transkobalamina witaminę B12. Również hormony sterydowe mają swoje białka transportowe: białko wiążące kortykosterydy (kortyzon, aldosteron) oraz białko wiążące sterydy płciowe (SHBG, *sex steroid binding globulin*) o wysokim powinowactwie do dihydrotestosteronu i nieco niższym do testosteronu i estriolu.

2.2.3. *Aktywności enzymatyczne i regulatorowe*

Dużą grupę enzymów proteolitycznych (proteazy serynowe) lub ich aktywatorów/inhibitorów stanowią białka układu krzepnięcia (tom I, rozdz. 9). Enzymem pierwotnie wewnątrzkomórkowym jest elastaza 3B, która jest uwalniana z zapalnie zmienionych komórek egzokrynych trzustki. Inhibitorami proteaz granulocytarnych są alfa₁-antytrypsyna oraz alfa₂-makroglobulina. Z kolei ceruloplazmina jest oksydoreduktazą, która katalizuje utlenienie Fe²⁺ do Fe³⁺ umożliwiając jego związanie z transferyną. Apolipoproteiny są białkami strukturalnymi cząstek lipoproteinowych, jak również aktywują lub hamują enzymy metabolizmu lipoprotein/lipidów, lipazę lipoproteinową i acylo-transferazę lecytyna:cholesterol (tom I, rozdz. 4). Z kolei lipaza wątrobowa hydrolizuje krążące triglicerydy i fosfolipidy, a lipaza lipoproteinowa niemal wyłącznie triglicerydy (tom I, rozdz. 4). Renina i konwertaza angiotensyny są proteazami powodującymi kolejno odszczepienie od angiotensynogenu mało aktywnego decapeptydu angiotensyny II, a następnie jego proteolityczną konwersję do aktywnego biologicznie oktapeptydu – angiotensyny I (tom I, rozdz. 6). Oprócz tego w osoczu znajduje się szereg enzymów pierwotnie wewnątrzkomórkowych takich jak aminotransferazy alaninowa i asparaginianowa, kinaza kreatynowa, fosfatazy kwaśna i zasadowa itp. Poziomy i aktywności tych ostatnich wzrastają w różnych patologich narządowych wskutek uwalniania z uszkodzonych/obumierających komórek.

2.2.4. Odporność swoista i nieswoista

Kilkanaście białek układu dopełniacza dzięki zdolności do tworzenia cząstek atakujących błony (tom II, rozdz. 2.6.2.9) jest odpowiedzialne za odporność pierwotną nieswoistą. Z kolei różne klasy immunoglobulin są wytwarzane przez aktywne limfocyty B i plazmocyty. Komórki te dzięki właściwości rearanżacji genów odpowiedzialnych za syntezę części zmiennych łańcuchów lekkich i ciężkich Ig, pod wpływem różnych antygenów tworzą odrębne linie (klony) komórkowe, których każda wytwarza jedno specyficzne przeciwciało. Ocenia się, że u dorosłego człowieka istnieje kilkadziesiąt tysięcy specyficznych przeciwciał, powstających w wyniku ekspozycji na różne egzogenne antygeny białkowe i niebiałkowe.

2.3. Podstawowe parametry metabolizmu białek osocza

2.3.1. Dystrybucja białek osocza

Całkowita pula białek osocza wynosi około 600 g, co odpowiada 4% całkowitej zawartości białek w organizmie 70 kg człowieka, wynoszącej około 15.000 g. Białka osocza można podzielić na dwie pule. Większą pulę, stanowiącą 75% masy białek osocza, stanowią białka syntetyzowane w wątrobie. Wśród nich głównym białkiem jest albumina stanowiąca 2/3 białek osocza. Głównym czynnikiem regulującym szybkość syntezy albuminy jest ciśnienie onkotyczne. Jego spadek poprzez onkoreceptory stymuluje syntezę albuminy i innych białek wątrobowych takich jak apolipoproteiny czy alfa₂-makroglobulina. Drugą grupę stanowią immunoglobuliny syntetyzowane przez limfocyty i plazmocyty w odpowiedzi na ekspozycję na antygeny. Niewielkie ilości białek wydzielniczych osocza są syntetyzowane w różnych tkankach. I tak, apoB48 jest syntetyzowana w enterocytach, część transferyny w jelitach i szpiku kostnym, a liczne hormony białkowe w gruczołach wewnętrznego wydzielania lub w rozproszonych komórkach endokrynych. Nieznaczna część całkowitego białka frakcji poza wątrobowej pochodzi z komórek rozpadających się, czy to w wyniku naturalnego starzenia czy też procesów patologicznych. Na przykład, średni czas przeżycia erytrocytów wynosi 120 dni, lecz może ulec znacznemu skróceniu w przypadku defektów wrodzonych hemoglobiny, pod wpływem procesów immunizacyjnych, czy też czynników toksycznych.

Żadne komórki produkujące funkcjonalne białka osocza nie mają zdolności ich magazynowania. Dlatego cała pula białek osocza znajduje się w przestrzeni pozakomórkowej. Około 40% puli białek osocza znajduje się w przestrzeni wewnątrznaczyniowej, co daje stężenie białka całkowitego surowicy w granicach 60-80 g/L. Pozostałe 60% znajduje się poza naczyniami w przestrzeni śródmiąższowej. Jednakże w związku z dużą objętością tej przestrzeni stężenie białek jest w niej 3-4 razy niższe niż w osoczu. Istotnym czynnikiem

powodującym przechodzenie białek przez ścianę śródbłonka naczyń jest ciśnienie hydrostatyczne. Czas całkowitego wyrównania znakowanej izotopem albuminy w obu przedziałach pozakomórkowych trwa 2-3 dni, przy czym najszybciej (90%) proces ten przebiega w pierwszej dobie. Dystrybucja poszczególnych białek w obu kompartmentach zależy od masy cząsteczkowej. I tak tylko 40% całkowitej ustrojowej puli albuminy, alfa₁-antytrypsyny czy transferyny i innych białek o m.c.z. poniżej 100 kD znajduje się w naczyniach. Natomiast wartość ta dla białek o wyższych masach cząsteczkowych: immunoglobulin A i G – wynosi 60%, a dla alfa₂-makroglobuliny, fibrynogeny czy immunoglobulin M – 80%.

2.3.2. *Synteza i degradacja*

Poza ciśnieniem onkotycznym regulującym ekspresję genów syntezy albuminy, apolipoprotein i innych białek wątrobowej puli osocza, istnieją liczne mechanizmy oddziałujące specyficznie na syntezę różnych białek. I tak, niski poziom Fe aktywuje syntezę transferyny, ferrytyny i receptora transferyny poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego – elementu odpowiedzi na żelazo (IRE – *Iron Responsive Element*). Cytokiny prozapalne (np. Interleukina 6) poprzez czynniki transkrypcyjne z rodziny wątrobowych czynników jądrowych (HNF – *Hepatic Nuclear Factors*) aktywują syntezę białka C-reaktywnego (CRP), i innych białek ostrej fazy oraz apolipoproteiny A₂ w wątrobie.

Synteza łańcucha białkowego w rybosomach komórek wątroby i komórkach innych tkanek trwa zwykle 1-2 min, dając w efekcie produkt w postaci probiałka. Dalsza obróbka potranslacyjna polegająca na ograniczonej proteolizie, dołączeniu składników glikozydowych lub/i lipidowych, fosforylacji bądź acetylacji itp. zajmuje 20 - 40 min dając gotowe, w pełni aktywne białko. Postranslacyjna modyfikacja/aktywacja może odbywać się zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz komórki.

Czas półtrwania wewnątrzkomórkowych białek strukturalnych zależy od rodzaju komórek i czasu ich przeżycia. Może on wahać się od 2-3 dni dla komórek nabłonka jelitowego, do 120 dni dla erytrocytów i dłużej dla komórek neuronalnych.

W organizmie człowieka w ciągu 24 godz. degradacji ulega 200-300 g białek (około 3 g/kg masy ciała), z czego 25 g stanowią białka osocza krwi. Odpowiada to 10% całkowitego dobowego obrotu białek. Obrót metaboliczny poszczególnych białek jest bardzo zróżnicowany. Dla albuminy wynosi on około 20 dni, dla immunoglobulin 24 dni, a dla niektórych białek układu krzepnięcia kilka godzin. Średni czas obecności białek w osoczu jest 2-3 razy krótszy od białek wewnątrzkomórkowych. W związku z tym konsekwencje zaburzeń metabolizmu białek w pierwszej kolejności ujawniają się w postaci obniżenia poziomu różnych białek osocza. Cząsteczki białek bezpośrednio lub w formie kompleksów wiążą się z odpowiednimi receptorami, są pozbawiane komponenty

glikozydowej (desjalilacja) oraz internalizowane na drodze endocytozy, a następnie hydrolizowane w lizosomach. Degradacja lizosomalna jest procesem niespecyficznym i ma charakter zrandomizowanej reakcji pierwszego rzędu. Wiek nieuszkodzonych cząsteczek białkowych nie wpływa na szybkość ich proteolizy. Jednakże białka uszkodzone przez procesy glikacji, oksydacji, nitrozylacji czy też częściowej proteolizy, są usuwane z przestrzeni pozakomórkowej szybciej niż nieuszkodzone. Proces ten przyspiesza białko ubiquityna, której N-końcowa domena łączy się z uszkodzonym białkiem, zmieniając jego strukturę trzeciorzędową. Przez to kompleks taki staje się bardziej podatny na wewnątrzkomórkową proteolizę.

Aminokwasy uwalniane w procesie proteolizy mieszają się z pulą wolnych aminokwasów i stają się ponownie dostępne dla procesów syntezy białek lub ulegają deaminacji. Ich szkielet węglowy może być zużyty do produkcji energii lub w procesie glukoneogenezy. Amoniak po przemianie do karbamoilofosforanu jest używany do syntezy mocznika.

Degradacja białek osocza odbywa się we wszystkich tkankach proporcjonalnie do ich masy i aktywności metabolicznej. Albumina jest rozkładana w skórze, duża część glikoprotein w wątrobie, białka o dużej masie cząsteczkowej w śródbłonku naczyń. Część białek jest degradowana z zaangażowaniem przestrzeni trzeciej. Około 5 g białek osocza przesącza się z naczyń włosowatych krezki do światła przewodu pokarmowego, gdzie ulega hydrolizie przez proteazy obecne w sokach trawiennych. Takiej samej degradacji podlegają białka soków trawiennych i złuszczonego nabłonka przewodu pokarmowego. Powstałe aminokwasy są na powrót wchłaniane do krążenia wrotnego. Tylko niewielki procent białek i domen łańcuchów peptydowych jest odporny na proteolizę.

W kłębkach nerkowych białka osocza podlegają filtracji do moczu pierwotnego. Błona podstawna kłębków nie przepuszcza cząstek o masie cząsteczkowej większej od 40 kDa. W związku z tym gradient filtracyjny dla albuminy w kłębkach wynosi około 1000:1. Można obliczyć, że przy poziomie albuminy w osoczu rzędu 50 g/L i filtracji kłębkowej 100 L/dobę, do moczu pierwotnego przesącza się około 5 g albuminy (gradient filtracyjny 1:1000) i dużo mniejsze ilości innych białek. Około 99% białek podlega reabsorbacji zwrotnej, a następnie degradacji do aminokwasów w komórkach bliższych kanalików nerkowych. W efekcie, większość zdrowych ludzi wydalą z moczem nie więcej niż 10 mg albuminy/dobę. Za wartość graniczną uważa się wydalanie z moczem 30 mg albuminy na dobę. Całkowite wydalanie białka z moczem wynosi 20-80 mg/dobę i wynika z wydzielania dodatkowych białek (uromukoid) przez nabłonek dróg moczowych.

2.3.3. *Wartości referencyjne dla białek surowicy*

Prawidłowy poziom białka całkowitego w surowicy wynosi 60-80 g/L i jest wypadkową szybkości syntezy i degradacji (utruty) albuminy i immunoglobulin. Poziom albuminy wynosi 35-50 g/L, a immunoglobulin 12 – 18 g/L. Dlatego zmiany w poziomach pozostałych kilkuset białek nie są w stanie w istotnym stopniu zmodyfikować tego parametru. Jednoczesne wykonanie oznaczenia białka całkowitego i albuminy pozwala wyznaczyć stosunek [albumina]/[globuliny], który jest testem przesiewowym na sprawność i wzajemne relacje dwóch głównych układów syntezy białek, wątroby i limfocytów/plazmocytów. Jego prawidłowa wartość wynosi ok. 1,5. Istotnym czynnikiem wpływającym na poziomy albuminy i innych białek osocza jest ciśnienie hydrostatyczne, determinujące dystrybucję wody między łożyskiem naczyniowym, a płynem śródmiąższowym na poziomie naczyń włosowatych (tom I, rozdz. 6). I tak, wzrost ciśnienia krwi związany ze zmianą pozycji z leżącej na stojącą może po 30 minutach zwiększyć stężenie białek o 5 – 10%, a wysiłek fizyczny o dalsze 10%. Naturalnym zjawiskiem związanym z hospitalizacją jest spadek poziomu białka całkowitego surowicy o 5-10 g/L. Podobnym, zależnym od ciśnienia hydrostatycznego zmianom ulegają parametry morfologiczne krwi, a także anality drobnocząsteczkowe występujące w postaci kompleksów ze specyficznymi białkami wiążącymi. Takimi parametrami są: żelazo (transferyna), miedź (ceruloplazmina), cynk (albumina i alfa₂-makroglobulina), cholesterol i triglicerydy (apolipoproteiny), wapń (albumina) itp. (tabela 2.2).

Dlatego istotnym elementem przy ocenie parametrów makrocząsteczkowych surowicy jest standaryzacja warunków pobierania krwi. Powinno się ono odbywać po kilkunastominutowym odpoczynku pacjenta w pozycji siedzącej. Niemniej populacja szpitalna ma poziomy białka całkowitego/albuminy i innych makrocząsteczek niższe od populacji pacjentów leczonych ambulatoryjnie.

Tabela 2.2. Wpływ wzrostu ciśnienia tętniczego na stężenie wybranych analitów w surowicy krwi

Wzrost stężenia	
Białek o m.cz. >40 kDa	Związków o m.cz. < 40 kDa, związanych z białkami
Białko całkowite	Cholesterol
Albumina	Trójglicerydy
Transferyna	Wapń
Apolipoproteiny	Żelazo
Ceruloplazmina	Cynk
Globulina wiążąca tyroksynę	Miedź
α ₂ makroglobulina	Całkowita T ₄ , T ₃

Zaciśnięcie stazy przy pobieraniu krwi może po kilku minutach również spowodować wzrost poziomu białek wskutek wzrostu ciśnienia i ucieczki wody osocza poza łożysko naczyniowe.

Wartości referencyjne dla indywidualnych białek zostały podane w odpowiednich podrozdziałach.

2.4. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń gospodarki białkowej

2.4.1. *Hipoproteinemie – hypoalbuminemie*

Większość często występujących zaburzeń klinicznych takich jak: glomerulopatie, enteropatie, choroby nowotworowe, zaburzenia wchłaniania itp., sprzyja powstawaniu niedoborów białkowych. Dlatego hipoproteinemie są częściej spotykane w praktyce klinicznej niż hiperproteinemie.

Przyczyną większości hipoproteinemii jest obniżenie poziomu albuminy. Rzadko hipoproteinemia występuje przy ciężkich niedoborach immunoglobulin. Hipoproteinemie można, więc podzielić na spowodowane:

- zahamowaniem syntezy białek (albuminy) w wątrobie
- zwiększoną utratą białek
- spadkiem syntezy immunoglobulin
- rozcieńczeniem wskutek retencji lub redystrybucji wody pozakomórkowej oraz artefaktami.

Pojawienie hipoproteinemii jest najczęściej spowodowane występowaniem kilku czynników sprzyjających temu zjawisku. I tak: zespoły jelitowej utraty białek współistnieją zwykle z zaburzeniami wchłaniania aminokwasów przez nabłonek jelitowy. Niedobory białkowe są pogłębiane przez współistniejące równocześnie zaburzenia wchłaniania tłuszczów i węglowodanów. Niedobory białkowe spowodowane zespołem nerczycowym, upośledzają wchłanianie aminokwasów z jelit wskutek współistniejącej enteropatii. Hipoproteinemia, po wykluczeniu przewodnienia i błędu przedlaboratoryjnego wskazuje na istnienie któregoś z poważnych stanów chorobowych, wymagających dalszego diagnozowania.

Za krytyczne i wymagające natychmiastowej interwencji uważa się stężenie białka całkowitego poniżej 45 g/L, a albuminy 20 g/L. W takich warunkach niskie ciśnienie onkotyczne powoduje ucieczkę wody poza naczynia, z powstawaniem obrzęków i przesięków do jam ciała i zagrażającej życiu hipowolemii. Większość patologii prowadzących do hipoproteinemii zmienia stosunki stężeń poszczególnych białek surowicy. W takich przypadkach stosunek stężenia albuminy do sumy stężeń pozostałych białek osocza (globulin) ulega zmianie. Są to hipoproteinemie z dysproteinemią. Jednakże, w przypadku zmian stężeń pojedynczych białek występujących w surowicy w małych ilościach może nie dochodzić do zmiany stosunku [albumina]/[globuliny].

Również w hipoproteinemiach z przewodnienia lub redystrybucji wody stosunek [albumina]/[globuliny] przeważnie nie ulega zmianie.

Tabela 2.3. Najczęstsze przyczyny hipoproteinemii

Przyczyny hipoproteinemii	
Zahamowanie syntezy białek w wątrobie (hipoalbuminemia)	niedobory białek: w diecie, niedożywienie, Kwashiorkor; zaburzenia wchłaniania (często u dzieci): zakażenia przewodu pokarmowego (lamblie, bakterie), mukowiscydoza, niedobory disacharydaz, choroba trzewna, wrodzony przerost odźwiernika, w przebiegu zespołów utraty białka, zespoły poresekcyjne. uszkodzenia wątroby: marskość, zanik, uszkodzenie toksyczne, przerzuty nowotworowe, nowotwory pierwotne.
Zespoły utraty białka	nerkowe zespoły utraty białka (zespół nerczycowy - w przebiegu lub jako zejście): kłębkowe zapalenie nerek (80% zespołów nerczycowych), cukrzyca, toczeń rumieniowaty trzewny, skrobiawica, zakrzepica żył nerkowych lub żyły głównej dolnej; jelitowe zespoły utraty białka: stany zapalne błony śluzowej żołądka i jelit, choroba Crohna-Leśniowskiego, przewlekłe wrzodziejące zapalenie jelit, zwężenie jelit, nowotwory złośliwe żołądka i jelit, polipowatość jelit, uchyłki jelita, choroba trzewna, choroba popromienna, zaburzenie odpływu chłonki (rozszerzenie, ucisk naczyń chłonnych, zmiany zapalne krezki), niewydolność krążenia, zespół nerczycowy; skórne zespoły utraty białka: rozległe oparzenia, dermatozy (łuszczyca, pęcherzyca); wysiękowe zespoły utraty białka: rozległe obrzęki, zapalenie płuc, opłucnej; stany kataboliczne: ciężka sepsa, wysoka gorączka, urazy, choroby nowotworowe; krwawienia.
Niedobory immunoglobulin	proces nowotworowy w obrębie szpiku toksyczne uszkodzenie szpiku
Zmiany objętości przestrzeni pozakomórkowej	przewodnienia redystrybucja wody i białek osocza: - spadek ciśnienia krwi: odpoczynek, pozycja leżąca, hospitalizacja - stany zapalne (wzrost przepuszczalności naczyń włosowatych)
Artefakty	Błędy w pobraniu krwi

2.4.2. Ocena niedoborów białek osocza

Niskie poziomy albuminy i białka całkowitego poza leczeniem przyczyny je wywołującej, mogą wymagać wyrównywania ich niedoborów, szczególnie, gdy znajdują się poniżej poziomów grożących powikłaniami hipowolemicznymi. Często przed wykonaniem zabiegu chirurgicznego poziom białka/albuminy powinien zostać podniesiony do bezpiecznego poziomu poprzez infuzję odpowiedniej ilości koncentratu albuminy lub osocza.

Niedobór białek można oszacować na podstawie wzoru:

$$\text{Niedobór białka} = [\text{białko całkowite aktualne (g/L)}] \times 9 \text{ L} - [60 \text{ g/L}] \times 9 \text{ L}$$

gdzie:

- 60 g/L jest dolnym zakresem prawidłowego poziomu białka całkowitego w osoczu,
- 9 L to objętość dystrybucji albuminy.

Należy pamiętać, aby pokryć zarówno obliczony niedobór jak i dzienne straty białka. Terapię należy monitorować oznaczając poziomy białka całkowitego i albuminy.

2.4.3. Hiperproteinemie

Prawdziwa hiperproteinemia jest spowodowana znacznym wzrostem produkcji/stężenia jednej lub wielu klas immunoglobulin (tabela 2.4). Nie ma stanów prawdziwej hiperalbuminemii ani w warunkach fizjologicznych ani patologicznych.

Tabela 2.4. Najczęstsze przyczyny hiperproteinemii

Przyczyny hiperproteinemii	
Hipergammaglobulinemia poliklonalna	przewlekłe stany zapalne; przewlekłe choroby wątroby (marskość, podostre i przewlekłe zapalenie); choroby autoimmunizacyjne (reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, sklerodermia, guzkowate zapalenie okołotętnicze, zapalenie skórno-mięśniowe), sarkoidoza
Hipergammaglobulinemia monoklonalna	szpiczak mnogi; makroglobulinemia Waldenströma; choroba ciężkich łańcuchów; inne nowotwory układu chłonnego
Odwodnienie	dysproporcja pomiędzy podażą wody a jej utratą, stosunek A/G pozostaje niezmienny.
Artefakty	błędy w pobraniu krwi

Podwyższone stężenie albuminy może występować w odwodnieniach. Może też być artefaktem spowodowanym długim utrzymywaniem stazy podczas pobierania krwi, lub pobieraniem krwi z igły, którą podawano infuzję zagęszczonego preparatu białkowego. Zjawisko to dotyczy wkluc do żył powierzchownych, w których panuje zastój lub przepływ krwi jest bardzo wolny. Pobieranie krwi ze specjalnych ujęć kateterów wklutych do dużych żył, pozwala na uzyskanie próbki krwi żyłnej nie zawierającej domieszek płynów infuzyjnych.

2.4.4. Szybkość opadania krwinek czerwonych (odczyn Biernackiego; ESR, erythrocyte sedimentation rate)

Badanie to jest jednym z częściej wykonywanych badań laboratoryjnych. Zasada badania polega na pomiarze szybkości opadania erytrocytów we krwi pobranej z antykoagulantem (cytrynianem sodu lub wersenianem potasu). Krwinki czerwone opadają dzięki temu, że ich ciężar właściwy (1,095 g/mL) jest większy niż osocza (1,027 g/mL) przy ich umiarkowanej agregacji. W klasycznej metodzie Westergreen szybkość opadania mierzy się przez 1 godzinę w specjalnych, kalibrowanych kapilarach lub długich wąskich probówkach. W nowoczesnych, automatycznych czytnikach OB czas pomiaru został skrócony do kilku-kilkunastu minut. Aparaty te mierzą szybkość początkową opadania erytrocytów. Może to przy dużych prędkościach opadania krwinek dawać rozbieżności pomiędzy metodą klasyczną i automatyczną.

Szybkość opadania erytrocytów jest wypadkową składu osocza oraz właściwości erytrocytów. Wzrost stężenia fibrynogenu, α_2 -makroglobuliny, białek ostrej fazy i immunoglobulin oraz spadek stężenia albuminy powodują przyspieszenie OB. Błona erytrocytów ma potencjał ujemny, co spowalnia tworzenie agregatów. Wymienione białka łącząc się z błonami erytrocytów zmniejszają ich potencjał i ułatwiają agregację krwinek. Za opadanie krwinek odpowiadają: w 55% fibrynogen, w 7% α_2 -makroglobulina i w 11% immunoglobuliny. Dlatego wzrost OB może być względnie niewielki w ciężkich stanach ostrej fazy, w których dochodzi do nadmiernego zużycia fibrynogenu (sepsa, zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego). Również mała liczba erytrocytów, ich mikrocytoza i/lub sferocytoza w różnych niedokrwistościach (tom 1, rozdz.8) sprzyjają przyspieszeniu OB. Liczba patologii, w których OB może ulegać podwyższeniu jest bardzo duża. Dlatego szybkość opadania erytrocytów jest z jednej strony badaniem nieswoistym, z drugiej zaś bardzo czułym wskaźnikiem różnorodnych patologii.

U osób zdrowych szybkość opadania erytrocytów zależy od wieku i płci oraz stanu fizjologicznego (tabela 2.5).

Tabela 2.5. Wartości referencyjne dla szybkości opadania erytrocytów metodą Westergreen

Grupa	Szybkość opadania mm/godz.
Noworodki	do 2
Niemowlęta do 6 miesiąca życia	12-17
Kobiety do 60 roku życia	do 12
Kobiety po 60 roku życia	do 20
Mężczyźni do 60 roku życia	do 8
Mężczyźni po 60 roku życia	do 15

U kobiet, w wieku rozrodczym, OB może wzrastać w czasie miesiączki, ciąży i połogu. Poza wymienionymi sytuacjami podwyższone OB jest niemal zawsze wskaźnikiem jawnej lub ukrytej patologii (tabela 2.6). Z drugiej strony prawidłowe OB nie wyklucza istnienia określonej choroby. U noworodków w związku z dużą liczbą erytrocytów (wysoki hematokryt) opadają one wolno, nawet przy istnieniu ciężkich stanów zapalnych. Zaawansowane choroby nowotworowe lub autoimmunologiczne, w przypadku obecności krioglobulin lub kompleksów immunologicznych mogą przebiegać przy prawidłowych lub niskich wartościach OB, wskutek znacznego wzrostu lepkości osocza.

Tabela 2.6. Niektóre przyczyny zmian szybkości opadania erytrocytów (odczyn Biernackiego, OB)

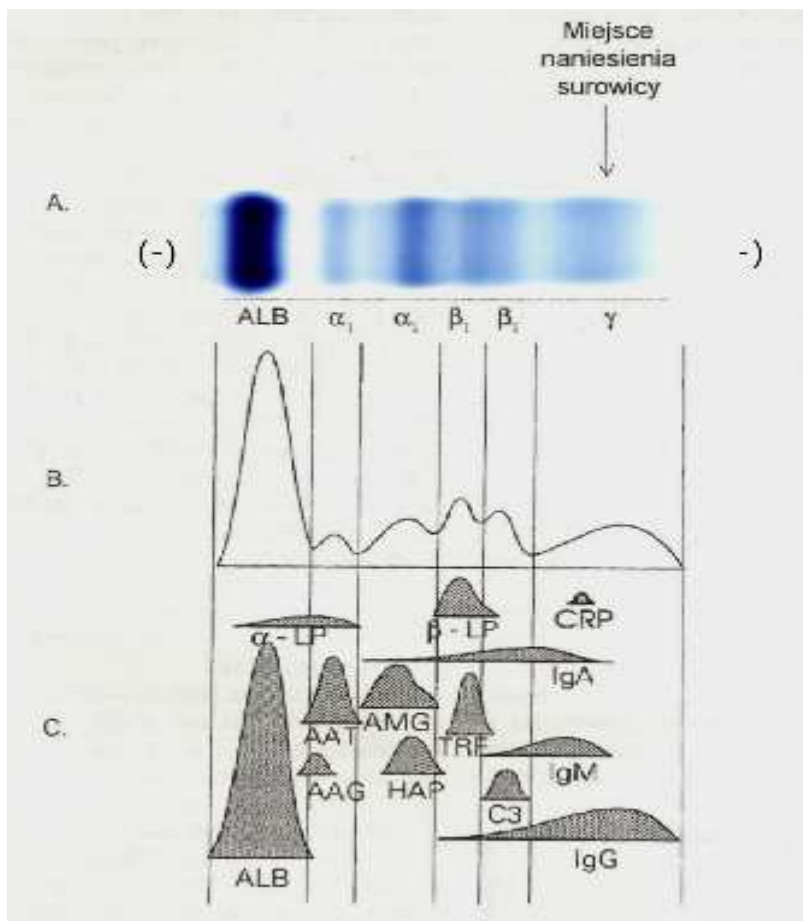
Stany chorobowe	Zmiana OB	Przyczyny/mechanizmy
Ostre stany zapalne/zakażenia	↑	Fibrynogen ↑, albumina ↓
Przewlekłe stany zapalne/zakażenia	↑	Immunoglobuliny ↑ (poliklonalne)
Kolagenozy	↑	Fibrynogen ↑, immunoglobuliny ↑
Marskość wątroby	↑	Immunoglobuliny ↑, albumina ↓↓
Zespół nerczycowy	↑	Albumina ↓↓, α ₂ -makroglobulina ↑↑, erytrocyty (Ht) ↓
Gammapatie monoklonane	↑	Immunoglobulina ↑ (monoklinalna), albumina
Nowotwory lite	↑	Fibrynogen ↑, albumina ↓, erytrocyty (Ht) ↓
Urazy, martwica tkanek	↑	Fibrynogen ↑, albumina ↓
Niedokrwistości	↑	Erytrocyty (Ht) ↓
Hiperlipoproteinemia	↑	Chylomikrony ↑
Dekstrany i podobne polimery	↑	Absorpcja dekstranu na erytrocytach
Faza premenstruacyjna cyklu miesięcznego	↑	Wzrost OB bezpośrednio przed menstruacją, spadek podczas menstruacji

Stany chorobowe	Zmiana OB	Przyczyny/mechanizmy
Ciąża i połóg	↑	Fibrynogen↑, ciągły wzrost OB od 4. tygodnia ciąży, maksimum w 1-tygodniu po porodzie
Doustne środki antykoncepcyjne	↑	Fibrynogen↑
Noworodki	↓	Erytrocyty (Ht) ↑
Czerwienica prawdziwa	↓	Erytrocyty (Ht) ↑
Nadkrwistości objawowe	↓	Erytrocyty (Ht) ↑
Hemoglobinopatie i defekty błon erytrocytów	↓	Nieprawidłowe erytrocyty (sierpowate, wielokształtne, akantocyty itp.)
Krioglobulinemie	↓	Immunoglobuliny monoklonalne↑ (krioglobuliny), kompleksy immunologiczne↑

Poza wymienionymi przyczynami fizjologicznymi, wzrost OB zawsze wskazuje na istnienie jawnej lub ukrytej patologii. Natomiast niskie OB nie wyklucza istnienia stanu chorobowego. Nawet ciężkie choroby (np. nowotwory, stany niedotlenienia) mogą przebiegać przy prawidłowych wartościach OB.

2.5. Prawidłowy obraz rozdziału elektroforetycznego białek surowicy krwi

Rozdział elektroforetyczny białek surowicy polega na wykorzystaniu ich różnej mobilności w polu elektrycznym. Mobilność ta, oraz kierunek wędrówki w polu elektrycznym zależą od stosunku ładunku elektrycznego białek do ich masy. W zasadowym pH (8,6) standardowego środowiska do elektroforezy większość białek surowicy ma wypadkowy ładunek ujemny, wynikający z obecności aminokwasów dwukarboksylowych - glutaminianu i asparagianu. W związku z tym wędrują one w kierunku anody. Stosunkowo niewiele białek (niektóre immunoglobuliny G) ma wypadkowy ładunek dodatni wynikający z dużej zawartości aminokwasów zasadowych: histydyny i lizyny. Wędrują one w kierunku katody (ryc. 2.1). Rutynowy rozdział odbywa się na podłożu żelu agarozowego/agarowego lub poliakrylamidowego w układzie płytkowym lub kapilarnym. Proteinogram wybarwiany jest zwykle czernią amidową. Uwidacznia on 6 głównych frakcji: albuminową, oraz α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - oraz γ -globulinową (ryc. 2.1).



Ryc. 2.1. Prawidłowy rozdział elektroforetyczny białek surowicy krwi (A). Odczyt densytometryczny określający skład procentowy frakcji (B). Diagram rozmieszczenia poszczególnych białek surowicy krwi we frakcji (C)

Procentowy udział poszczególnych frakcji w ogólnej puli białek surowicy (tab. 2.7) jest dokonywany z pomocą odczytu densytometrycznego (ryc. 2.1). Jednocześnie z rozdziałem elektroforetycznym mierzony jest poziom białka całkowitego, co pozwala wyliczyć również bezwzględne stężenia poszczególnych frakcji. Każda z frakcji zawiera znaczną liczbę białek specyficznych (ryc. 2.1) Jednakże obraz poszczególnych frakcji jest determinowany tylko przez nieliczne białka, których stężenie jest odpowiednio wysokie. Do takich białek zaliczamy we frakcji:

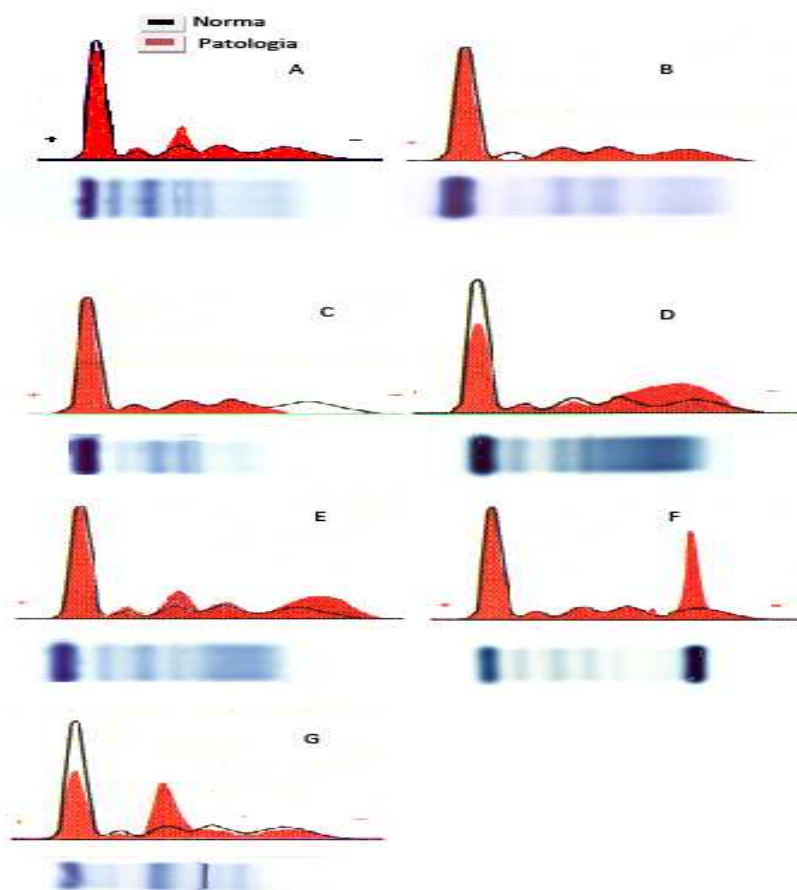
albuminowej	albuminę
α_1 -globulinowej	α_1 -antytrypsynę, α -lipoproteiny (HDL)
α_2 -globulinowej	α_2 -makroglobulinę, haptoglobinę
β_1 -globulinowej	transferynę, β -lipoproteiny (LDL)

β_2 -globulinowej	frakcję C3 dopełniacza
γ -globulinowej	kilkanaście tysięcy immunoglobulin zaliczanych do klas A, G i M. Niektóre z nich wykazują mobilność frakcji β , a nawet α_2

Tabela 2.7. Prawidłowy skład frakcji białkowych surowicy w rozdziale elektroforetycznym

Frakcja	% zawartości białka
albumina	53-68
α_1 -globuliny	1-4
α_2 -globuliny	3-14
β -globuliny	8-17
γ -globuliny	9-22

W rutynowej procedurze nie wykonuje się rozdziału białek osocza. Zawiera ono fibrynogen, który lokalizuje się między frakcjami β i γ ; w postaci ostrego piku frakcji ϕ . Może to powodować trudności w identyfikacji lokalizujących się również tam pików białka C-reaktywnego (CRP) i/lub części immunoglobulin monoklonalnych.



Ryc. 2.2. Podstawowe rodzaje patologicznych proteinogramów surowicy: A – ostra faza; B – niedobór α_1 -antytrypsyny; C – hipogammaglobulinemia; D – marskość wątroby; E – hipergammaglobulinemia poliklonalna; F – gammapatia monoklonalna; G – zespół nerczycowy

2.6. Indywidualne białka osocza – znaczenie diagnostyczne

2.6.1. Albumina

Albumina jest białkiem globularnym o masie cząsteczkowej 66 kDa, zawierającym 190 aminokwasową domenę z 6 mostkami dwusiarczkowymi cystein. Jest produktem jednego genu *ALB*, zlokalizowanego w chromosomie 4q13.3. Jej synteza w wątrobie zachodzi z szybkością około 15 g/dobę, a czas

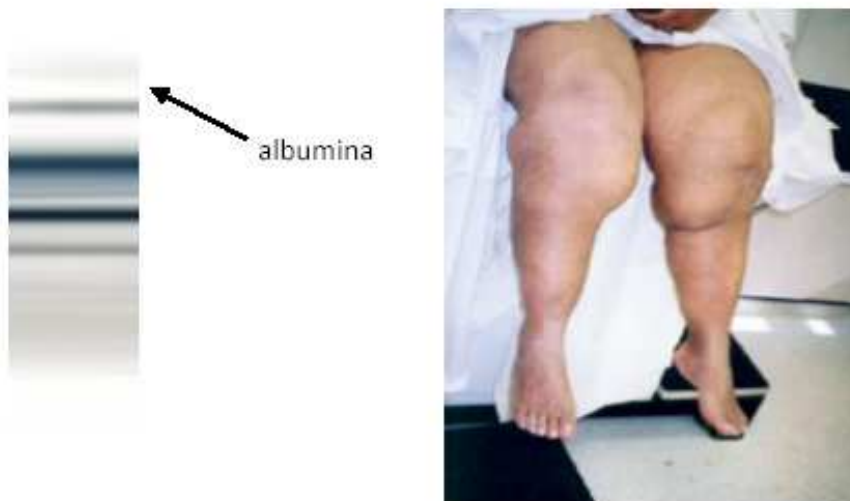
półtrwania wynosi 14 dni. Do tej samej rodziny należą białko płodowe alfa i białko wiążące witaminę D. Wszystkie one zawierają homologiczne domeny z 5-6 mostkami dwusiarczkowymi.

U ludzi występuje jedna forma molekularna albuminy. Bardzo rzadko obserwuje się dziedziczne występowanie 2 form molekularnych albuminy o różnym składzie aminokwasowym i różnej mobilności elektroforetycznej (ryc. 2.3). Stan ten nie powoduje żadnych zmian klinicznych.



Ryc. 2.3. Bisalbuminemia

Inną rzadką, dziedziczną recesywnie anomalią jest analbuminemia (ryc. 2.4). Również i w tym przypadku nosiciele tej cechy nie mają objawów chorobowych poza umiarkowanymi obrzękami i niskim ciśnieniem krwi. Ciśnienie onkotyczne jest utrzymywane przez wzrost stężenia innych białek osocza. Są również defekty patogenne takie jak dysalbuminemia hipertyrosynemiczna, w której albumina wykazuje zbyt duże powinowactwo do tyroksyny. Inny wariant albuminy wiąże zbyt silnie Zn powodując bezobjawowy klinicznie wzrost poziomu tego metalu w surowicy.



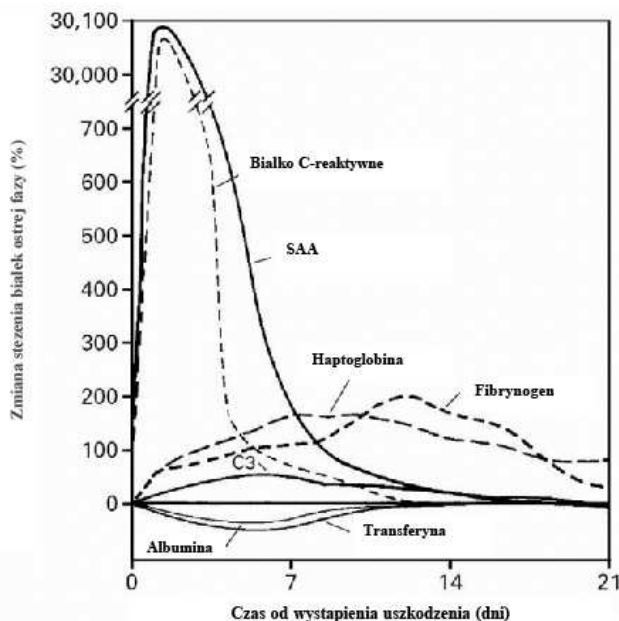
Ryc. 2.4. Analbuminemia

Albumina jest głównym białkiem surowicy. Jej wartości referencyjne wynoszą 35-50 g/L. Odpowiada ona za 80% ciśnienia onkotycznego, zapewniając przez to odpowiednią objętość osocza w łożysku naczyniowym. Jej spadek w zespołach utraty białka do wartości poniżej 20 g/L jest stanem zagrażającym życiu wskutek głębokiej hipowolemii. Jest również miejscem wiązania, o dużej pojemności i niskim powinowactwie dla hormonów tarczycowych i innych hormonów lipofilnych, wolnych kwasów tłuszczowych, bilirubiny wolnej, jonów Ca^{2+} , antybiotyków i innych leków, ma również właściwości buforowe.

Przewlekła hiperglikemia powoduje wzrost poziomu glikowanej formy albuminy i w mniejszym stopniu innych białek surowicy. Są one oznaczane w postaci fruktozaminy, która jest retrospektywnym wskaźnikiem glikemii (tom I, rozdz. 11). Z kolei, niedotlenienie w przebiegu zawału mięśnia sercowego, upośledzenia krążenia w tętnicach szyjnych lub kończyn dolnych powoduje modyfikację N-końcowej sekwencji albuminy-DAHK, która traci zdolność wiązania kationu Co^{2+} . Badanie zdolności wiązania kobaltu przez albuminę (albumina modyfikowana hipoksją – IMA) jest narządowo niespecyficznym wskaźnikiem niedotlenienia.

2.6.2. Białka ostrej fazy

Białka ostrej fazy stanowią heterogenną grupę białek osocza, których synteza w wątrobie jest stymulowana głównie przez interleukinę 6, której poziom wzrasta w przebiegu różnych stanów zapalnych, zakażeń, urazów, i procesów martwiczych (zawał mięśnia sercowego). Głównym miejscem syntezy interleukin i innych cytokin prozapalnych są pobudzone monocyty i makrofagi. Do białek ostrej fazy zalicza się między innymi: białko C-reaktywne (CRP), białko amyloidowe A surowicy (SAA), α_1 -antytrypsynę, α_1 -kwaśną glikoproteinę, haptoglobinę i ceruloplazminę, fibrynogen oraz część białek układu dopełniacza. Fizjologicznie ich poziomy wzrastają w ciąży i u kobiet stosujących doustne środki antykoncepcyjne. Niektóre z wymienionych białek mają małą masę cząsteczkową. W związku z tym przy ich wzroście w ostrych stanach zapalnych i uszkodzeniach tkanek mogą one przedostawać się do moczu dając proteinurię przednerkową (*overflow proteinuria*).



Ryc. 2.5. Dynamika zmian stężenia białek ostrej fazy w surowicy

2.6.2.1. Alfa1-antytrypsyna (A1AT)

A1AT jest produktem genu zlokalizowanego w chromosomie 14q32.1. Białko ma masę cząsteczkową 55 kDa o właściwościach inhibitora proteaz serynowych (serpiny). Jest ona głównym inhibitorem elastazy wydzielanej z

granulocytów podczas fagocytozy. A1AT jest odpowiedzialna za 90% aktywności antytrypsynowej osocza.

Występują liczne warianty genetyczne A1AT. U 95% ludzi występuje fenotyp MM, o najwyższej aktywności antyproteazowej. Dwie inne izoformy A1AT, S i Z, odpowiadają heterozygotycznym genotypom MS i MZ oraz homozygotycznym SS i ZZ. Aktywność anty-trypsynowa tych odmian fenotypowych A1AT waha się od 80% dla fenotypu MS do 15% dla ZZ. Ten ostatni fenotyp występuje u ludzi rasy kaukaskiej z częstotliwością 1:700 – 1:2000, a u rasy żółtej 1:50000. Bardzo rzadki genotyp Pi w ogóle nie wytwarza białka A1AT.

Skutki niedoboru A1AT dają objawy kliniczne tylko u części nosicieli homozygotycznej cechy ZZ. W okresie noworodkowym może występować u nich przedłużona żółtaczką, która wymaga różnicowania z wrodzonym zwężeniem przewodu żółciowego wspólnego i /lub zapaleniem wątroby. Wątroba jest powiększona, a hepatocyty są przeładowane niewydzieloną A1AT –ZZ. W 2% przypadków defekt może prowadzić do śmierci w ciągu 1-go roku życia z powodu marskości żółciowej wątroby. Ten stan kliniczny jest wskazaniem do przeprowadzenia transplantacji wątroby. W późniejszym okresie u tych osób mogą pojawić się rozstrzenie oskrzeli i rozedma płuc. Są one spowodowane zniszczeniem zrębu elastynowego tkanki płucnej. Badanie elektroforetyczne wykazuje obniżenie poziomu frakcji alfa 1, w której A1AT odpowiada za 90% intensywności jej wybarwienia (ryc. 2.2B). Ostateczne rozpoznanie można postawić na podstawie wykazania niskiego poziomu A1AT, metodą immunoturbidymetryczną oraz obecności mutacji punktowych w genie, metodą RT-PCR lub badaniem mikromacierzy.

Wtórne niedobory A1AT pojawiają się w zespole niewydolności oddechowej noworodków (zespół błon szklanych). W tej patologii A1AT jest wychwytywana przez błony hialinowe powstające w drogach oddechowych tych dzieci. U dorosłych niedobór A1AT pojawia się w zespole nerczycowym, w jelitowych zespołach utraty białka jak również w stanach ciężkiego uszkodzenia wątroby.

Wzrost poziomu A1AT w różnych stanach zapalnych może osiągać wartości 4-krotnie przekraczające górny poziom wartości referencyjnych (błoniaste zapalenie kłębków nerkowych). Białko to obecnie nie jest używane, jako wskaźnik ostrej fazy ze względu na stosunkowo powolne i małe wzrosty jego poziomu.

2.6.2.2. Alfa1-kwaśna glikoproteina – orozomukoid (AGP)

AGP jest białkiem kwaśnym z rodziny lipokalin o m.c. 44 kDa, o dużej zawartości reszt glikozydowych, występującym w dwóch formach molekularnych. Białko to wiąże i transportuje progesteron, oraz moduluje aktywność układu immunologicznego podczas reakcji ostrej fazy. Poziom AGP

w stanach zapalnych wzrasta bardzo powoli osiągając po 5 dniach wartości dwukrotnie wyższe od wyjściowych. Jedynie w chorobie Crohn obserwowano ośmiokrotny wzrost jego stężenia. Spadek poziomu w surowicy pojawia się w ciężkich chorobach wątroby, zespołach utraty białka, niedożywieniu oraz w stanach wyniszczenia na różnym tle. Zmiany poziomu tego białka nie wpływają na wielkość frakcji alfa 1 w rozdziale elektroforetycznym z powodu słabego wiązania czerni amidowej.

2.6.2.3. Haptoglobina (Hp)

Haptoglobina jest tetramerem składającym się z dwóch rodzajów podjednostek ($\alpha_2\beta_2$) o dużej homologii z hemoglobiną. Jest produktem genu *HT* zlokalizowanego w chromosomie 16 i występującego w dwóch formach allelicznych 1 i 2. W związku z tym występują trzy fenotypowe warianty Hp 1-1, 1-2, 2-2 o zmniejszającym się powinowactwie do wolnej hemoglobiny. Jej poziom w surowicy jest dosyć wysoki i wpływa na wysokość piku α_2 rozdziału elektroforetycznego. Wiąże ona nieodwracalnie wolną hemoglobinę. Powstały kompleks jest szybko fagocytowany i rozkładany w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego śledziony i wątroby. Hp zabezpiecza w ten sposób nerki przed kontaktem z wolną hemoglobiną i oszczędza żelazo. Całkowita pojemność wiązania hemoglobiny przez ustrojową pulę Hp wynosi około 3 g, co odpowiada hemolizie 20 ml krwi. Dlatego przy ostrej i szybko przebiegającej hemolizie może ona zniknąć całkowicie z surowicy. W rozdziale elektroforetycznym pojawia się obniżenie piku α_2 (ryc. 2.1). W moczu pojawia się wówczas hemoglobina wolna. Poziom Hp wraca do normy zwykle po 7 dniach po incydencie hemolitycznym. W stanach zapalnych poziom Hp wzrasta w ciągu 2-3 dni do wartości wielokrotnie przekraczających górny zakres wartości referencyjnych (ryc. 2.5), a do normy wraca po siedmiu dniach od ustąpienia zmian zapalnych.

2.6.2.4. Ceruloplazmina (CP)

Ceruloplazmina jest dużym monomerycznym białkiem o mcz. 160kDa, produktem genu *CP*, zlokalizowanego w chromosomie 3q23-q24. Ma ona mobilność elektroforetyczną $\alpha_1 - \alpha_2$, jednak ze względu na niskie stężenie nie wpływa na obraz rozdziału elektroforetycznego. Zawiera ona około 70% miedzi surowicy, pozostałe 30% w równym stopniu wiąże albumina i mikroglobuliny. Pojedynczy łańcuch CP wiąże 6 atomów miedzi w swoim centrum aktywnym. CP jest oksydazą żelazawą (EC 1.16.3.2, ferroxidase) katalizującą utlenienie Fe^{2+} do Fe^{3+} , co umożliwia jego wiązanie z transferryną i transport do tkanek. Dzięki temu pełni ona również rolę przeciwoksydacyjną, ochraniając tkanki podczas ostrej fazy. Nie odgrywa ona jednak istotnej roli w transporcie miedzi.

Miedź do syntezy CP jest dostarczana do wątroby przez albuminę, gdzie łączy się z apoproteiną CP. Wzrost wchłaniania miedzi w jelitach zwiększa syntezę CP.

Niski poziom CP (<0,1 g/L) i wysokie stężenie wolnej miedzi (dializowanej) są charakterystycznymi markerami choroby Wilsona. Ta rzadka uwarunkowana genetycznie choroba o autosomalnym, recesywnym torze dziedziczenia występuje z częstością 1-4:100000, a nosicielstwo jednej kopii zmutowanego genu 1:100. Jest spowodowana defektem genu kodującego białko ATP-azy ATP7B transportującej miedź z hepatocytów do krwi. Wskutek tego dochodzi do uszkodzenia tkanek takich jak wątroba (marskość), mózg (zwyrodnienie soczewkowate, *ataxia*), nerki (kwasica cewkowa), serce (arytmia, *cardiomiopatia*) i oczy (zaćma, pierścienie Kaiser-Fleischer) przez akumulującą się w nich miedź. Uszkodzona wątroba nie wytwarza odpowiedniej ilości apoceruloplazminy. Niski, wtórnie obniżony poziom CP towarzyszy również niedoborom białkowym w zespole nerczycowym i enteropatiach.

Wtórny, genetycznie uwarunkowany niedobór CP spotyka się w bardzo rzadkiej chorobie Menkesa, spowodowanej niedoborem miedzi wskutek defektu genu ATP-azy ATP7A transportującej ją przez barierę jelitową. Opisano również pojedyncze przypadki genetycznie uwarunkowanego braku CP (aceruloplazminemia), Jest to wynik defektu genu *CP* o recesywnym torze dziedziczenia. Powoduje on ciężkie zaburzenia metabolizmu żelaza prowadzące do hemochromatozy, hiperferrytynemii, i hipotransferytynemii oraz neurodegeneracji.

Poziom CP ulega podwyższeniu w ciąży, u kobiet stosujących doustne środki antykoncepcyjne, dając charakterystyczne zielonkawe zabarwienie surowicy. Wzrasta on również w ostrych i przelekłych stanach zapalnych, chorobie Alzheimera, schizofrenii oraz reumatycznym zapaleniu stawów.

2.6.2.5. Fibrynogen (FIB)

Fibrynogen jest dużym białkiem, o m.cz. 340 kDa zbudowanym z dwóch podjednostek zbudowanych z łańcuchów α , β , γ tworzących strukturę fibrylarną. Łańcuchy są kodowane przez 3 geny *FGA*, *FGB* i *FGG* znajdującymi się w chromosomie 4q28. Jego funkcja i zastosowanie w diagnostyce zaburzeń krzepnięcia została omówiona w innym miejscu (tom 1, rozdz. 9). Po wystąpieniu ostrego stanu zapalnego następuje początkowo nieznaczny spadek FIB wskutek wzmożonego zużycia, po czym jego poziom znacznie wzrasta (ryc. 2.5). Najwyższe stężenia FIB sięgające 15 g/L obserwuje się w rozrostowym zapaleniu kłębków nerkowych., przy jednoczesnym obniżeniu poziomu białek drobnocząsteczkowych, wskutek ich utraty z moczem.

2.6.2.6. Białko C-reaktywne (CRP)

CRP jest homopentamerem o masie cząsteczkowej około 110 kDa, należącym do rodziny pentraksyn. Do tej rodziny należą również – surowiczy amyloid P i petraksyna 3. Podjednostka CRP jest produktem genu CRP zlokalizowanego w chromosomie 1q21-q23. Nazwa białka pochodzi od jego zdolności wiązania komponenty polisacharydowej C ściany komórkowej *Pneumococcus pneumoniae*. Jego synteza w wątrobie jest stymulowana przez interleukinę 6. Po związaniu z fragmentami bakterii, pasożytów lub komórek własnych czy też przeciwciałami, aktywuje on klasyczną drogę aktywacji układu dopełniacza (tom II, rozdz. 2.6.2.9). W ten sposób CRP rozpoczyna procesy opsonizacji i lizy obcych czy też własnych uszkodzonych komórek, stanowiąc ważny element obrony nieswoistej. Zakres jego wartości referencyjnych w surowicy jest w granicach od 0 do 10 mg/L. Jednakże rozkład stężeń CRP w tym zakresie jest log-normalny, prawo-skośny z wartością modalną poniżej 1,0 mg/L. W sumie u ponad 50% ludzi zdrowych stwierdza się stężenie niższe od 1 mg/L, a u 75% poniżej 3 mg/L. Stężenia CRP w surowicy powyżej tego poziomu (>75 percentyla) stanowią niezależny czynnik zwiększający ponad 4-krotnie ryzyko rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Odzwierciedla on obecność w organizmie subklinicznych stanów zapalnych, związanych z otyłością, czy też reakcjami autoimmunizacyjnymi i degeneracyjnymi. Wartości powyżej 10 mg/L są patognomiczne dla ogniskowych zmian zapalnych. W miarę uogólniania i nasilania stanu zapalnego stężenie CRP może wzrastać do wartości przekraczających 1000 razy górny zakres wartości referencyjnych. W takich sytuacjach CRP może dawać dodatkowy prążek w proteinogramie zlokalizowany między frakcjami β - oraz γ -globulinowymi. Szczególnie silną reakcję wywołują zakażenia bakteryjne (pneumokoki, paciorkowce). Zakażenia wirusowe dają względnie słabą reakcję ze strony tego białka. Odpowiedź na urazy mechaniczne, cieplne, chemiczne i ischemiczne zależy od ich rozległości. Poziom CRP zaczyna wzrastać w ciągu kilku godzin od wystąpienia bodźca zapalnego osiągając szczyt po 48 godzinach (ryc. 2.5). W niektórych przypadkach wyprzedza on wystąpienie objawów klinicznych. Stała obserwacja poziomu CRP może być użyteczna w monitorowaniu zakażeń pojawiających się u chorych na toczeń rumieniowaty, białaczki i inne choroby układowe. Wzrost CRP wyprzedza o kilkanaście godzin kliniczne objawy odrzucenia przeszczepów narządowych z wyjątkiem wątroby. Wysokie stężenie tego białka we krwi pępowinowej świadczy o zakażeniu wewnątrzmacicznym noworodka. Ze względu na dużą dynamikę ostrych zakażeń i reakcji zapalnych, CRP powinno być oznaczane w trybie pilnym.

Sugerowano zastąpienie OB. oznaczaniem CRP. Jednakże w wielu przypadkach wzrostowi OB. nie towarzyszy wzrost CRP i odwrotnie.

2.6.2.7. Surowiczy amyloid A (SAA)

SAA należy rodziny apolipoprotein, o pojedynczym łańcuchu białkowym i o masie cząsteczkowej około 12 kDa. Wszystkie izoformy SAA-1, -2 oraz -3 są produktami genu *SAA1* zlokalizowanego w chromosomie 11 p 15.1. Głównym miejscem syntezy są hepatocyty. W stanach zapalnych SAA produkują pobudzone makrofagi i fibroblasty. Pod wpływem stanów zapalnych poziom SAA może wzrosnąć od wartości referencyjnych 0-10 mg/L do wartości 100-1000 razy wyższych. Przy wysokich poziomach białko to może tworzyć heksametryczne agregaty, powodujące amyloidozę narządów wewnętrznych takich jak nerki, wątroba i śledziona. W osoczu SAA wiąże się z frakcją HDL, w szczególności z HDL₃. Przy wysokich stężeniach SAA wypiera z HDL apolipoproteinę A₁, powodując utratę przez te cząstki aktywności przeciwmiażdżycowej. W odróżnieniu od CRP, poziom SAA wzrasta już przy średnio-ciężkich infekcjach wirusowych. Ponad dwie trzecie ludzi z pospolitym przeziębieniem wykazuje wzrost SAA. W infekcjach bakteryjnych bezwzględny wzrost SAA jest zwykle wyższy, chociaż nieco wolniejszy niż w przypadku CRP. W uogólnionych chorobach nowotworowych poziomy SAA są z reguły wyższe niż w ograniczonych stadiach tych chorób.

SAA wykazuje również podwyższone poziomy w chorobach przewlekłych takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, gruźlica, trąd. SAA jest uważany za czuły marker odrzucenia przeszczepu. W przypadku reakcji odrzutu przeszczepionej nerki czułość diagnostyczna sięga 97%. Stopień wzrostu SAA pozwala przewidzieć szanse zatrzymania reakcji odrzucenia. Natomiast tocen rumieniowaty i wrzodziejące zapalenie jelit nie podwyższają poziomu SAA. Powszechne stosowanie tego testu utrudnia brak jednolitego materiału standaryzacyjnego.

2.6.2.8. Proteinogram ostrej fazy

Wysokie stężenia cytokin prozapalnych powodują uszkodzenia śródbłonna naczyń włosowatych, co powoduje redystrybucję albuminy i A1AT do przestrzeni śródmiąższowej i hipalbuminemię. Zwiększona przepuszczalność naczyń kłębków nerkowych skutkuje powstaniem przejściowego białkomoczu gorączkowego. W surowicy wzrost A1AT, HP powoduje wzrost frakcji α_1 i α_2 (ryc. 2.2 A), a przy kilkudziesięciokrotnym zwiększeniu poziomu CRP może pojawiać się dodatkowe pasmo w obrębie anodowej części frakcji gamma-globulin.

2.6.2.9. Białka układu dopełniacza

Białka układu dopełniacza stanowią pierwotny system obrony nieswoistej organizmu. W jego skład wchodzi 35 białek wydzielniczych i błonowych, stanowiących zarówno substraty jak i regulatory tego układu. W tej grupie białkami ostrej fazy są syntetyzowane w wątrobie: czynnik B i składnik C3 dopełniacza, których poziom wzrasta pod wpływem interleukin 1 i 6 oraz czynnika martwicy nowotworów. Kaskadę układu dopełniacza aktywują kompleksy immunologiczne, błony i białka bakteryjne, wirusy, błony pochodzące z własnych komórek. Aktywacja odbywa się poprzez uporządkowaną proteolizę kolejnych białek układu, które tworzą wielocząsteczkowe kompleksy antygeny i zmodyfikowanych białek dopełniacza. Kompleksy te wiążą się ze specyficznymi receptorami błonowymi makrofagów i komórek układu immunologicznego. Dzięki temu możliwa jest fagocytoza i liza zakażających ustroj organizmów i innych antygenów rozpoznawanych jako obce. Podobnie jak białka układu krzepnięcia natywne białka układu dopełniacza pozostają nieaktywne. Dopiero wymienione wyżej czynniki powodują ich aktywację.

Istnieją trzy drogi aktywacji dopełniacza: klasyczna, alternatywna i lektynowa (ryc. 2.6). Składnik C3 dopełniacza jest kluczowym elementem wszystkich dróg jego aktywacji. Jednakże jego wzrost w reakcji ostrej fazy jest stosunkowo niewielki i niepowtarzalny, ze względu na jego szybkie zużycie.

2.6.2.9.1. Droga klasyczna

Aktywatorami drogi klasycznej są zmodyfikowane wiązanie z antygenem immunoglobuliny G, A lub/i M, oraz z CRP. Wiążą się one z podjednostką C1q o strukturze heksametrycznej, zwiększając jej powinowactwo do podjednostki C1r, co ujawnia jej aktywność proteazy serynowej. Ta z kolei poprzez proteolizę ujawnia aktywność proteolityczną podjednostki C1s, która była pod kontrolą inhibitora C1 (ryc. 2. 6). Do kompleksu dołączają jednostki C2 i C4, które przez proteazę C1 są przekształcane w aktywne formy C4b i C2a. Poprzez połączenie z aktywnym białkiem 3b, tworzą one aktywny kompleks C4bC2aC3b, który jest konwertazą C5. W wyniku odszczepienia peptydu C5a (17 kDa) powstaje aktywny składnik C5b. Opisana reakcja aktywacji do zachodzi na powierzchni czynnika aktywującego. Inne peptydy C3a i C5a są uwalniane do środowiska. Na tym etapie kończy się droga aktywacji dopełniacza.

2.6.2.9.2. Droga alternatywna

Droga alternatywna jest aktywowana bez udziału przeciwciał przez polisacharydy ścian bakterii gram dodatnich i ujemnych, wirusy, komórki zarażone wirusami jak również grzyby, pierwotniaki, robaki i niektóre komórki nowotworowe, jak również kompleksy immunologiczne zawierające IgG, IgA i IgE. W chwili obecnej uważa się, że aktywacja zachodzi spontanicznie (1% puli

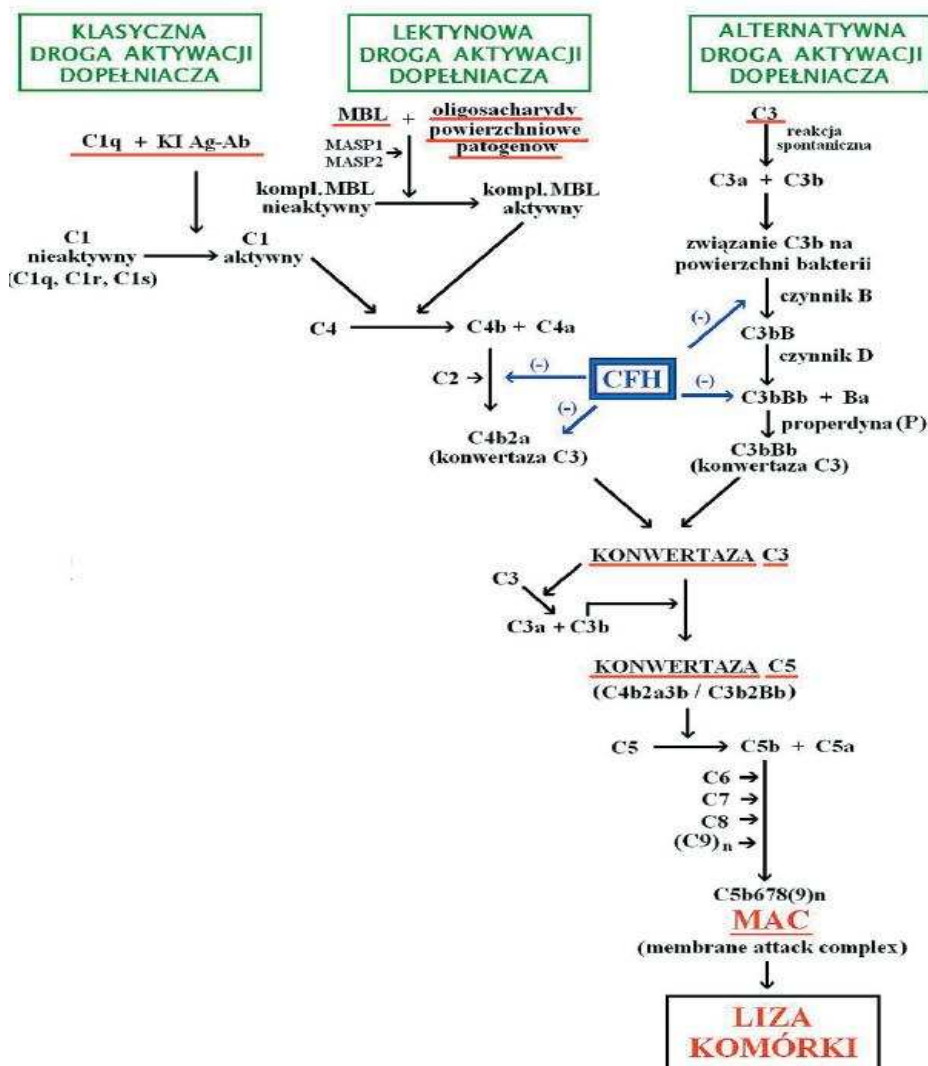
C3/godz.) na określonych powierzchniach i wynika z braku specyficznych inhibitorów. Spontaniczna hydroliza wiązania tioestrowego w C3 i powstanie C3(H₂O) powoduje związanie z nim białka B (ryc. 2.6). Dzięki immobilizacji czynnik B staje się dostępny dla zawsze aktywnego czynnika D, który katalizuje reakcję jego proteolizy do aktywnego czynnika proteazy Bb. Ta łącząc się z czynnikiem C3b powoduje powstanie aktywnego kompleksu C3bBb mającej aktywność konwertazy C3. Enzym ten jest aktywowany przez properdynę. Poprzez przyłączenie drugiej cząsteczki C3b powstaje kompleks C3bBbC3b, który tak jak w drodze klasycznej, ma również aktywność konwertazy C5.

2.6.2.9.3. Droga pektynowa

Drogę lektynową aktywuje białko wiążące mannozę (lektyna, *mannose binding lectin* – MBL). Należy ono do grupy białek składowych surfaktantu dróg oddechowych – kolektyn, zdolnych do wiązania sacharydów (fukoza, mannoza, N-acetylo-glukozamina) będących składnikiem ścian wielu bakterii. Jego struktura przypomina składnik C1q. Po związaniu sacharydów do kompleksu przyłączają się proteazy serynowe MASP-1 i 2. W wyniku aktywacji MASP-1 zyskuje zdolność proteolizy C2 i C4, a MASP-1 C2 i C3, w efekcie powstaje kompleks konwertazy C5.

Tak więc kluczowym elementem wszystkich dróg aktywacji dopełniacza jest powstanie aktywnych pochodnych składnika C3, które uruchamiają bezpośrednie mechanizmy obrony nieswoistej. Czynniki C5b przyłącza kolejno C6, C7, C8 i C9 tworząc duży kompleks atakujący błony o m.cz. do 1700 kDa (MAC, Membrane Attack Complex).

Składa się on z pojedynczych białek C5-8 oraz kilku do kilkunastu C9. Kompleks ten tworzy w atakowanej błonie komórkowej kanały o wysokiej przepuszczalności, przez które wypływają jony potasowe, makrocząsteczki i ATP a wpływają jony sodowe i wapniowe. Do zabicia jednej bakterii potrzebne jest wbudowanie w jej ścianę kilkudziesięciu do kilkuset cząstek MAC.



Ryc. 2.6. Drogi aktywacji dopełniacza (Klaska i Nowak, 2007)

Aktywny składnik C3b wykazuje również aktywność opsoninową, podobnie jak CRP, SAA czy kolektyny (ryc. 2.6). Natomiast, niewielkie peptydy C3a, C4a i C5a, produkty aktywacji natywnych białek, są mediatorami reakcji zapalnych oraz mobilizują makrofagi.

Białka dopełniacza mogą również wiązać się z kompleksami immunologicznymi związanymi z powierzchnią różnych komórek. Dochodzi wówczas do chemotaksji leukocytów, których aktywność (elastaza, peroksydaza) niszczy uczulone przeciwciałami własne komórki organizmu. Mechanizm taki ma

miejsce w kłębowym zapaleniu nerek, gośćcowym zapaleniu stawów, zapaleniu tętnic, toczniu rumieniowatym i niedokrwistościach immunohemolitycznych.

2.6.2.9.4. Składnik C3

Białko C3 jest homodimerem o m.cz. 185 kDa. Jego poziom w surowicy jest najwyższy spośród wszystkich białek układu dopełniacza. Ma on mobilność β_2 i jest głównym białkiem tej frakcji, uwidaczniającym się jedynie w świeżej surowicy (ryc. 2.1). Stężenie C3 wzrasta powoli i w nieznacznym stopniu w różnych stanach zapalnych wskutek równoczesnego przyspieszonego zużycia. Natomiast stosunkowo częste są stany hipokomplementemii C3/C4 spowodowanej powstawaniem kompleksów immunologicznych takich jak: toczeń rumieniowaty układowy, lub indukowany przez leki, choroby nerek (zapalenia kłębków nerkowych samoistne błoniasto-rozplemowe, poinfekcyjne, w przewlekłych zakażeniach), reumatoidalne zapalenie stawów, wrodzone niedobory immunoglobulin, chyba Graves-Basedow, choroby wątroby, AIDS, szpiczak mnogi). Nadmierne zużycie i hipokomplementemia bez kompleksów immunologicznych występują niekiedy w chorobie zatorowo-zakrzepowej, zespole hemolityczno-mocznicowym, sepsie, ostrym zapaleniu trzustki, zespole nerczycowym, zawale mięśnia sercowego, oparzeniach, po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych itp.

Spośród wrodzonych niedoborów białek tego układu najczęściej występują niedobory C2, rzadziej defekty inhibitora esterazy C1 oraz białek C1 i C4.

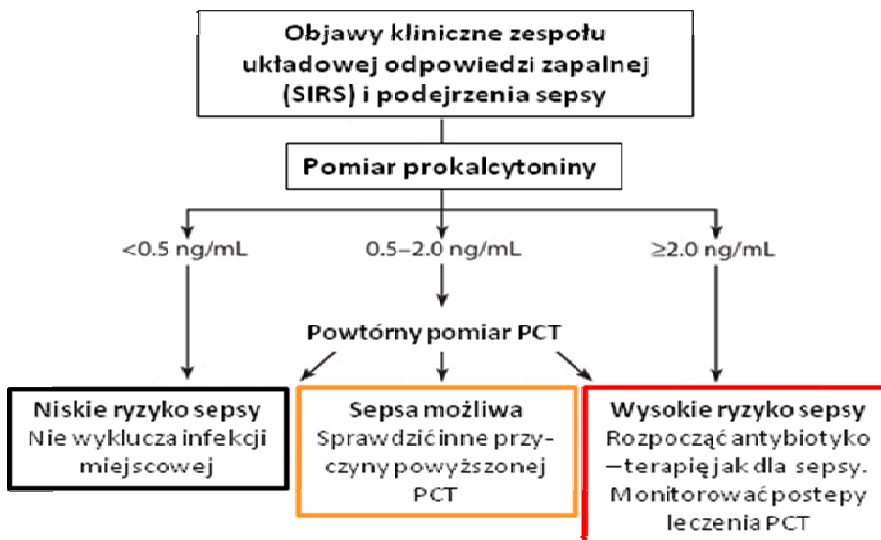
2.6.3. Białka związane z ostrymi uszkodzeniami narządowymi.

Bezpośrednie działanie patogenów pojawiających się we krwi w różnych patologiach może powodować rozpad/uszkodzenie lub pobudzenie komórek, które uwalniają bądź wydzielają białka specyficzne dla różnego rodzaju tkanek. Dzięki temu mogą być one używane w diagnostyce różnicowej różnych patologii narządowych.

2.6.3.1. Prokalcytonina (PCT)

PCT należy do grupy pokrewnych białek takich jak amylina, adrenomedulina i kalcytonina. Jest peptydem zbudowanym ze 116 aminokwasów i aminokwasów o m.cz. 13 kDa, odpornym na proteolizę (czas półtrwania powyżej 20 godz.). Jest ona produktem genu *CALC-1* znajdującego się w chromosomie 11. Jest ona syntetyzowana i wydzielana przez rozproszone komórki endokrynne płuc i jelit w odpowiedzi na pojawiające się w krążeniu antygeny bakteryjne. PCT w surowicy jest odporna na degradację i proteolizę.

Wzrost następuje w około 4 godziny od pojawienia się antygenów bakteryjnych w krążeniu i osiąga maksimum w 8 godzinie. Jego wzrost jest szybszy niż CRP. Za prawidłowe uważa się wartości $<0,5 \mu\text{g/L}$. Wielkość wzrostu PCT zależy od ciężkości zakażenia i ma znaczenie rokownicze (ryc. 2.7). W bakteryjnych zapaleniach płuc (zespół niewydolności oddechowej), grzybicach układowych PCT może wzrosnąć do $10 \mu\text{g/L}$, we wstrząsie i zespole uogólnionej odpowiedzi zapalnej do $2 \mu\text{g/L}$, a w zespole niewydolności wielonarządowej na tle sepsy nawet do $100 \mu\text{g/L}$.



Ryc. 2.7. Prokalcytonina jako wskaźnik uogólnionej odpowiedzi zapalnej i sepsy

Kolejne oznaczenie PCT mogą służyć monitorowaniu skuteczności leczenia. PCT w surowicy nie wzrasta w zakażeniach wirusowych, przewlekłych stanach zapalnych, chorobach autoimmunologicznych, przy odrzuceniu przeszczepu, jak również w zespołach o etiologii toksycznej. Stąd może być przydatna w diagnostyce różnicowej infekcyjnych i toksycznych ostrych zapaleń trzustki; bakteryjnych i wirusowych zapaleń opon mózgowych czy też niemowlęcych biegunek na tle wirusowym i bakteryjnym.

2.6.3.2. Chymotrypsyno-podobna elastaza 3B (CELA3B, chymotrypsin-like elastase family member 3B, proteaza E, dawniej elastaza 1)

CELA3B jest specyficzną dla trzustki proteazą serynową wydzielaną do soku trzustkowego, kodowaną przez gen *CELA3B* w chromosomie 1. Odpowiada ona wcześniejszym doniesieniom dotyczącym trzustkowej elastazy 1. Wiadomo obecnie, że elastaza 1 jest syntetyzowana nie w trzustce, lecz w keratynocytach skóry. CELA3B jest jednym z 5 białek należących do rodziny elastaz

chomotrypsyno-podobnych, wyjątkowo opornych na trawienie. W związku z tym może być oznaczana w kale, jako wskaźnik egzokrynnej czynności trzustki. Jest przydatnym wskaźnikiem obecności trzustkowych enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym przydatny w diagnozowaniu zwyrodnienia włóknisto-torbielowatego (*mucoviscidosis*), oraz niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki w trakcie i po zejściu zapalenia trzustki, wieloletniej cukrzycy czy też po zabiegach operacyjnych na tym narządzie. Prawidłowa zawartości CELA3B wynosi 0,2 mg/kg kału. Przy średnio-ciężkiej lub lekkiej niewydolności trzustki jej poziom wynosi 0,1-0,2 mg/kg, a przy ciężkiej spada poniżej 0,1 mg/kg kału. Natomiast poziom CELA3B w osoczu (wartości referencyjne <3,5 µg/L surowicy) jest specyficznym wskaźnikiem zapalenia trzustki, niedrożności przewodów trzustkowych lub wspólnego przewodu wątrobowo-trzustkowego. Jest użytecznym narzędziem w rozpoznaniu różnicowym zapalenia trzustki lub przy potwierdzaniu przebytego rzutu ostrego zapalenia trzustki.

2.6.3.3. Kalprotektyna (S100A8/A9)

Kalprotektyna jest białkiem wiążącym niezależnie wapń i cynk, heterotrimerem o m.c. 36 kDa, produktem genu *S100A8/A9* zlokalizowanego w chromosomie 1q21. Jest ona syntetyzowana w dużych ilościach przez zaktywowane granulocyty obojętnochłonne, w których stanowi 60% ich białek cytoplazmatycznych. Wiązanie cynku przez kalprotektynę hamuje aktywność innych metaloproteinaz (również bakteryjnych) zależnych od tego metalu. Dzięki temu białko to wykazuje aktywność przeciwbakteryjną i spełnia rolę przeciwzapalną, antyproliferacyjną i pro-apoptotyczną. Kalprotektyna jest wydzielana do światła zapalnie zmienionego jelita przez infiltrujące jego ścianę granulocyty i monocyty (makrofagi), jak również przez same enterocyty. Jest odporna na proteolizę. Wartości referencyjne dla kału są poniżej 10 mg/kg kału. Poziom kalprotektyny w kale wzrasta do kilkuset razy w chorobie Crohna-Leśniowskiego i wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (czułość~100%) oraz w rakach (czułość 90%) i polipach (czułość 70%) przewodu pokarmowego. Badanie to z niemal 100% czułością różnicuje te choroby z przypadkami zespołu jelita drażliwego. W tym ostatnim zespole poziom kalprotektyny nie wzrasta. Oznaczenie kalprotektyny w kale, jako metoda nieinwazyjna jest szczególnie przydatna w diagnostyce różnicowej tych chorób u dzieci. Pozwala bowiem uniknąć badania kolonoskopowego, i związanego z tym znieczulenia ogólnego. Poziom kalprotektyny w kale jest czulszym niż krew utajona wskaźnikiem raków i stanów przedrakowych przewodu pokarmowego.

Poziom kalprotektyny w osoczu również wzrasta od 4-50 razy w różnych chorobach infekcyjnych i zapalnych. Jest ona jednak mniej czułym markerem tych stanów niż CRP i SAA.

2.6.3.4. Pro-adrenomedulina (proADM)

Adrenomedulina (ADM) jest peptydem zbudowanym z 52 aminokwasów o silnym działaniu wazodylatacyjnym oraz immunomodulacyjnym i przeciwbakteryjnym. Pełni ona rolę regulacyjną w regulacji przepływu krwi w krążeniu płucnym. Jest ona kodowana przez gen E1 w chromosomie 11 i produkowana w rdzeniu nadnerczy, przedsionkach serca, nerkach, mózgu i innych tkankach. ADM jest szybko usuwana z krążenia, co powoduje niestabilność jej poziomu w osoczu. Dlatego bardziej praktyczne jest oznaczanie poziomu prekursora – proADM, który degraduje się dużo wolniej. Poziom proADM wzrasta wielokrotnie w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, poza szpitalnym zapaleniu płuc, zespole uogólnionej reakcji zapalnej, sepsie jak również w zawale mięśnia sercowego. Wzrost poziomu proADM w każdej z tych patologii wskazuje na gorsze rokowanie. Na przykład, poziom proADM u chorych, którzy zmarli z powodu sepsy był średnio 4 razy wyższy niż u tych, którzy przeżyli to powikłanie. Również u chorych z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc i poziomami proADM powyżej wartości mediany, śmiertelność w 2-letnim okresie była dwa razy wyższa niż chorych z niskimi poziomami tego peptydu.

2.6.3.5. Ciężowe białko osocza A (PAPP-A)

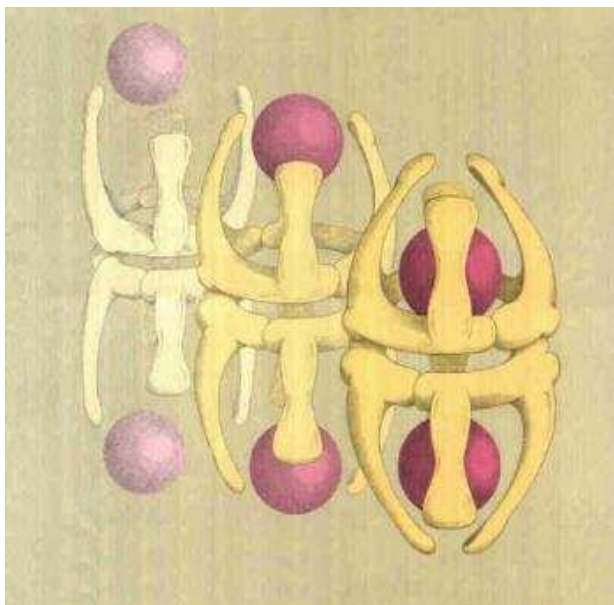
PAPP-A jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 200 kDa. Białko to jest wytwarzane przez łożysko oraz inne komórki nie pochodzące z łożyska takie jak fibroblasty skóry czy osteoblasty. U ciężarnych kobiet PAPP-A występuje w osoczu jako heterotetramer, złożony z dwóch podjednostek PAPP-A związanych kowalencyjnie z dwoma podjednostkami prekursora głównego białka zasadowego eozynofilów (pro MBP). PAPP-A jest swoistą proteazą, białka wiążącego insulinowy czynnik wzrostu (IGF), który odgrywa ważną rolę w procesie różnicowania i proliferacji komórek w wielu procesach biologicznych. U kobiet w ciąży oznaczanie tego białka w postaci heterotetrameru służy jako badanie przesiewowe wykrywania zespołu Downa u płodu.

Przypuszcza się również, że wydzielane przez makrofagi PAPP-A może uczestniczyć w degradacji substancji międzykomórkowej blaszki miażdżycowej, powodując osłabienie jej pokrywy włóknistej. Stwierdzono zwiększoną ekspresję PAPP-A w pękniętych i uszkodzonych blaszkach miażdżycowych pacjentów, u których nastąpiła śmierć sercowa.

2.7. Inne białka indywidualne osocza

2.7.1. Alfa₂-makroglobulina (AMG)

AMG jest dużym białkiem (m.cz. 800 kDa), syntetyzowanym w wątrobie jako produkt genu *A2M* w chromosomie 12p13.31. Stanowi ono około 30% białek frakcji α_2 i jest drugim po A1AT inhibitorem proteaz takich jak tripsyna, chymotrypsyna, trombina, plazmina i kallikreina.



Ryc. 2.8. Schematyczny opis mechanizmu pułapkowania enzymów przez α_2 -makroglobulinę. Szkielet inhibitora (żółty); pułapkowy enzym (różowy). Szczegółowy opis w tekście. Rycina pochodzi z <http://www.biomac.de/enghome.htm>.

Atak tych proteaz powoduje ich nieodwracalne wiązanie z AMG. Powstały kompleks jest w ciągu kilku minut usuwany z krążenia przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego. Zmiany poziomu AMG w większości chorób są niewielkie, co przy szerokim zakresie wartości referencyjnych (tabela 2.7) ogranicza jego zastosowanie diagnostyczne. Ze względu na dużą masę cząsteczkową AMG praktycznie nie wychodzi poza naczynia. Dlatego jego poziom wzrasta nawet ośmiokrotnie w przebiegu zespołu nerczycowego. W tej patologii zwiększona utrata białek o względnie małej masie cząsteczkowej z moczem, takich jak albumina powoduje obniżenie ciśnienia onkotycznego. Hipoalbuminemia, poprzez aktywację onkoreceptorów, stymuluje nieselektywnie syntezę białek w wątrobie. Powoduje to charakterystyczny wzrost frakcji alfa₂ w rozdziale elektroforetycznym wynikający ze wzrostu stężenia AMG (ryc. 2.1).

Stężenia AMG w moczu są bardzo niskie, lecz mogą wzrastać wielokrotnie przy krwawieniach do dróg moczowych o różnej etiologii. Pozwala to na różnicowanie przypadków hematurii (erytrocyturii) pochodzenia kłębowego i pozanerkowego.

2.7.2. *Transferyna (TF)*

TF (m.c.z. 77 kDa) jest monomeryczną glikoproteiną, o mobilności elektroforetycznej β_1 , posiadającą dwie domeny wiążące jony Fe^{3+} . Transportuje ona Fe do szpiku kostnego. Jest ona produktem genu *TF* znajdującego się w chromosomie 3q21. Jej synteza zachodzi głównie w wątrobie, mniejszym stopniu w układzie siateczkowo-śródbłonkowym, jajnikach i jądrach. Wysoki poziom TF stwierdza się w anemiach z niedoboru żelaza. Oprócz tego poziom TF zmienia się podobnie jak stężenie albuminy ulegając obniżeniu w stanach zapalnych, chorobach nowotworowych, przewlekłych chorobach wątroby, zespole nerczycowych, niedożywieniu oraz enteropatiach. Podwyższony poziom TF obserwuje się z ciąży i terapii estrogenowej jak również w stanach niedoboru żelaza. Te ostatnie mogą powodować podwyższenie frakcji β_1 w rozdziale elektroforetycznym.

TF posiada dwa łańcuchy glikozyłowe zawierające 4 reszty kwasu sialowego. U ludzi zdrowych, w zależności od metody stwierdza się 98-99 procentowy poziom glikozylacji TF. Spożywanie alkoholu w ilości większej niż 4-5 kieliszków dziennie przez dwa tygodnie powoduje proporcjonalny do dawki wzrost frakcji desialowanej transferyny (CDT, carbohydrate deficient transferrin) do 30-50%. W związku z tym oznaczanie frakcji TF wolnej od węglowodanów ma zastosowanie w monitorowaniu abstynencji alkoholowej. Im wyższa zawartość CDT tym dłuższy jest czas powrotu do normy. I tak przy 30% CDT jej poziom normalizuje się po ponad 4 tygodniach abstynencji. Około 1-2% ludzi posiada genetyczne odmiany TF o niskim stopniu glikozylacji.

Wszystkie komórki organizmu zawierają receptor transferynowy, który jest białkiem przezbłonowym. Wiąże on kompleks TF-Fe i transportuje go do wnętrza komórki. Zewnątrz komórkowa domena uwalniana w wyniku proteolitycznej degradacji przedostaje się do krążenia. Oznaczanie poziomu rozpuszczalnego receptora sTFR może być przydatne przy diagnostyce różnicowej niedokrwistości chorób przewlekłych i niedokrwistości z niedoboru żelaza. W jej ostatniej poziom sTFR wzrasta do 2-3 razy. Znaczny wzrost (10-krotny) obserwuje się w talasemiach, a 5-krotny w autoimmunologicznych anemiach hemolitycznych, sferocytozie wrodzonej i anemii sierpowatej, a nieco mniejszy w anemii megaloblastycznej. W chorobach przewlekłych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, inwazyjne nowotwory, poziom sTFR pozostaje bez zmian dopóki nie wystąpią niedobory żelaza.

2.7.3. Transtyretyna (TTR, prealbumina)

TTR jest homotetramerem (m. cz. 55 kDa) o prealbuminowej mobilności elektroforetycznej, transportującym tyroksynę i re tinal oraz produktem genu TTR, zlokalizowanego w chromosomie 18q11.2-q12.1. Jest ona drugim, po globulinie wiążącej hormony tarczycy, miejscem wiązania tyroksyny w osoczu. Białko to jest syntetyzowane głównie w wątrobie, lecz również w splocie naczyniowym jako składnik płynu mózgowo-rdzeniowego. TTR ma krótki – 2-4 dni, czas półtrwania w osoczu. W związku z oznaczaniem jej poziomu w surowicy służy jako marker stanu odżywienia. Do obniżenia poziomu TTR dochodzi znacznie szybciej niż do spadku poziomu albuminy w przypadkach niedożywienia i kacheksji, w przebiegu ciężkich stanów chorobowych takich jak: zaawansowane stadia chorób nowotworowych, alkoholizm, przewlekłe choroby nerek, wątroby, serca oraz przewodu pokarmowego. Jest ono wskaźnikiem prognostycznym w tych stanach jak również służy do monitorowania wyników leczenia żywieniowego (tabela 2.8).

Tabela 2.8. Znaczenie prognostyczno diagnostyczne TTR w stanach niedożywienia

Wartości referencyjne	Stopień niedożywienia/rokowanie		
	niski	umiarkowany	wysoki
150-350 mg/L	110-150 mg/L	50-109 mg/L	<50 mg/L
	Zwiększone ryzyko, monitorowanie co 2 tygodnie	Znaczne ryzyko, wskazane intensywne leczenie dietetyczne	Zła prognoza

W przebiegu różnych chorób przewlekłych oraz u ludzi w podeszłym wieku, monomery TTR mogą tworzyć fibrylarne złogi amyloidowe dając fenotypowy obraz amyloidozy narządowej lub amyloidozy układowej wieku podeszłego. Liczne mutacje oraz polimorfizmy genu TTR mogą również dawać produkty białkowe o zwiększonej predyspozycji do tworzenia złogów amyloidowych, powodujących rodzinną polineuropatię amyloidową lub kardiomiopatię amyloidową.

2.8. Immunoglobuliny

Immunoglobuliny (Ig) stanowią grupę białek o identycznej strukturze i olbrzymiej zmienności sekwencji aminokwasowych w swoich domenach zmiennych. Syntetyzowane są one przez limfocyty B w odpowiedzi na przedostające się do organizmu antygeny obce. Każdy antygen pobudza powstanie z nieodróżnionych komórek macierzystych szpiku kostnego specyficznej, odpowiadającej mu linii (klonu) limfocytów. Każda z tych linii

produkuje jeden rodzaj cząsteczek immunoglobulinowych zdolnych wiązać ten, a nie inny antygen. W zależności od rodzaju antygeny pobudzającego skład aminokwasowy zmiennych domen Ig może znacznie różnić się. Determinuje to różnice w specyficzności i sile wiązania (awidności) antygeny i odpowiadającej mu Ig. Wynikają z tego również różnice w ruchliwości elektroforetycznej Ig od katodowej strony elektroforetogramu do frakcji α_2 (ryc. 2.1).

2.8.1. Budowa, klasy i zmienność immunoglobulin

Podstawowy schemat budowy cząsteczki Ig jest podobny, niezależnie od klasy. Każda cząsteczka Ig jest hetero-tetramerem zbudowanym z 2 identycznych łańcuchów ciężkich (H – *heavy*) i 2 lekkich (L – *light*). Łańcuchy H i L są ze sobą połączone mostkami dwusiarczkowymi (ryc. 2.9). Od C-końcowej części łańcucha znajdują się trzy domeny stałe (CH1, CH2, CH3), a od N-końcowego 1 domena zmienna (VH). Łańcuch ciężkie IgM i IgE zawierają po 4 domeny stałe. Łańcuchy lekkie zbudowane są z dwóch domen: C końcowej stałej (CL – *constant light*) i L-końcowej (VL – *variable light*). Wiązania dwusiarczkowe między dwoma homologicznymi łańcuchami H znajdują się między domenami CH1 i CH2 w rejonie zawiasowym. Powoduje to rozgałęzienie N-końcowej części Ig nadając jej kształt litery Y (ryc. 2.9). C-końcowy fragment domeny CL wiąże się mostkiem dwusiarczkowym z C-końcem domeny CH1. Fragment C końcowy Ig zawiera domenę wiążącą dopełniacz C1q (Fc – *complement fragment*). N-końcowy rozgałęziony fragment Ig, zawiera miejsce(a) wiążące antygen (Fab – *antibody fragment*). Jego konformacja końca Fab Ig jest odwrotnym odbiciem konformacji antygeny wiązanego przez dane przeciwciało, przez co zapewnia specyficzność jego wiązania.

Istnieją dwie klasy łańcuchów lekkich wynikające z różnic w domenach CL. Geny kodujące łańcuchy κ znajdują się w chromosomie 2, a geny dla łańcuchów λ w chromosomie 22. Zmienność VL zapewnia przypadkowa rekombinacja 75 segmentów genowych kodujących segmenty V i 5 segmentów genowych kodujących segmenty J tej domeny. Daje to 375 możliwych kombinacji łańcuchów lekkich w każdej klasie.

Istnieje 5 klas Ig determinowanych przez istnienie 5 rodzajów łańcuchów ciężkich: α , β , γ_{1-4} , δ , ϵ i μ w zależności od różnic w składzie aminokwasowym domen CH. Są to:

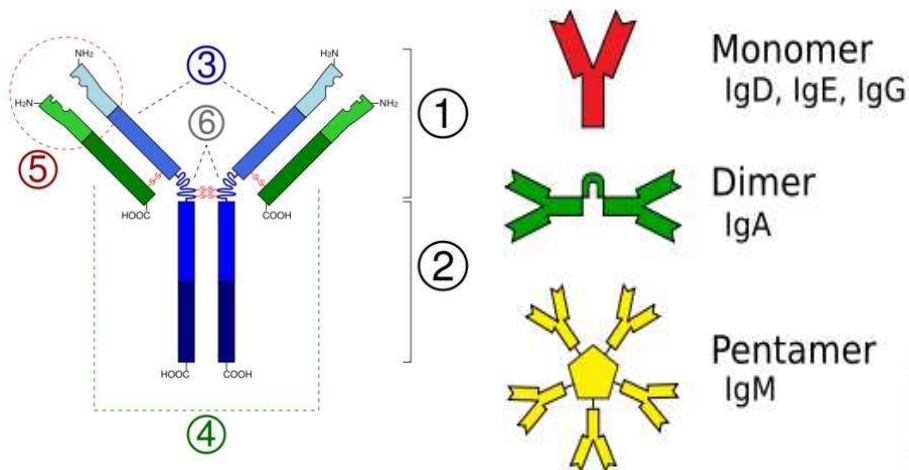
- IgG (γ) (w czterech subklasach: IgG₁~60%, IgG₂ ~ 30%, IgG₃ ~4%, IgG₄ ~ 6%)
- IgA (α , w dwóch subklasach: IgA₁ ~ 90% i IgA₂ ~ 10%),
- IgD (δ),
- IgE (ϵ)
- IgM (μ).

Zmienność łańcuchów ciężkich determinuje przypadkowa rekombinacja kilkuset segmentów genowych *V*, 23 *D* i 9 *J*, znajdujących się w długim ramieniu chromosomu 14. Pozwala to na powstanie 9.5 miliona możliwych kombinacji. Zmienność kodowanych przeciwciał zwiększają dodatkowo delecje (do 20 nukleotydów) i insercje (1-15 nowych nukleotydów) powstające w trakcie formowania złączy pomiędzy segmentami genowymi *V/D* i *D/J*, mutacje somatyczne oraz dowolne łączenie z łańcuchami *L*. Niektóre segmenty genów *V* i *D* są polimorficzne. 35 segmentów *V* i kilka *D* znajduje się poza głównym *locus* w chromosomach 15 i 16 i prawdopodobnie nie są wykorzystywane w formowaniu przeciwciał. W sumie teoretyczna liczba indywidualnych przeciwciał jest rzędu 10^{10} - 10^{11} . W rzeczywistości organizm człowieka może wytworzyć 10^7 - 10^8 wariantów przeciwciał. Różnice osobnicze w składzie podjednostkowym genów *Ig* decydują o zróżnicowanej indywidualnie wrażliwości ludzi na choroby zakaźne, zakażenia, choroby autoimmunologiczne itp.

2.8.2. *Właściwości klas immunoglobulin*

2.8.2.1. *IgG*

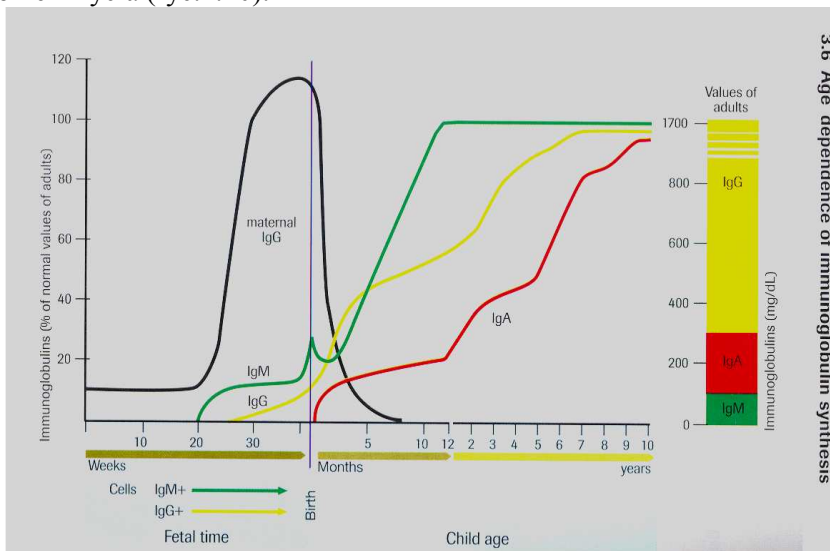
IgG (m.c. 150 kDa) stanowią największą część *Ig* osocza, ich czas półtrwania w osoczu wynosi około 21 dni. Są one wytwarzane przez plazmocyty szpiku kostnego, węzłów limfatycznych i śledziony w odpowiedzi na pojawienie się w płynach ustrojowych bakterii, wirusów, grzybów i innych drobno czy też wielkokształtecznych związków mających własności antygenowe. W ciągu kilku tygodni dochodzi do selekcji klonów limfocytów/plazmocytów syntetyzujących reagujące z nimi przeciwciało/a. Na ogół antygen ma wiele domen (wielowartościowość), przeciw którym powstaje kilka/kilkanaście przeciwciał o różnej swoistości. Jest to odpornościowa poliklonalna reakcja immunologiczna. Powstałe przeciwciała stają się elementem specyficznej nabytej odporności humoralnej.



Ryc. 2.9. Schemat budowy przeciwciał

1 – fragment Fab; 2 – fragment Fc; 3 – łańcuch ciężki (zawiera VH, CH1, zawiera regiony CH2 i CH3; licząc od N-końca); 4 – łańcuch lekki (zawiera regiony VL i CL; licząc od N-końca); 5 – miejsce wiązania antygeny; 6 – regiony zawiasowe; S-S – oznacza mostki dwusiarczkowe.

Noworodek rodzi się z IgG które przedostały się przez łożysko matki w ostatnich tygodniach ciąży. Zanikają one stopniowo do trzeciego miesiąca życia. Równocześnie kolejne ekspozycje dziecka na różne antygeny i patogeny, aktywują powstawanie własnych poliklonalnych przeciwciał klasy IgG, które osiągają poziom zbliżony do wartości spotykanych u ludzi dorosłych między 4 a 7 rokiem życia (ryc.2.10).



Ryc. 2.10. Zależność poziomu immunoglobulin w surowicy od wieku

2.8.2.2. IgM

IgM są pentamerami o m.cz. 960 kDa, zbudowanymi z 5 identycznych cząsteczek Ig klasy M połączonych w regionach Fc małym glikopeptydem łączącym J i czasie półtrwania w krążeniu 5 dni. Należą one do wczesnych przeciwciał syntetyzowanych w limfocytach B. Druga ekspozycja na antygen wywołuje rekombinację genu kodującego łańcuchy ciężkie, która inicjuje powstanie DNA odpowiadającego przeciwciałom klasy G. Proces ten trwa kilka tygodni. Od tego czasu limfocyt B przestaje produkować IgM, a rozpoczyna syntezę IgG o tej samej specyficzności. Przedłużona synteza IgM może być zachowana w przypadku patogennych antygenów stale obecnych w krążeniu. Mogą to być patologicznie zmienione erytrocyty lub pasożyty krwi. Do klasy IgM należą naturalne izoaglutyniny układu grupowego krwi ABO. Noworodek ma zdolność syntezy odpornościowych IgM, których poziom osiąga zakres wartości referencyjnych ludzi dorosłych już w pierwszym roku życia (ryc. 2.10). Wysoki poziom IgM w surowicy krwi noworodka świadczy o przejściu zakażenia wewnątrzmacicznego.

2.8.2.3. IgA

IgA w 90% są monomerami o m.cz. 150 kDa, a 10% dimerami lub tetramerami o m.cz. 390-690 kDa. W polu elektrycznym wędrują szybciej niż większość IgG, lokalizując się w elektroforetogramie w rejonie α_2 – środek γ (ryc. 2.1). Są one syntetyzowane przez komórki plazmatyczne znajdujące się w błonach śluzowych jelit, oskrzeli, przewodach gruczołów wydzielania zewnętrznego, szpiku, śledzionie i węzłach chłonnych. Są obecne w ślinie, mleku, sokach trawiennych, świetle jelita. Cząsteczki IgA w polimerach są połączone mostkami dwusiarczkowymi za pomocą peptydu łączącego J oraz zawierają komponentę sekrecyjną (SC). Polimeryczne IgA wydzielnicze spełniają ważną funkcję ochraniającą błony śluzowe przed wirusami i bakteriami. Wiążąc się z mikroorganizmami IgA nie niszczą ich, lecz uniemożliwiają ich przenikanie do przestrzeni wewnętrznych organizmu. Monomery IgA nie występują w osoczu noworodków. Polimeryczne IgA zawarte w mleku matki chronią oseska przed zakażeniami drogą pokarmową. Poziom monomerów IgA w osoczu wzrasta z wiekiem osiągając wartości referencyjne ludzi dorosłych w okresie młodzieńczym (ryc. 2.10).

2.8.3. Zaburzenia układu immunologicznego

2.8.3.1. Nabyte niedobory Ig

Hipoimmunoglobulinemie wtórne mogą pojawiać się w przebiegu wielu chorób powodując objawy niedoboru odporności humoralnej (tabela 2.9). Klinicznie manifestują się one nawracającymi zakażeniami trudno lub niepoddającymi się leczeniu.

Obraz elektroforetyczny typowej hipoiimmunoglobulinemii ogranicza się zwykle do obniżenia lub zaniku frakcji gamma w wyniku leczenia cytostatykami, promieniowaniem jonizującym, po splenektomii, w zespołach jelitowej utraty białka, lub w wyniku wcześniactwa (ryc. 2.2C).

W chorobach nowotworowych takich jak białaczki, chłoniaki, szpiczaki, grasiczaki dochodzi do zniszczenia prawidłowych poliklonalnych limfocytów B. W przypadkach szpiczaka mnogiego lub makroglobulinemii Waldenstrom, poliklonalne zostają one wyparte przez jedną, rzadziej kilka klonalnych linii plazmocytów produkujących jedno rzadziej dwa lub trzy przeciwciała (gammopatia monoklonalna, biklonalna) (ryc. 2.2F). W efekcie przy wysokim poziomie Ig pacjent cierpi z powodu niedoborów odporności humoralnej.

Tabela 2.9. Nabyte hipoiimmunoglobulinemie

Choroba/zespół chorobowy	Charakterystyka
Nowotwory układu chłonnego i siateczkowo-śródbłonowego (białaczki, szpiczaki, ziarniczaki)	zniszczenie prawidłowych linii limfocytów produkujących przeciwciała lub nowotworowy rozrost komórek limfoidalnych typu B produkujących w nadmiarze jeden rodzaj przeciwciała
Zespół nerczycowy	utrata IgA i IgG w wyniku zwiększonej przepuszczalności kłębków nerkowych
Leczenie cytostatykami, naświetlanie promieniowaniem jonizującym	zniszczenie prawidłowych linii limfocytów produkujących przeciwciała
Usunięcie śledziony	brak największego narządu limfatycznego, w którym limfocyty są aktywowane przez antygeny a następnie różnicują się w komórki efektorowe odpowiedzi immunologicznej. Śledziona jest pobudzana przez antygeny, które dostały się prosto do krwi i przez antygeny, które dotarły do limfy i nie były zatrzymane w węzłach limfatycznych, a następnie przedostały się do naczyń limfatycznych odprowadzających i do krwi.
Zaburzenia dojrzewania immunoglobulin u dzieci	wcześniactwo, zespoły złego wchłaniania, niedożywienie, opóźnienie rozwoju przeciwciał w aseptycznym środowisku.

Znacznego stopnia uszkodzenie kłębków nerkowych w zaawansowanych stadiach zespołu nerczycowego oprócz hipoalbuminemii pojawia się hipogammaglobulinemia, wskutek utraty IgA i IgG z moczem. IgM, ze względu na dużą masę cząsteczkową, nie przechodzą przez uszkodzone ściany kłębków nerkowych. W związku z tym ich poziom w surowicy nie ulega zmianie.

2.8.3.2. Wrodzone niedobory Ig

Hipo- oraz agammaglobulinemie wrodzone są chorobami rzadkimi (tabela 2.10). Stanowią one część grupy ponad 120 jednostek chorobowych powodujących pierwotne niedobory odporności. Ich podział opiera się na typie komórek, w których występuje dany defekt genetyczny. Według tej zasady wyróżnia się defekty: limfocytów B, limfocytów T, komórek NK oraz komórek żernych i komponent dopełniacza. W tym podrozdziale zostały opisane przykłady defektów komórek B i T z fenotypowymi zaburzeniami na poziomie wytwarzania różnych klas immunoglobulin.

2.8.3.2.1. Izolowany niedobór IgA

Jedną z najczęstszych chorób w tej podgrupie jest występujący z częstością 1:500 u rasy kaukaskiej izolowany niedobór IgA. Rozpoznaje się go wówczas, gdy poziom IgA w surowicy jest niższy od 0,05 g/L, a stężenia pozostałych klas Ig są prawidłowe. Defekt dotyczy genu *ICOS* (*inducible T-cell co-stimulator*). Białko ICOS obecne w limfocytach T łączy się z cząsteczką powierzchniową ICOSL limfocytów B przekazując sygnał do syntezy przeciwciał. W większości przypadków defekt ten nie daje objawów klinicznych, a do rozpoznania dochodzi przypadkowo. W nielicznych przypadkach, w wieku kilku lat pojawiają się nawracające zakażenia o różnej ciężkości, dotyczące głównie dróg oddechowych.

2.8.3.2.2. Agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X (ch. Brutona)

Choroba występuje u chłopców i cechuje się całkowitym brakiem przeciwciał przy śladowych poziomach limfocytów (<1%) we krwi. Przyczyną jest defekt genu kinazy tyrozynowej *Btk*, potrzebnej do wzrostu i dojrzewania prekursorów limfocytów B. Szpik zawiera zwiększoną liczbę limfocytów, które jednak nie posiadają receptorów immunoglobulinowych. Objawy kliniczne postaci nawracających zakażeń dróg oddechowych pojawiają się u pacjentów w 4-6 miesiącu życia, gdy zanikają przeciwciała pochodzące od matki. Odporność przeciwwirusowa jest zachowana u pacjentów z wyjątkiem enterowirusów.

Chorzy giną najczęściej z powodu enterowirusowego zapalenia opon mózgowych i mózgu. Leczenie polega na podawaniu preparatów przeciwciał.

2.8.3.2.3. Niedobór odporności ze wzrostem poziomu IgM

Stanowi on heterogenną grupę defektów genetycznych o podobnej prezentacji fenotypowej polegającej na zaburzeniu dojrzewania limfocytów B na etapie przełączania klas przeciwciał. W 30% przypadków jest on sprzężony z chromosomem X. U podłoża zespołu leży mutacja genu kodującego cząsteczki liganda CD40L (CD154), dla cząstek powierzchniowych CD40 limfocytów B. Jego brak uniemożliwia przemianę izotypu limfocytów B z syntetyzującego IgM na syntetyzujący IgG. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się małe lub niewykrywalne stężenia IgA i IgG przy prawidłowych lub podwyższonych stężeniach IgM (50% przypadków) i prawidłowej liczbie limfocytów. U pacjentów często występują zakażenia oportunistyczne (zapalenie płuc - *Pneumocystis sp.*). Często występują zakażenia wirusami hepatotropowymi, oraz nowotwory wątroby. Pomimo leczenia substytucyjnego preparatami immunoglobulin, rokowanie jest złe. Ponad 70% chorych umiera przed 25 rokiem życia. Są podejmowane próby leczenia rekombinowanymi cząsteczkami CD40L i przeszczepami komórek hematopoetycznych.

Tabela 2.10. Wrodzone hipimmunoglobulinemie

Choroba/zespół chorobowy	Charakterystyka
Izolowany niedobór IgA	poziom IgA w surowicy jest niższy od 0,05 g/L, a stężenia pozostałych klas Ig są prawidłowe. Defekt dotyczy genu <i>ICOS</i> (<i>inducible T-cell co-stimulator</i>)
Choroba Brutona	agammaglobulinemia związana z płcią (dla chłopców wszystkie Ig obniżone). Defekt genu kinazy tyrozynowej <i>Btk</i> , odpowiedzialnej za wzrost i dojrzewanie prekursorów limfocytów B
Niedobór odporności ze wzrostem poziomu IgM.	zaburzenia dojrzewania limfocytów B na etapie przełączania klas przeciwciał. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się małe lub niewykrywalne stężenia IgA i IgG przy prawidłowych lub podwyższonych stężeniach IgM
Ciężkie, złożone niedobory odporności (SCID – severe combined immunodeficiency)	głęboki niedobór lub całkowity brak odporności komórkowej i humoralnej. Przyczyną są mutacje w 13 genach, prowadzące do defektu limfocytów T i B oraz komórek NK.
Zespół Wiskott-Aldrich	zespół ten charakteryzuje skaza krwotoczna z wybroczynami skórnymi i krwawymi biegunkami, atopowe zapalenie skóry oraz zakażenia bakteryjne i wirusowe

2.8.3.2.4. Niedobory odporności o charakterze mieszanym

W zespołach tych, o różnym podłożu genetycznym, upośledzeniu ulega zarówno odpowiedź typu komórkowego jak i humoralnego. Zalicza się do nich zespół Wiskott-Aldrich oraz grupę ciężkich złożonych niedoborów odporności (SCID – *severe combined immunodeficiency*). Większość z nich jest sprzężona z płcią.

Zespół Wiskott-Aldrich (częstość <1:100000) charakteryzuje skaza krwotoczna z wybroczynami skórnymi i krwawymi biegunkami, do których dołączają się atopowe zapalenia skóry, infekcje bakteryjne (najczęściej paciorkowce), oportunistyczne (*Pneumocystis sp.*) i wirusowe (najczęściej z grupy *Herpes*). Później pojawiają się chłoniaki Burkitt'a. Średni czas przeżycia wynosi około 15 lat. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się małopłytkowość, spadek liczby limfocytów T, przy prawidłowych poziomach immunoglobulin. Przyczyną jest mutacja białka WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), które wiążąc się z aktyną oraz cząsteczkami Cdc42 bierze udział w tworzeniu wypustek komórkowych w fibroblastach, makrofagach i komórkach dendrytycznych. Skuteczną terapią jest przeszczep szpiku, a komplementarną – splenektomia.

SCID są rzadkimi chorobami, występującymi z częstością 1: 70000 do 100000 urodzeń charakteryzującymi się głębokimi niedoborami lub całkowitym brakiem odporności komórkowej i humoralnej. W ciągu pierwszych tygodni życia zaczynają pojawiać się biegunki, nawracające ciężkie zakażenia, do których dołączają się wtórne zaburzenia rozwoju i wzrostu. Przyczyną SCID mogą być mutacje w 13 genach, z ekspresją w postaci 4 podstawowych patologicznych fenotypów, klasyfikowanych wg liczby i funkcji limfocytów T i B oraz komórek NK.

Najczęściej spotykanym fenotypem komórkowym, stanowiącym 50-60% wszystkich przypadków SCID, jest postać T(-), B(+), NK(-). Przyczyną jest najczęściej mutacja genu *IL-2RG* (chromosom Xq13.1) dla łańcucha γc będącego wspólną podjednostką dla interleukin 2, 4, 7, 9, 15, 21. Odpowiada ona za przenoszenie informacji z receptorów IL przez kinazę tyrozynową Jak3. Brak jest komórek T i NK, przy obecności limfocytów B, w których jednak nie dochodzi do przełączania klas Ig. Stężenia różnych klas przeciwciał są niskie. U części chorych IgM mogą być prawidłowe.

SCID T(-), B(+), NK(+) jest spowodowany mutacją genu łańcucha α receptora IL-7 (chromosom 5p13). Poza tym fenotyp jest podobny do opisywanego poprzednio.

SCID T(-), B(-), NK(+) jest spowodowany mutacją genów *RAG1 i 2* (chromosom 11p13) kodujących białka odpowiedzialne za aktywację i rearanżację genów podjednostek zmiennych (V, D, J) łańcuchów przeciwciał.

SCID T(-), B(-), NK(-) wiąże się z recesywną mutacją genu *ADA* (chromosom 20q13.11), kodującego deaminazę adenozyne. Enzym ten przekształca adenozyne do inozyny oraz 2'-deoksyadenozyne do 2'-

deoksyinozyny. Jego niedobór powoduje akumulację deoksyadenozyny i deoksy-ATP oraz S-adenozylu-homocysteiny, które są toksyczne dla dojrzewających limfocytów T i B. Poziomy przeciwciał są bardzo niskie lub nieoznaczalne. Poza typowymi zakażeniami, dochodzą jeszcze zaburzenia układu kostno-szkieletowego, ślepotą korową i dystonią. Leczenie polega na przeszczepie szpiku lub terapii substytucyjnej rekombinowanym enzymem.

Wykrycie niedoborów jednej czy też kilku klas przeciwciał zwykle nie jest wystarczające do postawienia definitywnego rozpoznania niedoboru immunologicznego. Dlatego pełna diagnostyka wrodzonych niedoborów Ig wymaga oznaczenia liczby limfocytów B, T, NK metodami cytometrii przepływowej wykrywającej antygeny specyficzne dla poszczególnych klas limfocytów oraz identyfikacji zmutowanych genów.

2.8.3.3. Hiperimmunglobulinemia poliklonalna

Aktywacja wielu klonów limfocytów B do syntezy licznych przeciwciał o różnej swoistości może prowadzić do zwiększenia poziomu różnych klas immunoglobulin. Taką odpowiedź poliklonalną powodują antygeny wirusów, bakterii, grzybów i pierwotniaków przebiegu chorób infekcyjnych.

Tabela 2.11. Przyczyny hiperimmunglobulinemii

Choroba/zespół chorobowy	Charakterystyka
Choroby autoimmunizacyjne (RZS, toczeń rumieniowaty układowy, sklerodermia, zapalenia skórno-mięśniowe), Przewlekłe choroby wątroby (marskość, przewlekłe zapalenia), sarkoidoza	aktywacja wielu klonów limfocytów B. Poliklonalny wzrost stężenia immunoglobulin
Szpiczak mnogi	niekontrolowany rozrost pojedynczego klonu plazmocytów produkujących tylko jedno przeciwciało
Makroglobulinemia Waldenstroma,	nowotworowy rozplam zróżnicowanych limfocytów B produkujących monoklonalne IgM
Choroba ciężkich łańcuchów	zaburzenie funkcjonalne limfocytów B i plazmocytów. Polega na uwalnianiu tylko łańcuchów ciężkich (γ , μ , α) zamiast pełnej cząsteczki immunoglobuliny

Hiperimmunglobulinemia poliklonalna mogą być przyczyną hiperproteinemii, zwykle nie przekraczającej 90 g/L. Odpowiedź ta pojawia się zwykle w późnym okresie ostrej fazy zakażeń. Wczesne Ig klasy M pojawiają się w ciągu 1-2 tygodni od zakażenia. Czasami, szczególnie u dzieci ta odpowiedź ma charakter oligoklonalny, który w obrazie elektroforetycznym daje wyraźny wąski pik, mylony z odpowiedzią monoklonalną. Po 2-4 tygodniach od początku choroby następuje konwersja limfocytów B na produkcję IgG.

Wzrostowi poziomu IgG towarzyszy spadek poziomu IgM do wartości referencyjnych. Taki typowy obraz występuje głównie w zakażeniach bakteryjnych – anginach, durze brzuszonym, krętkowicach i chorobach pasożytniczych (malaria). Szybsze odczyny obserwuje się w zakażeniach wirusowych takich jak mononukleozą zakaźną lub wirusowe zapalenie wątroby.

Przy zakażeniach przewlekłych, nawracających oraz w chorobach autoimmunizacyjnych stężenie Ig może osiągać poziom 50% stężenia białka całkowitego. W zespole nabytego niedoboru odporności (AIDS), wielokrotne zakażenie powodują znaczny wzrost stężenia Ig pomimo upośledzonej reakcji limfocytów T (ryc. 2.2.E). Z powyższego opisu wynika, że hipergammaglobulinemia poliklonalna nie jest objawem specyficznej jednostki chorobowej. Dodatkowe badania poziomów przeciwciał skierowanych przeciw specyficznym białkom, lipo czy glikoproteinom różnych mikroorganizmów, czy też własnych tkanek gospodarza pomaga w postawieniu rozpoznania. W marskościach wątroby obserwuje się zlanie frakcji β z frakcją γ w rozdziale elektroforetycznym (ryc. 2.2.D). W tych przypadkach hiperimmunoglobulinemii towarzyszy hipoalbuminemia i niedobory innych białek syntetyzowanych w wątrobie. Niedobory czynników krzepnięcia, w tym protrombiny, powodują skazę krwotoczną.

2.8.3.4. Gammapatie monoklonalne

Hiperimmunoglobulinemie monoklonalne są objawem stosunkowo rzadkich układowych chorób nowotworowych limfocytów B. Zalicza się do nich gammapatie monoklonalne:

- szpiczak mnogi (IgG, IgA, IgE, IgD)
- makroglobulinemia Waldenström'a
- łagodne gammapatie monoklonalne

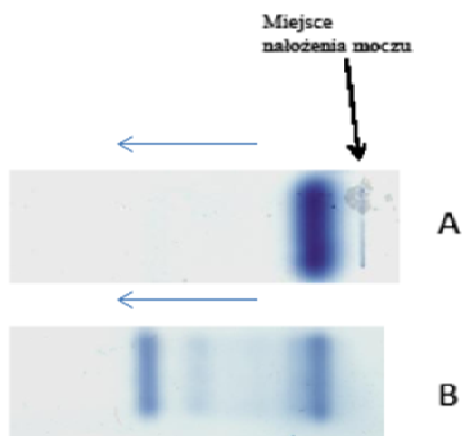
Są one niestałym objawem:przewlekłych białaczek limfatycznych i chłoniaków (około 20%). Zachorowalność na szpiczaka mnogiego wynosi od 1-4 na 100000 ludzi w ciągu roku. Przy nowoczesnych metodach leczenia czas przeżycia został wydłużony do 7 lat. Choroba pojawia się po 50. roku życia, a częstość zachorowań na nią wzrasta z wiekiem.

Przyczyną tej gammapatii jest niekontrolowany rozrost pojedynczego klonu plazmacytów produkujących tylko jedno przeciwciało. W 50% przypadków szpiczaka stwierdza się w plazmacytach translokacje chromosomalne pomiędzy genami łańcucha ciężkiego, locus 14q32 z różnymi onkogenami w locus 11q13, 4p16.3, 6p21 lub 16q23. Delecje części chromosomu 13 są także obserwowane w 50% przypadków. Potoczna nazwa paraproteinemia nie powinna być rozumiana jako obecność immunoglobuliny o nieprawidłowej strukturze. Jest to przeważnie wielokrotne zwiększenie poziomu jednego przeciwciała lub jego podjednostek.

Tabela 2.12. Wyniki badań laboratoryjnych w szpiczaku mnogim

Parametr	Częstość występowania (%)
Opadanie krwinek czerwonych >50 mm/godz	93
Opadanie krwinek czerwonych >100 mm/godz.	67
Ig monoklonalne (elektroforeza)	90
Zmiany kostne	87
Białkomocz	80
Hiperproteinemia (>80 g/L)	72
Plazmocyty, skupiska plazmocytów w rozmazie krwi szpikowej (rozdz. 4)	100
Plazmocyty we krwi obwodowej	23
Białko Bence-Jones	50
Niedokrwistość (hemoglobina <110 g/L)	84
Leukocytoza (< 400 G/L)	40
Leukocytoza (> 1000 G/L)	10
Trombocytopenia	25
Skaza krwotoczna	10
β_2 -mikroglobulina (wzrost)	Wskaźnik zaawansowania

Pacjenci zgłaszają się do lekarza z powodu osłabienia i nawracających zakażeń. Standardowe badania laboratoryjne wykazują zwykle niedokrwistość normocytarną (94%), wysokie OB (93% >50 mm/godz.), zaburzenia funkcji nerek (proteinuria, spadek filtracji kłębkowej). W 90% przypadków elektroforeza białek surowicy wykazuje obecność ostro zarysowanego piku immunoglobuliny monoklonalnej, przy znacznej hiperproteinemii. W 55% przypadków jest to IgG, w 25% IgA, a rzadko IgD, IgM lub IgE. W 50% przypadków stwierdza się obecność łańcuchów lekkich Ig w moczu (białko Bence-Jones, m.cz. 22 kDa). Immunofiksacja rozdziału elektroforetycznego surowicy lub cytometria przepływowa pozwalają ustalić klasę monoklonalnych łańcuchów lekkich i ciężkich. Rozrost jednego klonu niszczy pozostałe plazmocyty prowadząc do zaniku poliklonalnej frakcji gammaglobulin (ryc. 2.2F). W 10% przypadków występują tylko łańcuchy lekkie Ig. Jest to choroba lekkich łańcuchów (szpiczak Bence-Jones). W tych przypadkach w elektroforezie białek surowicy przy obecnej hipoinmunoglobulinemii nie stwierdza piku Ig monoklonalnej. Natomiast elektroforeza moczu wykazuje obecność pasma monoklonalnego (tabela 2.12, ryc. 2.11).



Ryc. 2.11. Rozdział elektroforetyczny moczu. A –białko Bence-Jones bez glomerulopatii, B – białko Bence-Jones z glomerulopatią

Należy przy tym zaznaczyć, że kanaliki bliższe mogą reabsorbować i degradować do 1,5 g łańcuchów lekkich, filtrowanych ciągu doby. Dlatego obecność białka monoklonalnego w moczu wskazuje na zaawansowane stadium choroby. Przedostające się przez ścianę kłębków duże ilości łańcuchów lekkich uszkadzają kłębki oraz cewki nerkowe, co prowadzi do zespołu nercycowego i niewydolności nerek. Przy tym powikłaniu w moczu stwierdza się obecność albuminy, a w surowicy hipoalbuminemię. Ciężkość i szybkość pojawienia się nefropatii nie wykazuje przy tym korelacji z ilością wydalanych łańcuchów lekkich.

Ogniska rozplemu plazmocytów w kościach czaszki, kręgach i żebrach powodują w 87% przypadków okrągłe ogniska osteolityczne, które u 50% chorych powodują hiperkalcemię. Kluczowym kryterium diagnostycznym szpiczaka jest zawartość plazmocytów powyżej 10% całkowitej puli komórek układu krwiotwórczego i ich skupisk w biopsjach szpiku.

Parametry laboratoryjne odgrywają istotną rolę w ocenie stanu zaawansowania choroby. Jedną z metod jest International Staging System (ISS) z 2005 r, oparty o oznaczanie poziomów albuminy i β_2 -mikroglobuliny (patrz rozdz. 2.8.3.4) w surowicy (tabela 2.13). Ig monoklonalne są więc uznany i wysoko-czułym markerem tej choroby nowotworowej. Około 1% przypadków stanowią szpiczaki niewydzielające Ig. Rozpoznanie opiera się wówczas na ocenie rozmazu krwi szpikowej i obrazie RTG.

Tabela 2.13. Ocena stanu zaawansowania szpiczaka mnogiego metodami laboratoryjnymi (wg International Staging System)

Stadium szpiczaka		β_2 -mikroglobulina w surowicy (mg/L)	Albumina w surowicy (g/L)
I		<3,5	≥ 35
II	A	<3,5	<35
	B	<5,5 $\geq 3,5$	–
III		>5,5	–

Innym do dziś używanym jest system Durie-Salmon z 1975r. (tabela 2.14).

U około 3% ludzi powyżej 70 roku życia występuje gammapatia łagodna, w której stężenie Ig monoklonalnego w surowicy nie przekracza 10 g/L i nie ma tendencji wzrostowej. W moczu nie występują łańcuchy lekkie, ani też inne zaburzenia wymienione w tabeli 2.14. Zmiana ta wymaga jednak ciągłej obserwacji, nie można, bowiem wykluczyć istnienia złośliwej gammapatii.

Tabela 2.14. Ocena stanu zaawansowania szpiczaka mnogiego wg Durie-Salmon

Stadium szpiczaka		Hemoglobina we krwi (g/L)	Wapń w surowicy (mmol/L)	Układ kostno-szkieletowy ogniska (N)	Ig monoklonalne w surowicy (g/L)	Łańcuchy lekkie w moczu (g/dobę)	Kreatynina w surowicy (mg/dL)
I	A	>100	–	b.z./ pojedyncza zmiana/ osteoporoza	IgG <50 lub IgA <30	<4,0	<2,0
	B						>2,0
II	A	85-100	-	2 ogniska	IgG 50-70 lub IgA 30-50	4,0-12,0	<2,0
	B						>2,0
III	A	<85	>3,0	3 lub więcej ognisk litycznych	IgG >70 lub IgA >50	>12,0	<2,0
	B						>2,0

Makroglobulinemia Waldenstroma rozwija się najczęściej po 60 roku życia i jest spowodowana klonalnym rozrostem zróżnicowanych limfocytów B. Stwierdza się w nich sporadyczne mutacje w postaci delecji w chromosomach 6q23 i 13q14 oraz addycji w 3q13-q28 6p i 18q. Ich związek przyczynowy z tą patologią jest niewyjaśniony. Są również nieprawidłowości w różnych

mikroRNA. Komórki nowotworowe wykazują nadekspresję tyrozynowej kinazy białkowej Src. Zmiany kostne mają postać zrzesztotnienia, bez zmian ogniskowych. W osoczu nagromadzają się monoklonalne IgM. Przebieg kliniczny jest łagodniejszy niż przypadku szpiczaka mnogiego. Hiperproteinemia często przekracza 100 g/L, a OB jest bardzo wysokie. Akumulujące się IgM ma często właściwości krioglobuliny, zwiększającej lepkość krwi. Utrudnia to przepływ krwi w naczyniach włosowatych i sprzyja powstawaniu mikrozakrzepów

2.9. Białka moczu

W warunkach fizjologicznych wydalanie białek z moczem wynosi 20-100 mg/dobę. Dzięki reabsorpcji zwrotnej w kanalikach bliższych z 5 g albuminy przedostającej się do moczu pierwotnego w warunkach fizjologicznych, w moczu ostatecznym wydalana jest jej nie więcej niż 30 mg/dobę. Wartość modalna dla tego parametru wynosi około 10 mg/dobę. Ponad połowę stanowią kompleksy białkowe uromukoidu powstające z wydzieliny nabłonka dróg moczowych. Ściana kłębków nerkowych jest przepuszczalna dla białek i peptydów o m.c.z. mniejszej od 40 kDa (mikroproteiny). Są one niemal całkowicie reabsorbowane na drodze pinocytozy przez komórki kanalików bliższych i tam degradowane. Ich wydalanie z moczem jest, więc wskaźnikiem funkcji resorpcyjnej kanalika bliższego. Natomiast ich poziom w osoczu pozostaje w odwrotnej zależności do wielkości filtracji kłębkowej.

Tabela 2.15. Grupy pacjentów z ryzykiem wystąpienia glomerulopatii i tubulopatii

Typ białkomoczu	Grupy ryzyka
Białkomocz przednerkowy	Gammapatie monoklonalne Zespoły hemolityczne Mioglobinemie
Białkomocz kłębkowy	Kłębkowe zapalenie nerek, cukrzyca, Toczeń rumieniowaty trzewny Nadciśnienie Gammapatie monoklonalne Proteinurie łagodne
Białkomocz kanalikowy	Przewlekłe odmiedniczkowe zapalenie nerek Choroby układowe (marskość, sarkoidoza) Leki (fenacetyna, aminoglikozydy) Trucizny (kadm, glikol etylenowy) Przeszczepy nerek Tubulopatie dziedziczne (zespół Fanconi)

Wydalanie z moczem więcej niż 30 mg albuminy i ponad 150 mg białka całkowitego w ciągu doby, jest uważane za zjawisko patologiczne. Powszechnie stosowane testy paskowe wykrywają wyłącznie albuminę w stężeniach powyżej 200 mg/L. Dlatego dają one wynik ujemny przy ewidentnie patologicznych

stężeniach albuminy w moczu w przedziale od 30 do 300 mg/dobę. Ten stan „ukrytego białkomoczu”, wynikający z niskiej czułości powszechnie używanego testu nosi nazwę „mikroalbuminurii”. Szereg chorób, wymienionych w tabeli 2.15, powoduje stopniowo pogłębiające się uszkodzenie funkcji kłębków i kanalików nerkowych. Patologie te poprzez fazę mikroalbuminurii prowadzą do powstania zespołu nerczycowego (wydalanie białek z moczem powyżej 3.5 g/dobę). Zespół nerczycowy prowadzi do przewlekłej niedomogi nerek i jest jednym z czynników ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych (tabela 2.15).

Pacjenci z tymi schorzeniami powinni mieć regularnie kontrolowany poziom wydalanej albuminy, pomimo ujemnych wyników testu przesiewowego na obecność albuminy.

Ze względu na mechanizm występowania rozróżniamy białkomocze przednerkowe, kłębkowe i kanalikowe (tabela 2.15).

2.9.1. Białkomocz przednerkowy

Proteinurie tego typu spowodowane są pojawieniem się w osoczu zwiększonych ilości białek, które po przefitrowaniu do moczu pierwotnego nie mogą być całkowicie zreabsorbowane w kanalikach bliższych i pojawiają się w moczu.

Do takich białek zalicza się łańcuchy lekkie w gammapatiach monoklonalnych, hemoglobinę w zespołach hemolitycznych i mioglobinę w miopatiach (tabela 2.14). Pojawiają się one w moczu po wysyceniu wszystkich ligandów neutralizujących je w różnych przedziałach organizmu (patrz wyżej) i przekroczeniu progu nerkowego. Białkomocz w tych przypadkach nie przekracza 1,0 g/dobę. Jednakże nieprawidłowe białka uszkodzają kłębki nerkowe prowadząc do rozwoju zespołu nerczycowego (tabela 2.15).

W surowicy mogą również pojawiać się białka, których stężenie w warunkach fizjologicznych jest niezwykle niskie. Do tej grupy zalicza się łańcuchy lekkie immunoglobulin (20 kDa), mioglobinę (17,1 kDa) i hemoglobinę, które w wolnej postaci w osoczu praktycznie nie występują. Ich stężenia w surowicy, a co za tym idzie i wydalanie z moczem, mogą wzrastać bardzo znacznie (*overflow proteinuria*). W przypadku łańcuchów lekkich taka sytuacja istnieje w 50% przypadków szpiczaka mnogiego (patrz rozdz. 2.8.3.4.). Mioglobinemia i mioglobinuria są objawem masywnego uszkodzenia mięśni szkieletowych jak również wczesnym niespecyficznym markerem zawału mięśnia sercowego. Wolna hemoglobina w osoczu i hemoglobinuria mogą pojawiać się w różnych zespołach hemolitycznych i świadczą o wyczerpaniu osoczowych zasobów haptoglobiny. Wymienione białka podczas procesu filtracji mogą powodować glomerulopatie o podłożu autoimmunologicznym.

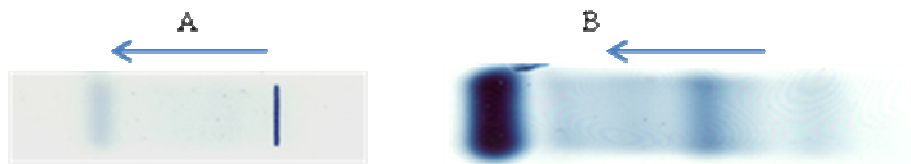
2.9.2. Białkomocz kłębkowy – albuminuria

Białkomocz kłębkowy jest najczęściej występującym typem białkomoczu rozwijającym się w przebiegu różnych chorób o zróżnicowanej etiologii (tabela 2.15). Uszkodzenie ma zwykle charakter postępujący i w zależności od stopnia uszkodzenia kłębków może wahać się od kilkudziesięciu mg do kilkudziesięciu g na dobę. Za ciężkie uznaje się utraty białka powyżej 2 g/dobę. Za arbitralną granicę zespołu nerczycowego uznano utratę białek wyższą od 3,5 g/dobę.

Przy nieznacznej utracie białka białkomocz jest na ogół selektywny i dotyczy białek o względnie niskiej masie cząsteczkowej takich jak albumina, transferyna czy α_1 -antytrypsyna. Postęp choroby powoduje zwykle dalsze uszkodzenie błony podstawnej i komórek kłębka, które zaczynają przepuszczać białka o wyższej m.cz. takie jak immunoglobuliny A i G. Jest to białkomocz nieselektywny (ryc. 2.12B). Przy istniejącej hipoproteinemii, w rozdziale elektroforetycznym białek surowicy krwi, obserwuje się obniżenie frakcji albuminowej, obniżenie frakcji α_1 (utrata α_1 antytrypsyny), wzrost α_2 (nadprodukcja α_2 -makroglobuliny), wzrost β_1 w postaci ostrego piku (nadprodukcja apolipoproteiny B, hipercholesterolemia). Przy selektywnej utracie białka wiekość frakcji γ nie ulega zmianie. Przy znacznym uszkodzeniu kłębków pojawia się białkomocz nieselektywny, a w surowicy hipoimmunoglobulinemia, która powoduje niedobory odporności humoralnej.

Białkomocze nieznacznego stopnia, mogą powstawać przy zaburzeniach przepływu krwi przez nerki. Do tej podgrupy zalicza się występujący często u dzieci białkomocz: powysiłkowy, ortostatyczny i gorączkowy, a u dorosłych związany z nadciśnieniem lub z zastoinową niewydolnością mięśnia sercowego.

U kobiet w ciąży może pojawiać się łagodny białkomocz rzędu 200-300 mg/dobę, uznawany za zjawisko tolerowalne. Natomiast w stanach przedrzucawkowych proteinuria może wzrastać do 3,0 g/dobę. W przypadkach izolowanych uszkodzeń kłębków nerkowych przesączanie i reabsorpcja zwrotna w kanalikach bliższych białek o m.cz. mniejszej od 40 kDa, nie ulega zmianie. W takich przypadkach ich wydalanie z moczem nie zmienia się.



Ryc. 2.12. Elektroforeza moczu. A – białkomocz selektywny; B – białkomocz nieselektywny

2.9.3. Białkomocz kanalikowy

Powstaje w wyniku uszkodzenia reabsorpcji zwrotnej białek w kanalikach bliższych. Zwiększa się wówczas wydalanie białek o małej masie cząsteczkowej, które swobodnie przechodzą przez ścianę kłębków w warunkach prawidłowych. Zalicza się do nich cystatynę C (m.cz. 13,3 kDa), lizozym (14,5 kDa), α_1 -mikroglobulinę (27 kDa), β_2 -mikroglobulinę (11,8 kDa). Stężenia tych białek w osoczu są rzędu 10^{-6} - 10^{-3} g/L (tabela 2.16). W związku z tym ich wydalanie z moczem w warunkach prawidłowych wynosi poniżej 1 mg/dobę (tabela 2.16). Wydalanie mikroprotein może ulec wielokrotnemu nawet ponad 1000-krotnemu zwiększeniu w przypadku zmniejszenia wchłaniania zwrotnego przez uszkodzone kanaliki bliższe. Wynika z tego, że przy prawidłowym stężeniu w osoczu wydalanie mikroprotein z moczem może być wskaźnikiem funkcji kanalików bliższych. Jednocześnie wydalanie albuminy może być prawidłowe lub nieznacznie podwyższone (tabela 2.16). W większości przypadków albuminuria pochodzenia cewkowego współistnieje z albuminurią kłębkową.

Tabela 2.16. Różnicowanie białkomoczu

Białkomocz	Wydalanie białek w mg/dobę	
	Albumina	beta ₂ – mikroglobulina
Norma	< 30	< 0,25
Kłębkowy	> 30	< 0,25
Kanalikowy	< 30	> 0,25
Mieszany	> 30	> 0,25

Dlatego idealnym wskaźnikiem funkcji kanalika byłaby mikroproteina, której poziom w osoczu nie ulegałby zmianie w możliwie dużej liczbie stanów chorobowych. W praktyce do oceny funkcji kanalików nerkowych używa się oznaczeń wydalania z moczem β_2 -mikroglobuliny lub cystatyny-C.

2.9.3.1. Beta₂- mikroglobulina (B2M)

B2M jest białkiem powierzchniowym wielu komórek jądrzastych, produktem genu *B2M* zlokalizowanego w chromosomie 15q22. Jest ona jedną z podjednostek heterotetramerycznego głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I, zlokalizowanego na powierzchni limfocytów T. Dlatego jej stężenie w

surowicy wzrasta w szeregu jednostek chorobowych, w których dochodzi aktywacji układów limfocytarnych takich jak: szpiczak mnogi, chłoniaki nieziarnicze (60% stany zaawansowane), ziarnica złośliwa (do 70%, stany zaawansowane), białaczki (100% stany zaawansowane), a także pospolite infekcje i stany zapalne. W związku z tym, jego oznaczenie w moczu, jako wskaźnika funkcji kanalika, jest ograniczone do sytuacji klinicznych, wolnych od tych patologii. Stężenie B2M w surowicy wzrasta w stanach przewlekłej niedomogi nerek proporcjonalnie do spadku filtracji kłębkowej osiągając wartości do 100 razy wyższe od referencyjnych. Dializy nie są w stanie zahamować odkładania złogów amyloidowych B2M w ścięgnistych elementach stawów. Powoduje to zmiany degeneracyjne układu kostno-stawowego w tej grupie chorych.

2.9.3.2. Cystatyna C (Cys-C)

Cys-C jest produktem genu *CST3* znajdującego się w chromosomie 20 i produkowanym przez wszystkie komórki jądrzaste. Jest ona głównym białkiem superrodziny 13 inhibitorów proteaz cystynowych. Cys-C jest usuwana z krążenia głównie przez nerki. Jej poziom w surowicy u osób dorosłych jest nieznacznie zależny od wieku, płci, rasy i masy mięśniowej. W związku z tym poziom Cys-C w surowicy jest uważany za lepszy wskaźnik filtracji kłębkowej niż poziom kreatyniny. Natomiast jej wydalanie z moczem jest wskaźnikiem zdolności resorbcyjnej kanalików nerkowych. Zmutowany gen *GST3* koduje białko o właściwościach amyloidu, które powoduje mózgową krwotoczność amyloidową typu islandzkiego z demencją typu Alzheimer'a.

2.9.3.3. Lipokalina-2 (NGAL – neutrophil gelatinase-associated lipocalin)

NGAL jest glikoproteiną o m.cz 25 kDa, produktem genu *LCN2*. Należy ona do rodziny lipokalin – białek transportujących różne związki hydrofobowe jak również kompleksy żelaza z białkami bakteryjnymi, do wnętrza komórek. Do tej rodziny należą również α_1 -mikroglobulina, białko wiążące retinol, syntetaza prostaglandyny D itp. Wysoką ekspresję tego białka wykazano w wątrobie, tkance tłuszczowej, granulocytach obojętnochłonnych, gruczole krokowym, płucach, żołądku oraz w drogach moczowych, a w szczególności w części grubej wstępującego odcinka pętli Henlego oraz kanalikach zbiorczych. Jego synteza w cewkach nerkowych wzrasta w ciągu kilku godzin od incydentu ischemicznego, czy też innego czynnika nefrotoksycznego. Poprzez wiązanie żelaza i białek bakteryjnych oraz bezpośrednie działanie NGAL wywiera działanie ochronne i stymuluje regenerację uszkodzonych kanalików. Wydalanie NGAL z moczem zależy o jego poziomie w osoczu jak i syntezy i wydalania w kanalikach nerkowych. Dzięki temu wzrost jego wydalania z moczem jest wczesnym

markerem ostrego uszkodzenia nerek u pacjentów z urazami wielonarządowymi, po rozległych zabiegach chirurgicznych szczególnie kardiochirurgicznych i naczyniowych z udziałem krążenia pozaustrojowego. Wzrost wydalania NGAL o kilkanaście godzin wyprzedza wzrost stężenia kreatyniny w surowicy, jako markera rozwijającej się niewydolności nerek. Jest on również czułym wskaźnikiem nefropatii u pewnego procenta pacjentów po badaniach koronograficznych z użyciem kontrastów, czy też po przezskórnej angioplastyce, przebiegających z prawidłowymi stężeniami kreatyniny w surowicy. Po przeszczepie nerki poziom NGAL w surowicy rośnie szybciej niż poziom kreatyniny, w przypadku nie podjęcia/opóźnienia przez nią prawidłowej funkcji. Natomiast wysoki poziom NGAL w moczu zmarłych dawców nerki wskazuje na większe prawdopodobieństwo opóźnienia podjęcia przez przeszczep prawidłowej funkcji.

2.9.4. *Białkomocz pazanerkowy*

Powstaje w wyniku krwawień do dróg moczowych. Wzór elektroforetyczny białek moczu jest wówczas zbliżony do białek osocza. W moczu pojawiają się białka o bardzo wysokiej masie cząsteczkowej, które nie przedostają się do moczu ani w glomerulo- ani w tubulopatiach. Są to: α_2 -makroglobulina i IgM.

2.10. Znaczenie diagnostyczne białek surowicy krwi

Tabela 2.17. Wartości referencyjne i stany chorobowe wpływające na stężenia wybranych białek surowicy krwi

Białko	Gen/locus	Charakterystyka/zastosowanie w diagnostyce	Wartości referencyjne (g/L)
Albumina	<i>ALB/4q13.3</i>	Tabela 6.2, obliczanie [Ca] skorygowanego (tom II, rozdz. 6)	35-50
α_1 antytrypsyna	<i>A1AT/14q32.1</i>	Niedobór wrodzony i niedobory nabyte (nerkowe i jelitowe zespoły utraty białka)	1,9-3,4
α_1 kwaśna glikoproteina	<i>ORM1/9q31-qter</i>	Bez znaczenia diagnostycznego	0,5-1,5
Ceruloplazmina	<i>CP/3q23-q24</i>	Choroba Wilsona.	0,38-0,58
α_2 -makroglobulina	<i>A2M/12p13.31</i>	Zespół nerczycowy	1,4-2,8
Haptoglobina	<i>HT</i>	Stany hemolizy wewnątrznaczyniowej	0,9-3,2
Transferyna	<i>TF/3q21</i>	Niedobory żelaza, zespoły utraty białka	1,8-4,1

Białko	Gen/locus	Charakterystyka/zastosowanie w diagnostyce	Wartości referencyjne (g/L)
Prokalcytonina	<i>CALC-1/11</i>	Ciężkie zakażenia, sepsa, obserwacja leczenia	<5 10 ⁻⁷
Dopełniacz C3	<i>C3/19p13.3-p13.2</i>	Stany zapalne, toczeń rumieniowaty, niektóre choroby nerek	0,7-1,5
Białko-C-reaktywne	<i>CRP/1q21-q23</i>	Różnicowanie zakażeń bakteryjnych i wirusowych, obserwacja leczenia, prognozowanie chorób naczyniowych	<0,008
β ₂ -mikroglobulina	<i>B2M/15.q22</i>	Choroby rozrostowe limfocytów, diagnostyka tubulopatii (tabela 2.16)	0,01-0,03
IgA	Zespół około 65 genów IGH (chr.14), 27 genów(D), 6 genów J, oraz genów IGK (chr. 2) i IGL (chr. 22)	Wrodzone i nabyte hipogammaglobulinemie (tab. 2.9 i 2.10). Hipergammaglobulinemie poli- i monoklonalne (tab. 2.11 i 2.12) Indywidualne przeciwciała w chorobach zakaźnych, autoimmunizacyjnych i alergiach (IgE)	0,9-4,5
IgM			M: 0,6-2,5 K: 0,7-2,8
IgG			8,0-18,0

2.11. Przypadki kliniczne

Przypadek 2.1

Mężczyzna lat 74, po 4 latach po radioterapii raka gruczołu krokowego i leczeniu antagonistami testosteronu, zgłosił się do rutynowej kontroli w poradni urologicznej. Skarży się na bóle krzyża, utratę łaknienia, częste infekcje dróg oddechowych, ogólne osłabienie, utratę wagi około 7 kg od ostatniej wizyty przed 6. miesiącami. Badania laboratoryjne wykonane przed wizytą wykazały: ultraczułe PSA 0,138 µg/L, morfologia: Hb 95 g/L, eryocyty 3,9 T/L, leukocyty 3,0 G/L, OB 20 mm/godz. Badanie ogólne moczu – test paskowy oraz obraz mikroskopowy bez zmian.

- Na co wskazuje taki obraz? Jakie badania należałoby wykonać?
 - RTG wykazało 3 osteolityczne ubytki w kręgach lędźwiowych.
 - RTG czaszki b.z.
 - Surowica: białko całkowite 65 g/L; albumina 38 g/L; elektroforeza surowicy albumina 60%, α₁ 5%, α₂ 15%, β 15%, γ 5%, pasmo monoklonalne nieobecne, Ca w surowicy 2,85 mmol/L.
 - Rozmaz krwi szpikowej – plazmocyty pojedyncze i w skupiskach - 45% wszystkich elementów komórkowych.

- Jakiego jest rozpoznanie? Jakich dodatkowych badań należy zlecić?
 - Badanie moczu wykazało poziom białka (met. Extona) 450 mg/L, *albuminuria* (-), mikroalbuminuria 80 mg/L. Elektroforeza moczu – albumina 20%, pasmo monoklonalne 80% (immunofiksacja łańcuchy lekkie λ). Poziom wolnych łańcuchów lekkich λ w moczu, metodą immunoturbidymetryczną 2,0 g/L. β_2 -mikroglobulina w surowicy 5,1 mg/L.
- Podaj rozpoznanie szczegółowe.
 - Wyjaśnij przyczyny niezgodności obrazu EF i oznaczeń immunoturbidymetrycznych.
 - Jaki jest poziom produkcji łańcuchów lekkich u tego pacjenta?

Przypadek 2.2

Mężczyzna lat 33, przy urodzeniu b.z., przeszedł odrę i w wieku 23 lat ospę wietrzną. Od tego czasu cierpi na nawracające ropne zapalenia uszu, zatok, oskrzeli, zapalenia płuc i dróg moczowych. W wieku 28 lat miał ropnień mózgu, leczony chirurgicznie z powikłaniem w postaci zapalenia szpiku i kości czaszki, nawrót 3 lata później leczony drenażem. Oprócz tego kilkakrotne zakażenie wirusem zapalenia wątroby i nawracające epizody giardiozy (Ogoniastek jelitowy, *Giardia lamblia*), i amebozy (Pełzaki). Leczone skutecznie kompleksowymi terapiami antybiotykami. W wieku 16 lat miał wyprysk suchy dookoła stawów łokciowych i kolanowych. Ostatnio po leczeniu zapalenia płuc septranem i lekami przeciwgorączkowymi pojawił się zespół Steven-Johnson (Rumień wielopostaciowy, *Erythema multiforme major*). Żadne z rodzeństwa - 3 braci i 1 siostra nie miało tego typu zmian chorobowych.

Badania laboratoryjne: Hb 156 g/L, leukocyty 17,5 T/L (granulocyty 74%, kwasochłonne 6%, limfocyty 18%, monocyty 2%), płytki krwi 240 T/L, OB. 2 mm/godz., glukoza 82 mg/dL, azot mocznika 10 mg/dL, kreatynina 0,6 mg/dL, kwas moczowy 3 mg/dL, bilirubina 0,6 mg/dL

- Jaki mechanizm leży u podłoża tej patologii? Jakich badań należałoby wykonać?
 - Surowica: białko całkowite 59 g/L, albumina 38 g/L, EF hipogammaglobulinemia, IgG 2,9 g/L, IgA nieoznaczalne, IgM nieoznaczalne.
 - Cytometria przepływowa: limfocyty B 38% (norma 10-20%), limfocyty T 60% (norma 70-80%).
 - Leczenie 30 ml koncentratu immunoglobulin, co 4-6 tygodni, profilaktyczna antybiotykoterapia. Leczenie domięśniowymi preparatami Ig jest bolesne i kosztowne. Obecnie są dostępne dożylnie preparaty Ig.

Przypadek 2.3

Kobieta, lat 45, od 4 lat pacjentka przychodni nefrologicznej, tj. od przejścia ostrego zapalenia kłębków nerkowych, przyjęta do szpitala z powodu narastających obrzęków kończyn dolnych i kolejnej infekcji układu oddechowego. Przy przyjęciu RR 115/70 mmHg, puls 86/min., ciepłota ciała 37,4°C, ciastowate obrzęki obu kończyn dolnych i twarzy. Badanie w przychodni, 7 dni przed przyjęciem wykazało wysokie stężenie białka w moczu (*albustix* ++++= > 20 g/L), Morfologia: Hb 105 g/L, erytrocyty 3,8 G/L, leukocyty 11,5 T/L, płytki krwi 170 T/L. Rozpoznano zespół nerczykowy.

- Jakie badania należałoby wykonać w celu uzyskania pełnego obrazu stanu pacjentki? Opisz oczekiwane zmiany w parametrach laboratoryjnych i wyjaśnij patomechanizmy obserwowanych zmian.
 - Surowica: mocznik 5,0 mmol/L, kreatynina 70 μmol/L, białko całkowite 45 g/L, albumina 19 g/L, proteinogram: albumina 40%, α₁ 2%, α₂ 38%, β 15%, γ 5%; Na 125 mmol/L, K 3,8 mmol/L, Ca 1,93 mmol/L, cholesterol 15 mmol/L, triglicerydy 7 mmol/L
 - Mocz: dobowa utrata białka 18 g/dobę, proteinogram: albumina 75%, α 3%, β 10%, γ 12%

Przypadek 2.4

Mężczyzna, lat 77 z wieloletnią arytmią i kardiomiopatią został przyjęty do szpitala z powodu bólu w klatce piersiowej. Rok wcześniej był hospitalizowany z powodu zapalenia płuc, od niedawna ma ataksję i trudności z chodzeniem. MRI wykazało dyskopatię pourazową lub infekcyjną C7 - Th1. Ciśnienie krwi 128/45 mmHg, puls 82/min, ciepłota 36,7°C. Pacjent senny, splątany, okresowo zdezorientowany. Uogólnione zmiany rumieniowate na skórze silne na twarzy i kończynach dolnych, mniej nasilone na klatce piersiowej i plecach. Pojedyncze rżenia u podstawy płuc.

- Badania laboratoryjne:
 - Krew: hemoglobina 127 g/L, płytki krwi 199 G/L, leukocyty 17,8 G/L (28% granulocyty obojętnochłonne, 3% kwasochłonne, 2% monocyty, 16% limfocyty, 17% komórki plazmatyczne, 34% niedojrzałe komórki plazmatyczne. Silna rulonizacja, OB. 122 mm/godz.
 - Surowica: białko całkowite 98 g/L, albumina 18 g/L, AST, ALT norma, ALP 159 J/L, GGTP 146 J/L, bilirubina 2,7 mg/dL, Na 128 mmol/L, mocznik 56 mg/dL. APTT 1 dzień 47 s, 2 dzień 75 s, 3 dzień 82 s.

- Mocz: hematuria +++, białko ślad, bilirubina dodatnia, azotyny dodatnie, urobilinogen (40 mg/L). Obraz mikroskopowy: eryocyty 50-75 w.p.w., bakteriuria umiarkowana, osady bezpostaciowe.
- Szpik: Obraz podobny do obwodu z 50% dojrzałych i niedojrzałych plazmocytów.
- Jakie dodatkowe badania powinny być zlecone?
 - Surowica: IgG 58 g/L, IgM 17,8 g/L, IgA 5,8 g/L; elektroforeza – immunofiksacja gammapatia poliklonalna IgG, IgA, łańcuch lekko zwiększone, pasma białkowe o ograniczonej mobilności w IgM i łańcuchach kappa.
 - Profil immunologiczny: RF 1:4; przeciwciała przeciwjądrowe (ANA) 1:1280; anty dsDNA 1419 J/mL (<99); przeciwciała przeciw rybonukleoproteinie (anty-RNP) 428 j/mL (<99); antykardiolipinowe IgG 31 j/mL, IgM >100 j/mL (<9), IgA 25 j/mL (<12)
 - Elektroforeza moczu: białko całkowite 194 mg/dL, albumina 4%, pasmo „M” nieobecnePodano sterydy niwelując obwodową plazmocytozę. Pomimo tego pacjent zmarł. Sekcji zwłok nie przeprowadzono.
- Jak jest rozpoznanie?
 - Łagodna poliklonalna plazmocytoza na podłożu autoimmunologicznym.

Przypadek 2.5

Gospodyni domowa 59 lat została przyjęta do szpitala w celu wyjaśnienia przyczyn żółtaczki. Przed 15 laty przeszła cholecystektomię z powodu kamicy. Rok i dwa lata później przeszła dwa zabiegi likwidujące wytrzewienie; w tym czasie funkcja wątroby była prawidłowa. Nie przechodziła zapaleń wątroby, ani chorób tego narządu w dzieciństwie. Nie otrzymywała transfuzji, ani nie nadużywała leków i alkoholu, nie paliła. Przed 5 laty badania kontrolne wykazały prawidłowe aktywności AST, ALT, ALP i nieznaczny wzrost GGTP 60 j/L (norma 5-25 j/L).

Przy obecnym przyjęciu stwierdzono: żółtaczkę, brzuch wzdęty, z podskórnym krążeniem obocznym, bezbolesną hepato-splenomegalię, pająkowate naczyniaki, utrudniony oddech wtórny do istniejącej puchliny brzusznej. RTG klatki piersiowej i spirometria w normie.

Badania laboratoryjne: Hemoglobina 111 g/L, płytki krwi 50 G/L, czas protrombinowy 35% (INR 3,2), czynnik V 32%, AST 75 j/L, GGTP 60 j/L, bilirubina 4,0 mg/dL, albumina 25 g/L, cholesterol 64 mg/dL.

Parametry immunologiczne: Nie wykazano wzrostu przeciwciał przeciw jądrowych, przeciw mięśniom gładkim, przeciw mitochondrialnym, przeciw reticulum endoplazmatycznemu i endotelium; nieobecne były antygeny i

przeciwciała związane z wirusowymi zapaleniami wątroby typu B, C. Prawidłowe poziomy ceruloplazminy i ferrytyny.

Elektroforeza białek surowicy wykazała niskie wartości frakcji $\alpha 1$ globulinowej 1,4%.

Puchlina brzuszna zmniejszyła się po diuretykach.

Po 6 miesiącach pacjentka wróciła z objawami pogłębionej niewydolności wątroby, zaburzeniami krzepnięcia, znaczną puchliną brzuszną i żółtaczką 7 mg/dL. Biopsja wykazała zaawansowaną mikroguzkową marskość wątroby. Chorej przeszczepiono wątrobę; nie było reakcji odrzutu przeszczepu; prowadzona ciągle immunosupresja cyklosporyna 2×100 mg/dobę, prednison 7,5 mg/dobę).

Po 5 latach badania laboratoryjne wykazują: AST 13 j/L, ALT 16 j/L, bilirubina 0,65 mg/dL, albumina 42 g/L, czas protrombinowy 96% (INR 1,1).

- Jaka mogła być przyczyna marskości wątroby? Jakie badania należałoby przeprowadzić?

Fenotyp A1AT ustalono za pomocą elektroogniskowania izoelektrycznego.

Mutację wykryto przez amplifikację egzonów 1-5 genu A1AT z następczym sekwencjonowanie produktu. Wykryto mutację punktową (GAA→GAC, Glu⁵⁷⁶→Asp) w egzonie 5 obu alleli, co zakwalifikowało do niepatogennej klasy M3. Drugą była delecja trzech nukleotydów w egzonie 2 w jednym allelu.

Tabela 2.17 Parametry A1AT u pacjentki z marskością wątroby

A1AT wartości referencyjne 1,9 – 3,4 g/L	Fenotyp	Zdolność inhibicji elastazy 17,5-31,5 kJ/L
Przed transplantacją		
12 września 1,22	M-podobny	12,3
22 września 1,14	M-podobny	9,7
10 października 1,4	M-podobny	12,0
Po transplantacji		
30 kwietnia 2,76	MM	24,7

Przyczyną marskości wątroby była heterozygotyczna postać wrodzonego niedoboru A1AT w wariantcie M3Mmalton, która cechuje się większym prawdopodobieństwem wystąpienia marskości wątroby.

Zbadano męża i córkę pacjentki.

Mąż miał fenotyp homozygotyczny SS z poziomem A1AT 1,56 g/L, natomiast córka fenotyp heterozygotyczny MS z poziomem białka 1,88 g/L. Oboje mieli aktywność anty-elastazową poniżej normy, około 15,0 kJ/L.

3. LABORATORYJNE WSKAŹNIKI CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Andrzej Szutowicz, Hanna Bielarczyk

3.1. Patomechanizmy chorób nowotworowych

Choroby nowotworowe są przewlekłymi procesami rozrostowymi o wieloletnim przebiegu. Połączenie różnych czynników środowiskowych i dziedzicznych powoduje powstanie zwiększającej się z wiekiem człowieka liczby mutacji w genomach komórek różnych tkanek. Ten proces indukcji nowotworu trwa zwykle od 15-30 lat. Odpowiednie jakościowe i ilościowe zmiany genomu powodują w końcu utratę kontroli wzrostu i podziałów komórkowych.

W ten sposób zaczyna się faza wzrostu miejscowego, która trwa od 5-10 lat. Ta z kolei przechodzi w stadium naciekania przylegających tkanek, które ciągu kilku tygodni do kilku lat przechodzi w fazę bliskich i odległych przerzutów czy to drogą układu limfatycznego czy też krwi. Ten ostatni okres uogólnionej postaci choroby prowadzi zwykle do śmierci w ciągu kilku tygodni do kilku lat. Wzrostowi liczby komórek nowotworowych, towarzyszy proces wzmożonej angiogenezy, która zapewnia unaczynienie rosnącej tkance guza. Czynnikiem sprzyjającymi zwiększonej zachorowalności na nowotwory jest wzrastająca długość życia, a co za tym idzie i ekspozycji na różne sygnały karcinogenne.

3.1.1. *Wpływ środowiska i warunków życia*

Przyjmuje się, że w rozwoju chorób nowotworowych 75% udział mają różnorodne czynniki środowiskowe, które oddziałują na ludzi podczas wieloletniego procesu indukcji guza. Są to substancje przedostające się do organizmu z przyjmowanymi płynami, pokarmami i używkami, powietrzem oddechowym, przez skórę i błony śluzowe. Obejmują one wszystko, z czym styka się człowiek, a więc produkty spożywane, pite, palone oraz ich zanieczyszczenia, przyjmowane leki, jak również narażenia zawodowe i ekspozycje środowiskowe (np. promieniowanie UV) (tabela.3.1). Czynniki środowiskowe nakładają się na określone predyspozycje wrodzone, zależne od występowania różnorodnych odmian i polimorfizmów w poszczególnych genach. W niektórych przypadkach indukcja nowotworu może przebiegać bardzo szybko. Przykładem takiego procesu są białaczki wywołane promieniowaniem jonizującym. U dzieci i noworodków spotyka się nowotwory takie jak siatkówczak czy nerczak płodowy (guz Willms'a), które są uwarunkowane specyficznymi defektami genetycznymi, odpowiednio:

- uogólnionym/dziedzicznym (40% przypadków) lub miejscowym nabytym (60%) defektem genu *RBI* w chromosomie 13;

- złośliwą transformacją licznych miejsc genomu komórek macierzystych nerek (min. trisomia chromosomu 8, 12 i 18, translokacje i delecje i szereg innych mutacji w chromosomach 7, 11, X). W 90% przypadków choroba pojawia się przez 6 rokiem życia.

Typ nowotworu niedziedzicznego oraz jego lokalizacja są często związane z określonym rodzajem oddziaływania środowiskowego takiego jak np. dym tytoniowy, który zwiększa wielokrotnie ryzyko zachorowania na raka płuc, przełyku, trzustki (tabela 3.1). Identyfikacja ekspozycji zawodowych i środowiskowych na czynniki rakotwórcze, pozwala na wyodrębnienie grup ryzyka, które powinny być poddawane odpowiednim badaniom przesiewowym w kierunku zdefiniowanego rodzaju nowotworu (tabela 3.1). Jest oczywiste, że indywidualne nie patogenne cechy genomu u poszczególnych ludzi mogą czynić ich mniej lub bardziej podatnymi na działanie karcinogennych czynników środowiskowych. Wiadomo, że osoby posiadające wysoką aktywność hydroksylazy węglowodorów aromatycznych związaną z polimorfizmem genów *CYP1A1* i/lub *CYP2D6* (genotypy HH, występują u 5-10% populacji kaukaskiej), kodujących białka z superrodziny cytochromu P450: *CYP1A1* i *CYP2D6* mają 36 razy większe szanse zachorowania na raka płuca niż osoby z niskimi aktywnościami tych enzymów (genotypy LL). Enzymy te hydroksylują wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i benzen wdychane z dymem tytoniowym do karcinogennych pochodnych hydroksylowych.

Tabela 3.1. Ekspozycja na szkodliwe czynniki środowiskowe a zachorowalność na nowotwory

Czynnik środowiskowy	Nowotwór	Test/badanie przesiewowe
Ekspozycje zawodowe i środowiskowe		
Benzydyna, barwniki azowe	Rak pęcherza	Cystoskopia, cytologia, hematuria
Sadza węglowa, produkty spalania węgla, antraceny	Rak płuc, krtani, skóry	RTG, TK, cytologia wydzieliny oskrzeli
Chlorek winylu	Mięsak wątroby	–
Azbest i minerały włókniste	Nabłoniak opłucnej	RTG, TK
Formaldehyd	Rak nosogardła, zatokowo-nosowy	Kontrola kliniczna
Oleje mineralne	Rak skóry, żołądka, jelita grubego,	Krew utajona w kale, endoskopia
Promienie X, radioterapie	Białaczki szpikowe, nowotwory skóry	Morfologia krwi
Aerozole spalin samochodowych	Raki płuc (ok. 20% przypadków)	RTG, TK, cytologia wydzieliny oskrzeli
Użytki, produkty spożywcze, leki, rozrodczość		
Tytoń	Raki płuc, przełyku, trzustki	RTG, TK, endoskopia

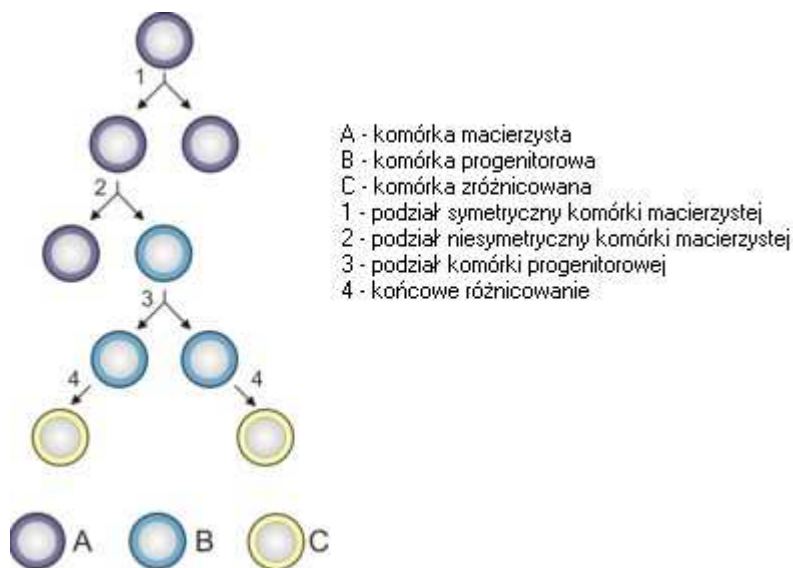
Czynnik środowiskowy	Nowotwór	Test/badanie przesiewowe
Alkohol	Raki przełyku, wątroby, piersi	Endoskopia, AFP, mammografia
Aflatoksyny (B1, B2, G1, G2)	Raki wątroby	AFP
Dioksyny(spalenie odpadów, grilowanie)	Raki przewodu pokarmowego	Endoskopia, krew utajona w kale
Nitrozoaminy	Raki nerek	Cytologia, hematuria
Chemioterapia	Różne nowotwory	–
Ciąże, higiena płciowa	Rak szyjki macicy	Cytologia
Estrogenowa terapia zastępcza	Raki piersi	Mammografia, badanie kliniczne
Otyłość, BMI>30	Raki: piersi (okres postmenopauzalny), endometrium macicy, jelita grubego, nerek, przełyku	j.w. <i>BRCA 1, 2</i>
Pasożyty, wirusy		
<i>Schistosoma haematobium</i>	Rak pęcherza moczowego	Cystoskopia, cytologia, hematuria
Wirusy zapalenia wątroby B, C	Rak wątroby	AFP
Wirus limfotropowy komórek T	Mięsak Kaposi'ego	Cytologia
Wirus opryszczki typ 8	Raki narządów rozrodczych, odbytu	Badanie kliniczne, cytologia, genetyka
Wirus brodawczaka typy 16 i 18	Rak szyjki macicy	Badanie kliniczne, cytologia, genetyka
Wirus Epsteina-Barra	Nowotwory noso-gardzieli, chłoniak Burkitta	Badanie kliniczne

3.1.2. Rola czynników genetycznych

Niektóre z nowotworów pojawiających się zarówno u dzieci jak i w późniejszym wieku rozwijają się w wyniku uszkodzenia materiału genetycznego komórek rozrodczych rodziców. Dziedziczą się one przeważnie, jako cecha dominująca autosomalna. Zalicza się do nich niektóre siatkówczaki, mnogie polipy jelita grubego, guz chromochłonny nadnerczy, zespoły mnogiej gruczolakowatości endokrynnej oraz raki piersi u nosicielek mutacji *BRCA1 i 2*. Istnieją również dziedziczne stany przedrakowe takie jak: mnoga nerwiakowłókniakowatość, stwardnienie guzowate, zespół znamienia dysplastycznego czy też wrodzone niedobory odporności, które wielokrotnie zwiększają ryzyko pojawienia się odpowiednio nowotworów skóry i układu chłonnego.

3.1.2.1. Komórki macierzyste

Większość nowotworów rozwija się w wyniku mutacji spontanicznych w komórkach macierzystych tkanek narażonych na długotrwałe działanie czynników genotoksycznych. Zmutowane komórki często giną lub/i są likwidowane przez mechanizmy odporności komórkowej. W niektórych jednak przypadkach unikają one wykrycia przez mechanizmy obronne organizmu i zaczynają proces niekontrolowanych symetrycznych podziałów na potomne nieprawidłowe komórki macierzyste, mające nieograniczoną długość życia. Z nich powstają dzielące się rakowe komórki progenitorowe, z których powstaje duża liczba nieprawidłowych nisko-zróżnicowanych, lecz nie-dzielących się komórek nowotworowych tworzących *gros* masy guza (ryc. 3.1).



Ryc. 3.1. Podziały komórki macierzystej

Tak, więc, za wzrost guza odpowiedzialne są zmutowane komórki macierzyste, stanowiące od 0,01 do 0,5% danej populacji komórek nowotworowych. Ich wykrycie oraz określenie właściwości genotypowych i fenotypowych, daje podstawy do stworzenia indywidualizowanej i skutecznej terapii nowotworów. Do chwili obecnej zidentyfikowano komórki macierzyste kilkunastu typów nowotworów (tabela 3.2).

Tabela 3.2. Komórki macierzyste w różnych typach nowotworów

Typ nowotworu	Data wykrycia komórek macierzystych	Charakterystyka fenotypowa nowotworowych komórek macierzystych/progenitorowych
Ostra białaczka szpikowa	1994	CD34 ⁺ , CD38 ⁺
Przewlekła białaczka szpikowa	1999	CD34 ⁺ , CD38 ^{neg} , CD90 ⁺
Rak sutka	2003	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , CD326(EpCAM) ⁺
Szpiczak mnogi	2003	CD138 ^{neg} , CD20 ⁺ , CD27 ⁺
Nowotwory mózgu	2004	CD133 ⁺
Rak gruczołu krokowego	2005	CD133 ⁺
Rak płuca	2005	ScA-1 ⁺ , CD45 ^{neg} , CD31 ⁺ , CD34 ⁺
Rak jelita grubego	2006	CD133 ⁺
Rak trzustki	2007	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD326(EpCAM) ⁺
Czerniak	2008	CD20 ⁺
Rak jajnika	2008	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD117 ⁺ , MYD88 ⁺ ;

Charakterystyka i właściwości antygenów komórek macierzystych: CD133, prominina-1; CD44, receptor kwasu hialuronowego; CD117, c-kit; ScA1+ antygen komórek macierzystych; CD90, Thy1; CD138, sundecan-1; CD45, PTP (*protein tyrosine phosphatase*); CD31, PECAM-1 (płytkowa cząsteczka adhezyjna); CD24, nectadrin; **CD27, TNFRSF7** [TNF receptor superfamily member 7].

Takie podejście pozwala na opracowanie skutecznych skierowanych na zniszczenie komórek macierzystych strategii terapeutycznych. Leki zawierające specyficzne przeciwciała skierowane przeciw tym antygenom są obecnie stosowane w leczeniu niektórych postaci białaczek szpikowych, raków piersi itp. Warunkiem decydującym o rozpoczęciu i skuteczności takiego leczenia jest odpowiednio precyzyjne określenie, jakie specyficzne antygeny powierzchniowe są obecne na nowotworowych komórkach macierzystych. Metodą powszechnie stosowaną w tej procedurze diagnostycznej jest cytometria przepływowa.

Natomiast prawidłowe komórki macierzyste ulegają podziałowi niesymetrycznemu na potomne komórki macierzyste i komórki progenitorowe, które bez dalszych podziałów różnicują się do dojrzałych morfologicznie i czynnościowo komórek specyficznych dla danej tkanki (ryc. 3.1).

3.1.2.2. Aberracje chromosomalne, polimorfizmy, mutacje

U podłoża wszystkich nowotworów leżą różnorodne, zwykle mnogie zmiany w genomie komórek. W przypadku nowotworów dziedzicznych stwierdza się je we wszystkich komórkach pacjenta. Ekspresja fenotypu nowotworowego u tych ludzi może przy tym pojawić się natychmiast lub krótko po urodzeniu, lub w

wieku późniejszym. W genomie ludzkim znajduje się wiele regionów szczególnie wrażliwych na karcinogenne sygnały środowiskowe.

3.1.2.2.1. Aberracje chromosomalne

Techniki specyficznego barwienia chromosomów pozwoliły zidentyfikować obecność specyficznych aberracji chromosomalnych w komórkach nowotworowych. I tak w większości chłoniaków dziecięcych oraz białaczek limfatycznych w kariotypie limfocytów B wykazano obecność translokacji pomiędzy chromosomem 8 a chromosomami 2, 14 lub 22. Powoduje to aktywację onkogenu w chromosomie 8 i jego fuzję z genami immunoglobulin. Również chromosom Philadelphia (Ph), marker genetyczny przewlekłej białaczki szpikowej, powstaje w wyniku translokacji pomiędzy chromosomami 9 i 22, co powoduje fuzję dwóch onkogenów. Wykrywanie chromosomu Ph jest ważnym elementem w diagnostyce i monitorowaniu leczenia tej choroby.

Nieprawidłowe kariotypy występują również w komórkach guzów litych. W miejscach pęknięć chromosomów znajdują się często *locus* dla onkogenów. W genomie ludzkim znaleziono kilkadziesiąt typowych miejsc pęknięć chromosomów i związanych nimi protoonkogenów.

Tabela 3.3. Rodzaje onkogenów

Klasy onkogenów	Rodzaj onkogenu
Czynniki wzrostu (onkogeny dominujące)	sis – zmutowana forma PDGF
Receptory czynników wzrostu (onkogeny dominujące)	ErbB – zmutowana forma receptora EGF
Wewnątrzkomórkowe przekaźniki (onkogeny dominujące)	src – zmutowana kinaza tyrozynowa, ras – zmutowane białko G
Czynniki transkrypcji (onkogeny dominujące)	fos – zmutowany czynnik transkrypcji AP1, myc – zmutowane białko regulujące transkrypcję
Antyonkogeny (onkogeny recesywne)	Rb (retinoblastoma), P53 (zespół Li-Fraumeni) – liczne nowotwory różnych tkanek BRCA1 i BRCA2 – nowotwory sutka APC, MCC, DCC – nowotwory jelita grubego i odbytu

PDGF– płytkowy czynnik wzrostu; EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu

W okolicy pęknięcia występują mutacje punktowe lub inne uszkodzenie DNA, które w połączeniu z translokacją pękniętych chromosomów mogą prowadzić do zmniejszenia ich supresji, z następczą aktywacją i amplifikacją.

Przemawia to za aktywnym udziałem onkogenów w powstawaniu i postępie choroby nowotworowej. Zidentyfikowano już dużą liczbę onkogenów i ich produktów (tabela 3.3). Białka będące produktami zmutowanych genów tracą swoje biologiczne właściwości, lub nabywają nowych, które promują niekontrolowany wzrost komórek guza. Wiadomo, że niektóre z nich interferują z mechanizmami regulacji poziomu czynników troficznych, inhibitorów wzrostu, oraz ich receptorów, przez co zakłócają procesy dojrzewania komórek macierzystych. W wyniku tych zmian ulegają one transformacji do macierzystych komórek guza.

3.1.2.2.2. Polimorfizmy genów

Zarówno u zwierząt jak i u ludzi loci DNA kodujące to samo białko mogą występować w kilku i wariantach, różniących się pojedynczymi lub wieloma zasadami. Zjawisko związane z obecnością w danym locus dwóch lub więcej różnych alleli, które występują częściej niż u 1% populacji, nosi nazwę polimorfizmu. Nie odnosi się przy tym ono do skutków, jakie on wywołuje. Polimorfizm może mieć zarówno negatywny jak i pozytywny wpływ na daną cechę fenotypową. Odnosi się on do wszystkich rodzajów patologii, nie tylko do chorób nowotworowych.

S-transferazy glutationu (S-TG) stanowią rodzinę kilkunastu izoenzymów sprzęgających różne karcinogenne ksenobiotyki z glutationem, czyniąc je mniej toksycznymi. Jednym z nich jest izoenzym S-GT1, który nie występuje u 40-45% ludzi rasy kaukaskiej. Wiąże się on z genotypem *GSTM1* *-/-*. Nosiciele tej cechy wykazują zwiększone ryzyko zachorowania na raka owsianokomórkowego oskrzeli oraz na raka żołądka, jelita grubego, pęcherza moczowego i krtani.

Synteza estrogenów w jajniku jest kontrolowana przez hormon luteinizujący (LH) za pośrednictwem specyficznego receptora LHR sprzężonego z białkami G. Istnieje siedem postaci polimorficznych tego receptora. Okazuje się, że homozygotyczne nosicielki polimorfizmu genu *LHR18insLQ*, nie chorują na raka piersi częściej niż nosicielki innych polimorfizmów *LHR*, lecz choroba pojawia się u nich o 8 lat wcześniej i ma cięższy przebieg.

W populacji azjatyckiej, polimorfizm polegający na dużej liczbie powtórzeń GT w promotorze genu oksydazy hemowej-1 (*HO-1*) zwiększa wrażliwość ich na karcinogenne działanie pieprzu do żucia areca. Natomiast przy małej liczbie powtórzeń GT obserwuje się produkt genu, który wywiera działanie ochronne na konsumentów tej używki.

Jak dotąd wykazano modyfikujący wpływ polimorfizmów genów na zapadalność i przebieg przynajmniej kilkudziesięciu chorób nowotworowych. Między innymi wykazano istnienie powiązań polimorfizmu genów: N-acetylotransferazy-2 (*NAT-2*) z występowaniem sporadycznych raków jelita grubego i odbytnicy. Polimorfizmy urokinazowego aktywatora plazminogenu (*uPA*) i jego receptora (*uPAR*) oraz inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (*PAI-1*) mogą

wiązać się z większą częstością zachorowań na raki jamy ustnej osób pochodzenie azjatyckiego żujących tytoń lub owoce areca, Szereg raków u osób z wysoką ekspresją PAI-1 wykazuje cięższy przebieg i gorsze rokowanie. Dotyczy to między innymi raków jąder, piersi, jajnika, przełyku, żołądka, jelita grubego, pęcherza moczowego, oraz różnych glejaków i mięsaków.

3.1.2.2.3. Mutacje

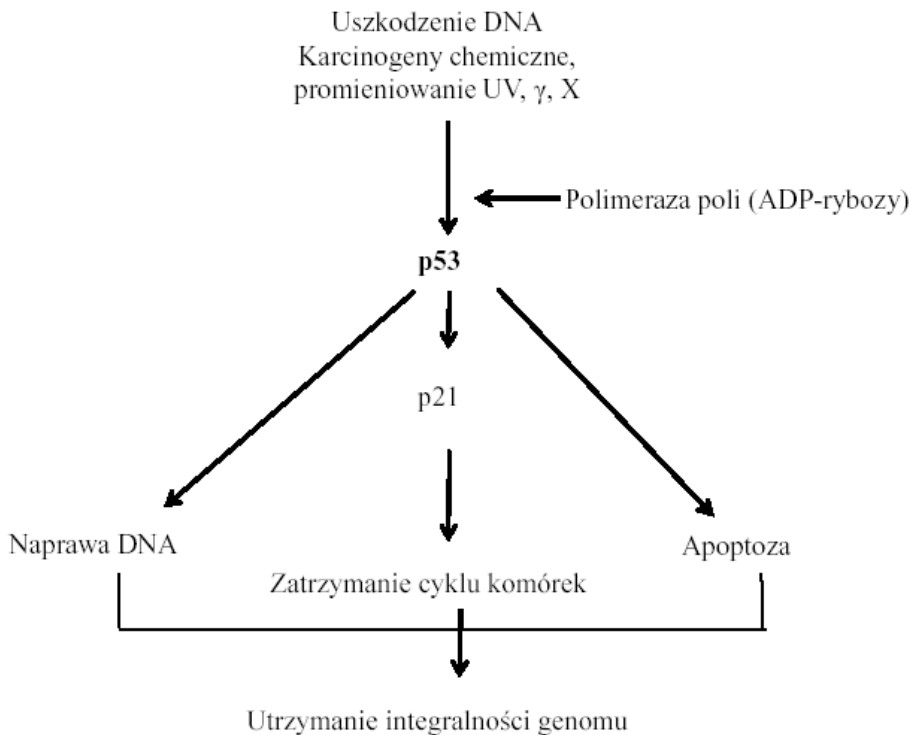
Większość nowotworów rozwija się na podłożu akumulujących się z wiekiem sporadycznych mutacji komórek macierzystych tkanek dotkniętych tymi patologiami. Zwykle potrzebne jest pojawienie się defektów kilku genów (onkogenów), aby nowotwór zaczął się rozwijać. Mutacje punktowe, delecje domen onkogenów w połączeniu z translokacją chromosomów mogą prowadzić do zniesienia supresji szeregu genów związanych z regulacją cyklu podziałowego komórek. Produkty uszkodzonych genów, lub ich wzrost czy też brak, powodują zmiany poziomu określonych substratów białkowych takich jak czynniki wzrostowe i receptory czynników wzrostowych, białka o aktywności kinaz tyrozynowych, GTPaz (białko p21), jak również białka G. Istotnie, zmutowane białko p21 ma zdolność przyspieszania metabolizmu fosfatydyloinozytolu w komórkach nowotworowych.

Jedną z mutacji występującą w ponad połowie wszystkich nowotworów jest mutacja genu *TP53* znajdującego się w krótkim ramieniu chromosomu 17(p13.1). Prawidłowy produkt tego genu białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za reakcje komórki na różne bodźce stresowe (uszkodzenie DNA, niedotlenienie, promieniowanie UV i jonizujące). W nieuszkodzonej komórce p53 tworzy nieaktywny kompleks z białkiem MDM2, które zwiększa jego ubikwitynację i degradację w proteasomach. W warunkach stresu N-terminalny koniec p53 jest fosforylowany przez zaktywowane kinazy białkowe. Ufosforylowane p53 nie ulega ubikwitynacji, co wydłuża czas jego życia, a co za tym idzie zwiększa jego poziom wewnątrz komórki. Białko to stabilizuje i ułatwia naprawę DNA poprzez zahamowanie proliferacji komórek. Z drugiej strony zapoczątkowuje proces apoptozy, który eliminuje uszkodzone genetycznie komórki, w tym i komórki nowotworowe (ryc. 3.2).

Biologiczne efekty p53 są modulowane przez dwa inne czynniki transkrypcyjne z tej rodziny p63 i p73. Wykazano interakcję p53 z około 100 innymi czynnikami transkrypcyjnymi i białkami regulatorowymi (BRCA 1 i 2, CREB1, GSK3 β , PARP, S100B, ubikwityna itp.).

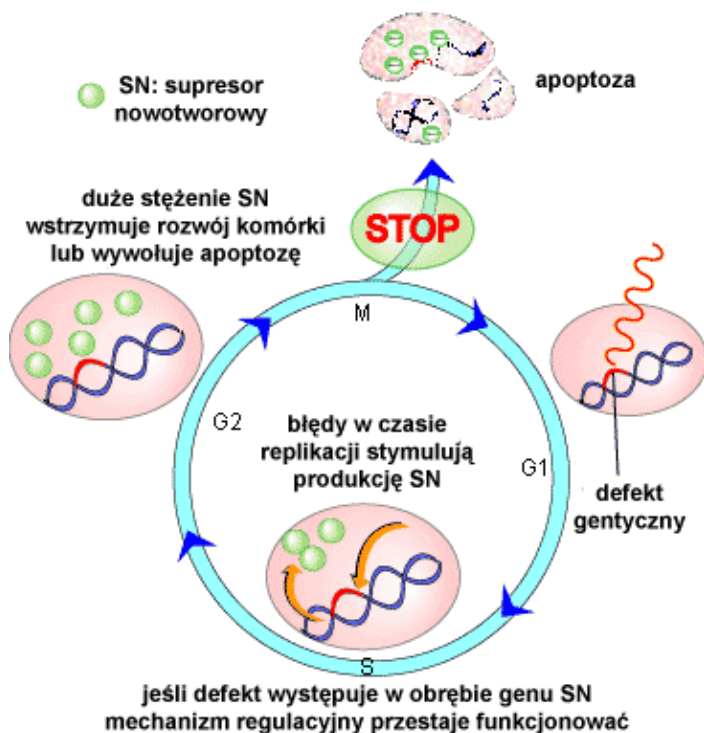
Gen *TP53* wykazuje jednak wyjątkową labilność niemal każdego kodonu. Znane jest około 30000 mutacji i delecji tego genu. Wiele z nich powoduje powstawanie białka p53 o obniżonej aktywności lub też całkowity jego brak. Z tego powodu komórki nowotworowe pozbawione tego czynnika wykazują niepohamowaną proliferację i nie podlegają apoptozie (ryc. 3.4). Wykazanie obecności sporadycznych mutacji genu *TP53*, jak i innych genów wymaga

wykonania biopsji lub pobrania wycinka guza podczas zabiegu operacyjnego. Nie ma, więc znaczenia przy wykrywaniu nowotworów. Może natomiast mieć znaczenie przy wyborze optymalnych dla danego guza metod terapeutycznych opartych o nowoczesne leki skierowane przeciw określonym antygenom powierzchniowym.

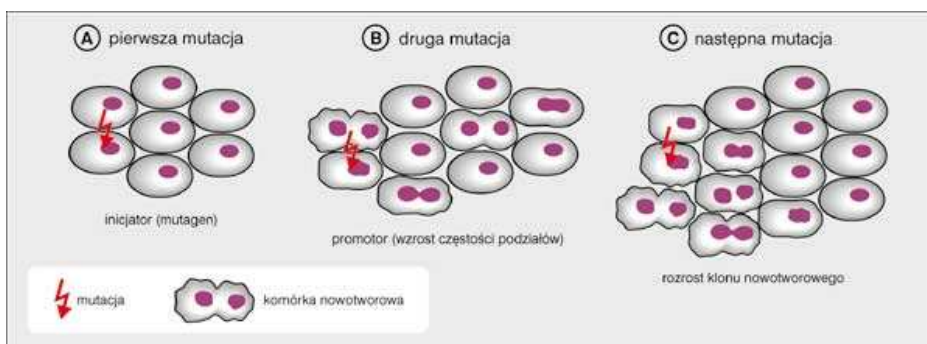


Ryc. 3.2. Białko p53 jako regulator życia i śmierci

Przykłady innych mutacji zostały omówione w podrozdziałach dotyczących polimorfizmów i czynników środowiskowych w chorobach nowotworowych.



Ryc. 3.3. Regulacja apoptozy przez geny supresorowe. Niskie stężenie białka, które koduje supresor nowotworowy (np. białko p53), wstrzymuje cykl komórkowy, a aktywuje mechanizm naprawczy DNA. Jeśli białko to występuje w dużym stężeniu, to cykl komórkowy jest całkowicie zamykany i aktywowana jest apoptoza. Gdy te geny nowotworowe są zmutowane (czyli dysfunkcyjne), komórka nie może podlegać ani naprawie, ani apoptozie. Prowadzi to do rozwoju nowotworu.



Ryc. 3.4. Model powstawania nowotworu

3.1.3. Mechanizmy immunologiczne

Prawdopodobieństwo zapadnięcia na chorobę nowotworową znacznie zwiększa się u ludzi z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności (tom II, rozdz. 2). Te ostatnie, w szczególności nowotwory układu chłonnego, mogą być indukowane podawaniem leków, w tym leków immunosupresyjnych, uszkadzających układ siateczkowo-śródbłonkowy, czy też zakażeniami wirusowymi. U osób z nabytym zespołem niedoboru odporności AIDS pojawiają się rzadko spotykane w populacji ogólnej mięsaki Kaposhi'ego czy też pierwotne chłoniaki mózgu. Jest to wynik eliminacji limfocytów T przez zakażający je ludzki wirus limfotropowy (HIV).

Również u chorych po przeszczepach nerki i innych narządów wskutek napromieniania przed zabiegiem oraz ciągłej immunosupresji po zabiegu, prawdopodobieństwo wystąpienia chorób nowotworowych zwiększa się kilkadziesiąt razy.

Immunologiczne mechanizmy obronne organizmu w stosunku do nowotworów polegałyby na ich rozpoznaniu, jako obcych i niszczeniu przez wrodzone i nabyte mechanizmy odpornościowe wskutek zmienionego składu ich antygenów powierzchniowych. Jest to możliwe dzięki współdziałaniu limfocytów T, B, NK oraz makrofagów. Zmieniona antygenowość komórek guza miałaby stymulować cytotoksyczne i humoralne reakcje tych komórek w stosunku do guza. Jednakże większość komórek nowotworowych nie posiada antygenów powierzchniowych na tyle różnych od komórek prawidłowych by stymulować cytotoksyczne i immunologiczne reakcje obronne. Również uwalniane z komórek nowotworowych krążące antygeny mogą blokować przeciwciała lub/i receptory komórek układu odpornościowego. Co więcej gęstość antygenów powierzchniowych i szybkość ich uwalniania z ginących komórek nowotworowych mogą ulegać znacznym zmianom w przebiegu choroby. Te dwa mechanizmy znacznie utrudniałyby niszczenie rozsiewających się macierzystych i progenitorowych komórek nowotworowych. Za tą hipotezą przemawia zwiększenie stężenia kompleksów immunologicznych obserwowane w miarę wzrostu i rozsiewu guza. Znaczne rozrzuty stężeń tych kompleksów w osoczu, w poszczególnych przypadkach nowotworów uniemożliwiają użycie tego parametru pomiarowego w celach diagnostycznych. Jednakże, w indywidualnych przypadkach seryjne oznaczenia stężenia tych kompleksów mogą stanowić wskaźnik progresji lub regresji choroby nowotworowej.

Limfocyty NK jak również makrofagi są zdolne do eliminacji szerokiego spektrum komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*. Ich aktywacja nie wymaga ani uprzedniego kontaktu (priming) ani pamięci immunologicznej. Czynnikiem cytotoksycznym w tych przypadkach są cytokiny prozapalne (interleukina 1 β , interleukina 6, czynnik martwicy nowotworów α (TNF α) itp.) wydzielane przez makrofagi i limfocyty przylegające do powierzchni komórek nowotworowych. Ten mechanizm cytotoksyczności ma więc charakter parakryny.

Z kolei szereg białek frakcji α -globulinowych wykazuje działanie immunosupresyjne. Właściwości takie wykazują między innymi: α_1 -antytrypsyna, α_2 -makroglobulina oraz białko płodowe α (AFP). Ich poziomy mogą wzrastać w zaawansowanych stadiach chorób nowotworowych, jako wyraz odpowiedzi zapalnej organizmu na zwiększającą się masę guza.

Jednakże, sprawność układu immunologicznego jest tylko jednym z wielu czynników zabezpieczających organizm przed inwazją nowotworową. Wskazuje na to fakt, że niedoborom immunologicznym, towarzyszą nowotwory układowe z dominacją chłoniaków i białaczek (70%), które stanowią mniej niż 5% ogółu nowotworów.

Rozrost nowotworów powoduje powstawanie zmian w tkankach i składzie płynów ustrojowych, które mogą być użyteczne w diagnozowaniu i monitorowaniu przebiegu choroby nowotworowej i jej leczenia. W niektórych przypadkach zjawisko to może być niezwykle przydatne we wczesnej diagnostyce chorób nowotworowych, jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych. Do takich badań zalicza się przesiewowe badania cytologiczne wymazów z dróg rodnych, oddechowych czy też krwi utajonej w kale w przypadku nowotworów końcowych odcinków przewodu pokarmowego. Z kolei wykrycie wrodzonych aberracji chromosomalnych czy też polimorfizmów i mutacji genów może być przydatne dla wczesnego rozpoczęcia leczenia lub/i działań zapobiegawczych w przypadkach nowotworów dziedzicznych.

Większość opisanych niżej markerów chorób nowotworowych pojawia się w wyniku ich wydzielania lub uwalniania z uszkodzonych komórek guza. Mogą one również ulegać zmianom wskutek miejscowego wpływu guza na otaczające tkanki jak również z jego działania ogólnoustrojowego. Zarówno czułość jak i specyficzność większości markerów uznaje się za niewystarczającą. Niemniej w połączeniu z danymi z wywiadu i obrazem klinicznym pacjenta stanowią one integralną składową procesu wykrywania i leczenia chorób nowotworowych.

3.2. Efekty metaboliczne i endokrynne nowotworów

Uszkodzenie przez guz czy też jego ogniska przerzutowe różnych narządów jak również jego wpływ na stan ogólny pacjenta może powodować zmiany wielu laboratoryjnych parametrów w płynach ustrojowych. Zmiany te, jako takie nie są charakterystyczne dla nowotworu, lecz dla uszkodzenia danej tkanki przez jakikolwiek toczący się w niej proces chorobowy. Bilirubinemia może być wskaźnikiem zarówno kamicy przewodów żółciowych, anemii hemolitycznej jak i raka głowy trzustki czy przewodów żółciowych. Bardzo często niespecyficzne, ogólne objawy takie jak ból głowy, stany podgorączkowe, anemia, hipoproteinemia, wysokie OB okazują się być pierwszymi objawami choroby nowotworowej, z którymi pacjent zgłasza się do lekarza. Częstość występowania tych zmian jest przy tym mała w początkowych okresach choroby nowotworowej zwiększając się do 100% w jej zaawansowanych stadiach.

W zależności od rodzaju nowotworu częstość występowania zmian w podstawowych badaniach laboratoryjnych może być różna. Niemniej u każdego pacjenta w wieku powyżej 50 lat takie zmiany laboratoryjnych parametrów pomiarowych powinny być brane pod uwagę w diagnostyce różnicowej chorób nienowotworowych od nowotworowych (tabela 3.4)

Tabela 3.4. Częstość występowania zmian podstawowych laboratoryjnych parametrów pomiarowych płynów ustrojowych w różnych chorobach nowotworowych, o różnym stopniu zaawansowania, rozpoznawanych podczas pierwszej wizyty u lekarza

Nowotwór	Anemia	Wysokie OB	Krwinki/krew w wydalinach	Inne zmiany
	Procent ogólnej liczby przypadków			
Rak oskrzeli	12	-	45**	Hipokalemia, zasadowica metaboliczna, zesp. Eaton-Lambert , p-ciała przeciw bramkowanym napięciem kanałom Ca
Rak okrężnicy i odbytu	37	50	88	-
Rak żołądka	70	65	92	Achlorhydria 76
Szpiczak mnogi	84	93	NZ	Hiperproteinemia 72, hiperkacemia 50
Rak trzustki	38	86	59	Wzrost FALK. 62, bilirubiny 62
Rak nerek	40(1-5*)	53	61	Wzrost FALK 15
Rak gruczołu krokowego	-	-	-	Wzrost kreatyniny, mocznika, Ca w surowicy
Mięśniaki macicy	-	-	Obfite, przedłużające się miesiączki	-

* w 1-5% przypadków raków nerek syntetyzuje erytropoetynę; w takich przypadkach stwierdza się policytemię.

** krwioplucie, NZ – nie ma zastosowania

Poziom białka całkowitego i albuminy w surowicy obniża się zwykle w zaawansowanych stadiach choroby nowotworowej. Może to być spowodowane utratą łaknienia, zaburzeniami wchłaniania, zahamowaniem syntezy w zniszczonej przez raka pierwotnego lub przerzuty wątrobie, a także zwiększoną utratą i hiperkatabolizmem. Z drugiej strony podobne zmiany mogą występować w różnych chorobach nienowotworowych takich jak zespół nerczycowy, wrzodziejące zapalenie jelit czy alkoholowa marskość wątroby itd.

Zmiany te w połączeniu z obrazem klinicznym, obciążającym wywiadem (nowotwory u krewnych, ekspozycja środowiskowa, utrata wagi itp.) powinny

stanowić sygnał do wdrożenia ukierunkowanego postępowania różnicowo-diagnostycznego.

Specyficzną grupę tworzą nowotwory gruczołów wewnętrznego wydzielania. Względnie niska złośliwość rozrostowa tych guzów kojarzy się w ich nadmierną i niepoddającą się kontroli aktywnością hormonalną. Może to powodować poważne ogólnoustrojowe zaburzenia metaboliczne już przy stosunkowo małej masie guza (tabela 3.5). Komórki te, przeważnie gruczolakoraki, należą często do tzw. układu APUD (*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*) i mają zdolność wychwytu i dekarboksylacji prekursorów amin biogennych. Mogą rozwijać się zarówno obrębie gruczołów wydzielania wewnętrznego jak i ekotopowo.

3.2.1. *Hiperkalcemia*

Hiperkalcemia występuje w około 10% przypadków nowotworów. W większości przypadków jest ona związana z przerzutami do kości takich nowotworów jak raki prostaty, piersi, lub rozwijającymi się w kościach takimi jak szpiczak mnogi. W przypadku innych nowotworów jest ona indukowana humoralnie przez pobudzenie aktywność osteoblastów przez parathormon lub peptyd parathormono-podobny (PTHrP). Hiperkalcemia z hipofosfatemią i fosfaturią bez przerzutów do kości są typowymi objawami hiperparatyreo-idyzmu pierwotnego spowodowanego gruczolakiem lub gruczolakorakiem przytarczyc. Podobne zmiany mogą powodować niektóre raki płaskonabłonkowe oskrzeli, raki piersi, nerek, głowy i szyi wydzielające PTHrP. Z kolei sarkoidoza może powodować hiperkalcemię wskutek nadmiernej syntezy witaminy 1,25 hydroksy-D₃. Możliwe jest również współistnienie przerzutów kostnych i pierwotnego hiperparatyreo-idyzmu, lub też ekotopowego wydzielania PTHrP. Pseudohiperkalcemia może występować w makroglobulinemii Waldenstrom'a wskutek wiązania wapnia przez monoklonalne IgM. Dlatego nie ma korelacji między rozległością zmian kostnych, a stopniem hiperkalcemii.

W diagnostyce różnicowej hiperkalcemii z powodu pierwotnego hiperparatyreo-idyzmu i przerzutów do kości pomocne może być oznaczanie N-terminalnego PTH, którego poziom w surowicy jest obniżony w rakach przerzutowych, a w pobliżu górnej granicy lub powyżej normy w pierwotnym hiperparatyreo-idyzmie. Natomiast poziom C-końcowego PTH w obu przypadkach może być w górnych przedziałach lub powyżej zakresu wartości referencyjnych. Hiperkalcemia może hamować reabsorbcję zwrotną K w kanalikach nerkowych. Stąd częste współistnienie hiperkalcemii z hipokalemią.

3.2.2. *Hiponatremia (zespół nieodpowiedniego wydzielania ADH)*

Omawiany zespół (SIADH – *Syndrome of Inappropriate AntiDiuretic Hormone secretion*) daje objawy neuropsychiatryczne wskutek obrzęku mózgu spowodowanego retencją wody i hiponatremią. Towarzyszy on różnym nowotworom złośliwym wydzielającym ektopowo ADH takim jak: rak drobnokomórkowy płuc, dwunastnicy, trzustki, macicy, pęcherza moczowego, prostaty oraz grasiczaki i złośliwe chłoniaki. Znacznie więcej łagodnych hiponatremii może pojawiać się w nienowotworowych infekcyjnych chorobach płuc, dychawicy oskrzelowej i odmie. Również patologie (guzy śródpiersia), które wskutek ucisku zmieniają ciśnienie w naczyniach płucnych mogą poprzez baroreceptory stymulować wydzielanie ADH. Podobne reaktywne zmiany mogą wywoływać urazy i zmiany zapalne w mózgu, niedotlenienie czy stwardnienie rozsiane. Rozpoznanie SIADH wymaga współistnienia trzech objawów, do których zalicza się:

- -hiponatremia (<135 mmol/L) i hipoosmia (<270 mosm/kg H₂O)
- -osmolalność moczu wyższa niż osocza nawet przy próbie obciążenia wodą (wynika to z braku sprzężenia zwrotnego między osmolalnością a wydzielaniem ADH)
- -względnie wysokie stężenia Na w moczu (>20 mmol/L), wskutek nadmiernego wzrostu objętości przestrzeni pozakomórkowej i wzrostu wydzielania przedsionkowego czynnika natriuretycznego

Obserwuje się również, wtórne zmiany w innych badaniach laboratoryjnych wynikające z rozcieńczenia krwi takie jak obniżenie stężenia mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego, białka całkowitego, hematokrytu i liczby erytrocytów.

3.2.3. *Hipokalemia (hiperkortyzolemia)*

Hipokalemia jest częstym zjawiskiem w szerokim spektrumie nie nowotworowych stanów chorobowych związanych z niewydolnością sercowo-naczyniową, hipowolemią w różnych zespołach utraty białka itp. (tom I, rozdz. 6; tom II, rozdz. 6). Niewielki odsetek przypadków hipokalemii jest spowodowany hiperkortyzolemią spowodowaną nadmiernym wydzielaniem ACTH przez gruczolaki przysadki, ekotopową produkcją ACTH przez raki drobnokomórkowe oskrzeli, rzadziej przez rakowiaki płuc, nowotwory grasicy lub trzustki oraz gruczolaki kory nadnerczy. Większość pacjentów ma stężenie K w surowicy $<3,0$ mmol/L, zasadowicę metaboliczną z HCO₃ >30 mmol/L oraz wysoki poziom kortyzolu (>1100 nmol/L). Klinicznie pacjenci ci prezentują obraz zespołu Cushinga. Ekotopowa produkcja ACTH stanowi przyczynę około 20% przypadków tego zespołu. Przy szybkim wzroście nowotworu kliniczne zmiany cushingoidalne mogą nie występować pomimo wyraźnych zmian parametrów laboratoryjnych. Ektopowe wydzielanie ACTH należy różnicować z

chorobą Cushinga spowodowaną przez gruczolaki przysadki mózgowej (Tom I, rozdz. 10, tabela 10.5). Wymienione zmiany parametrów laboratoryjnych w połączeniu z testem hamowania deksametazonem i badaniem obrazowym w tomografii komputerowej decydują o rozpoznaniu (tom I, rozdział 10).

3.2.4. Hipoglikemia i hiperglikemia

Hipoglikemia nowotworowa jest typowym objawem łagodnych gruczolaków komórek beta wysepek trzustki – *insulinoma*. Może to być pojedynczy gruczolak (80-90% przypadków) lub guzy mnogie wychodzące z wysepek trzustki. Guz ten stanowi również część dziedzicznego zespołu mnogiej gruczolakowatości endokrynnej typu I (tom I, rozdz. 6). Hipoglikemię mogą również powodować guzy mezenhymalne o zróżnicowanej złośliwości rodzaju *fibrosarcoma*, *neurofibroma*, *mesotelioma*, *hemangiopericytoma*, zwykle zlokalizowane pozaotrzewnowo. Występuje ona również w niewielkim procencie guzów pochodzenia epithelialnego: hepatoma, guz Willmsa, rakach stercza, piersi, szyjki macicy, a także w rakowiakach. Diagnostyka różnicowa hipoglikemii nowotworowej została opisana wcześniej (tom I, rozdział 12).

Hiperglikemia może również mieć podłoże nowotworowe w postaci różnego typu gruczolaków wydzielających hormony glukoneogenetyczne. I tak, przyczyną nietolerancji glukozy lub cukrzycy mogą być *glukagonoma* (100% przypadków), różne postaci zespołu Cushinga (85%), akromegalia (25%) lub guz chromochłonny nadnerczy (40%).

Tabela 3.5. Zmiany w badaniach laboratoryjnych wywołane przez nowotwory hormonalnie czynne rozwijające się eutopowo i ektopowo

Syntetyzowany hormon	Nowotwór	Inne parametry pomiarowe
ACTH/kortyzol	Gruczolaki przysadki, kory nadnerczy, raki oskrzeli, rakowiaki	Surowica: K^+ ↓ HCO_3^- ↑, glukoza ↑, kortyzol ↑ Mocz: kortyzol, 17-ketosterydy ↑
ADH	Rak owsianokomórkowy oskrzeli (50%), raki płuc, trzustki	Surowica: Na^+ ↓, inne wskaźniki przewodnictwa izotonicznego. Mocz: nieodpowiednie zagęszczanie
Aldosteron	Gruczolak kory nadnerczy	Surowica: aldosteron ↑, hipokalemia
Aminy biogenne (adrenalina)	Neuroblastoma	Mocz: kwas homowanilinowy (HVA) ↑
Erytropoetyna	Guzy nerek	Policytomia

Syntetyzowany hormon	Nowotwór	Inne parametry pomiarowe
Glukagon	Nowotwór wywodzący się z komórek A trzustki (glukagonoma)	Surowica: glukagon (ponad 1000 pg/mL) ↑, glukoza ↑, kalcytonina ↑
Gastryna	Guzy komórek nie-β wysepek trzustki, przerost komórek G żołądka	Surowica: gastryna ↑
HCG	Nabłoniak kosmówkowy, guzy jader, gruczołów piersiowych, jajnika	Surowica: β-HCG ↑
Hormon wzrostu	Guz somatotropinowy	Surowica: hormon wzrostu (GH) ↑, IGF ↑
Kalcytonina	Rak komórek C tarczycy (MEN)	Surowica: kalcytonina ↑
Katecholaminy	Guz chromochłonny nadnerczy, zwojaki współczulne	Mocz: kwas 4-hydroksy-3-metoksy-mandelinowy (kwas wanilino-migdałowy) ↑ (VMA)
NSILA	Guzy mezenhymalne	Surowica: glukoza ↓, insulina N
PTH	Gruczolak przytarczyc, rak przyszczyc	Surowica: PTH ↑, Ca ↑, Pi ↓
PTHrP	Rak płaskonabłonkowy płuc, nadnerczak	Surowica: Ca ↑, Pi ↓, Falk (frakcja kostna) ↑, PTH-C ↑, PTH-N N
Serotonina	Rakowiaki jelit (przerzuty do wątroby)	Mocz: kwas 5-hydroksy-indoloctowy
TSH/T3/T4	Gruczolak przysadki, gruczolak toksyczny tarczycy	Surowica: tyroksyna ↑

3.2.5. *Anemia i policytomia*

Anemia jest częstym objawem chorób nowotworowych, pojawiającym się zwykle w późnych i zaawansowanych ich stadiach. Wynika to z kombinacji różnych, związanych z rozwojem nowotworu czynników hamujących erytropoezę, czy też zwiększających utratę lub/i rozpad krwinek czerwonych takich jak spadek łaknienia, zaburzenia wchłaniania, niedobory dietetyczne, uszkodzenie szpiku kostnego przez komórki guza lub chemio/radioterapię, stany hiperkataboliczne i krwawienia. Częstość występowania anemii zależy od typu nowotworu, jego pierwotnej lokalizacji, szybkości wzrostu i przerzutowania. Nadkrwistość jest dużo rzadszym objawem towarzyszącym nowotworom. Występuje ona w 1-5% raków nerek wychodzących z ich komórek endokrynnych. Rzadko nadkrwistość występuje z pierwotnymi rakami wątroby, płuc lub włókniami macicy.

3.2.6. Serotonina

Wysokie stężenia serotoniny (5-hydroksytryptamina) w surowicy są spowodowane przez rakowiaki – guzy wywodzące się z komórek chromafinowych jelita cienkiego, wyrostka robaczkowego, dróg żółciowych i oskrzeli. Amina ta jest syntetyzowana z tryptofanu w reakcjach hydroksylacji i dekarboksylacji a po wydzieleniu degradowana do kwasu 5-hydroksy-indoloocetowego (5-HIAA).

Guz występuje dość często. Nieselekcjonowane badania sekcyjne wykazały, że występuje on u 1% populacji. Jednakże objawy kliniczne w postaci zespołu rakowiakowatego: gwałtownego zaczerwienienia i swędzenia skóry, pelagry, biegunek i prawokomorowej niewydolności serca występują w niewielkim odsetku przypadków nowotworu. Wynika to z jego najczęstszej lokalizacji w krążeniu wrotnym, z którego krew przepływając przez wątrobę jest oczyszczana z serotoniny poprzez jej wychwyt i przemianę do kwasu 5-HIAA. Dopiero po powstaniu przerzutów poza krążeniem wrotnym pojawiają się podane wyżej objawy kliniczne, które po około 20 latach mogą prowadzić do zejścia śmiertelnego. Chorzy z rakowiakami wydalają z moczem powyżej 25 mg 5-HIAA w ciągu doby (wartości referencyjne < 6 mg/dobę). W przypadkach wartości granicznych należy badanie powtórzyć, eliminując z diety składniki zwiększające jego poziom takie jak banany, czekoladę, ananasy, awokado, rezerpinę. Niekiedy niski poziom 5-HIAA wynika z niedoborów enzymów degradujących serotoninę. W takich przypadkach, gdy objawy klinicznej nasuwają podejrzenie obecności zespołu rakowiaka, powinno być wykonane oznaczenie poziomu serotoniny i 5-hydroksytryptofanu we krwi.

3.2.7. Aminy biogenne

Guzy chromochłonne nadnerczy (*pheochromocytoma*) pochodzące z komórek chromafinowych są nowotworami łagodnymi wydzielającymi nadmierne ilości noradrenaliny i/lub adrenaliny. Około 10% tych gruczolaków ma lokalizacje ekotopową. Są one jedną z przyczyn nadciśnienia o charakterze napadowym. Adrenalinę oraz dopaminę mogą syntetyzować zwojaki współczulne (*neuroblastoma*), nowotwory występujące u małych dzieci. Zlokalizowane są one w 40% przypadków w rdzeniu nadnerczy, a pozostałe w różnych miejscach układu współczulnego. Nie wywołują one nadciśnienia w związku z wydzielaniem dopaminy.

Diagnostyka laboratoryjna *pheochromocytoma* opiera się, po wykluczeniu innych przyczyn nadciśnienia, na oznaczaniu w moczu dobowym poziomu kwasu wanilino-migdałowego (VMA), będącego produktem degradacji noradrenaliny. Natomiast w przypadku *neuroblastoma* zwiększeniu ulegać będzie wydalanie kwasu homowanilinowego (HVA) – produktu przemiany dopaminy. Przed rozpoczęciem zbiórki moczu należy wyeliminować z diety herbatę, kawę,

czekoladę, banany oraz leki zawierające pierścień katecholowy. W przypadku wartości granicznych należy zbierać mocz porcjowo lub bezpośrednio po incydencie wzrostu ciśnienia.

3.2.8. *Gastryna*

Wzrost stężenia tego hormonu jest spowodowany przez *gastrinoma*, wychodzący z komórek nie-beta wysepek trzustki, jak również komórek G dwunastnicy lub żołądka. *Gastrinoma* występuje zarówno w formie guza pojedynczego jak i drobnych guzków mnogich. Około połowy pojedynczych guzów jest złośliwa i daje przerzuty do wątroby i węzłów chłonnych. W 25% stanowią one część zespołu mnogiej gruczolakowatości endokrynej.

Hipergastrynemia prowadzi do aktywacji wydzielania jonów H^+ przez komórki G żołądka. Powoduje to powstanie ciężkich niepoddających się leczeniu mnogich wrzodów żołądka i dwunastnicy – zespołu Zollinger-Ellison. Powoduje to silne bóle brzucha, zahamowanie lipolizy i biegunki ze stolcami tłuszczowymi. Poziom gastryny na czczo kilkanaście razy przekracza górny zakres wartości referencyjnych. Przy granicznych stężeniach gastryny w rozpoznaniu pomaga test obciążenia sekretyną podaną dożylnie w ilości 1-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masy ciała. U osób z zespołem Zollinger-Ellison po 10 min obserwuje się wzrost poziomu gastryny. W przypadkach choroby wrzodowej na innym tle sekretyna obniża lub nie zmienia poziomu gastryny w surowicy.

3.2.9. *Kalcytonina*

Kalcytonina jest hormonem syntetyzowanym przez komórki C tarczycy. Jest 32 aminokwasowym peptydem, produktem genu *CALCA* w chromosomie 11p15.2. Jej poziom wzrasta bardzo znacznie w hiperplazji, gruczolakach oraz rakach komórek C. W przypadkach podejrzenia istnienia tego nowotworu przy prawidłowych poziomach kalcytoniny należy wykonać test dożylnego obciążenia pentagastryną (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wagi). W przypadku obecności nowotworu w 2-giej minucie po stymulacji poziom kalcytoniny wzrasta przynajmniej 10-krotnie. U ludzi zdrowych nie przekracza on 5 razy. W diagnostyce raka rdzeniastego czułość tego badania wynosi niemal 100%. Rak rdzeniasty jest częścią dziedzicznego zespołu mnogiej gruczolakowatości endokrynej typu IIA lub IIB (patrz 3.2.10). Dlatego w przypadku jego zdiagnozowania należy przebadać w tym kierunku krewnych pacjenta. Jednakże, jedynie 25% raków rdzeniastych tarczycy to nowotwory dziedziczne.

3.2.10. Zespoły mnogiej gruczolakowatości endokrynnej

Zespoły mnogiej gruczolakowatości endokrynnej (MEN – *Multiple Endocrine Hyperplasia*) charakteryzują się jednoczesnym występowaniem patologicznej nadczynności dwóch lub więcej gruczołów wydzielania wewnętrznego. Są one w większości dziedziczne, spowodowane dominującymi mutacjami punktowymi genu *MEN1* (chromosom 1q13) lub genu *RET* (chromosom 10q11.2) odpowiednio: dla typu MEN1 lub typu MEN2A i 2B. Ich częstość występowania wynosi około 1:30000. Najczęściej spotykane fenotypy endokrynologiczne przedstawia tabela 3.6.

Tabela 3.6 Zróżnicowanie fenotypowe zespołów mnogiej gruczolakowatości endokrynnej (MEN)

Gen/Mutacja/Białko/Guz	Typ I	Typ 2A	Typ 2B
MEN1, 400 mutacji, menina- ujemny czynnik transkrypcyjny	+	-	-
RET mutacje domen cysteinowych 809, 611, 618, 620 lub 634; nadmierna aktywacja RET kinazy tyrozynowej	-	+	-
RET mutacje domeny cysteinowej 918	-	-	+
Rak rdzeniasty tarczycy	-	95%	100%
Guzy/przerost przytarczyc	100%	20-30%	rzadko
Guzy endokrynne trzustki/jelit (gastrinoma>insulinoma >> glucagonoma>VIP-oma>somatostatinoma)	60%	-	-
Guzy przedniego płata przysadki (prolactinoma> wydzielające hormon wzrostu>>ACTH>TSH)	30-50%	-	-
Guzy kory lub/i rdzenia nadnerczy*	20-40%*	-	-
Guz chromochłonny nadnerczy	-	50%	50%
Rakowiaki	10%	-	-
Mnogie nerwiaki błon śluzowych	-	-	>95%
Marfanoidalny fenotyp	-	-	80%

* nie wykazują lub rzadko wykazują aktywność hormonalną

W typie MEN, 80-90% stanowią przypadki MEN2A, a 5% MEN2B. Pozostałe to przypadki rodzinnego raka rdzeniastego tarczycy (FMTC – *Familial Medullary Thyroid Carcinoma*) bez zmian w innych gruczołach endokrynnych. MEN jest przyczyną 2-4% przypadków pierwotnej nadczynności przytarczyc.

3.2.11. Erytropoetyna

Łagodne guzy nerek, włókniaki macicy, jak również guzy jajników, raki rdzeniaste tarczycy, oraz pierwotne raki wątroby mogą w małym procencie przypadków syntetyzować i wydzielać zwiększone ilości erytropoetyny. Aktywacja procesu erytropoezy powoduje to podwyższenie stężenia hemoglobiny oraz policytemię.

3.2.12. Krew utajona w kale

Najczęstszą przyczyną obecności krwi jawnej lub utajonej w kale są nienowotworowe schorzenia przewodu pokarmowego, takie jak wrzody przełyku i żołądka, wrzodziejące zapalenie jelit, żylaki odbytu lub przełyku itp. Również niemal wszystkie przypadki raków jelit i żołądka powodują krwawienia do przewodu pokarmowego. Współczesne testy suchej fazy na wykrywanie krwi utajonej w kale opierają się na reakcji immunochemicznej ze znakowanymi chromogenami przeciwciałami, skierowanymi przeciw trudno trawiącym się epitopom ludzkiej globiny i tranferyny. Posiadają one dużą specyficzność i nie reagują z podobnymi białkami pochodzenia zwierzęcego. Nie ma więc potrzeby stosowania diety eliminacyjnej przy przygotowaniu pacjenta do badania i unika się wyników fałszywie dodatnich. Dzięki zastosowaniu w testach immunochemicznych dwóch przeciwciał, można wykryć krwawienie dolnych odcinków przewodu pokarmowego rzędu 0,3 mL/dobę. Ich czułość diagnostyczna dla raków dolnych odcinków przewodu pokarmowego wynosi około 80%, lecz dla polipów tylko 20-30%. Oprócz tego przy krwawieniach z górnych odcinków przewodu pokarmowego dają one duży procent wyników fałszywie ujemnych. Ultraczuły test gwajakolowy nowej generacji wykrywa krwawienie rzędu 2 mL/dobę przy czułości diagnostycznej rzędu 65%. Test wykorzystuje peroksydacyjne właściwości hemu. Dlatego przy tej metodzie wymaga się stosowania diety nie zawierającej pierścienia hemowego, katecholowego i innych związków utleniających.

W nieselekcjonowanej populacji frakcja wyników dodatnich testu na krew utajoną wynosi 1-5%, z tego 2-10% stanowią raki jelita grubego i żołądka, a 20-30% gruczolaki i polipy. Pozostałe przyczyny, to krwawiące wrzody żołądka, naczyniakowatość okrężnicy (*angiodysplasia*), żółtaczką i anemia sierpowata.

Wartość predykcyjna tego testu dla raków jelita grubego nie przekracza 10%. Dlatego każdy wynik dodatni potwierdzony drugim i trzecim badaniem powinien być zweryfikowany badaniem endoskopowym (sigmoidoskopia, kolonoskopia, kolonoskopia wirtualna, gastroscopia itp.). Przyjmuje się, że badania przesiewowe na krew utajoną w kale w grupach ryzyka (powyżej 50 roku życia) mogą obniżyć śmiertelność z powodu raka jelita grubego o 25%, dzięki jego wcześniejszemu wykryciu. Badanie to nie może zastąpić kolonoskopii, która powinna być wykonywana w tej grupie ludzi co 5 lat. W

uzasadnionych klinicznie przypadkach kolonoskopia może być wykonywana niezależnie od ujemnego wyniku badania na krew utajoną.

3.3. Markery nowotworowe

Markery nowotworowe są to związki, których zwiększone stężenie w płynach ustrojowych wynika z istnienia u pacjenta choroby nowotworowej. Związki te są syntetyzowane i wydzielane do płynu pozakomórkowego przez żywe komórki nowotworowe (Ig monoklonalne, specyficzny antygen gruczołu krokowego, białko płodowe alfa itp) lub też uwalniane z obumierających komórek guza (antygen rakowo-płodowy, CA15.3 itp.). Często obecność antygenów nowotworowych jest oznaczana immunohistochemicznie w biopsji guza, bądź w próbce pobranej w czasie zabiegu operacyjnego. Dodatni wynik badania stanowi podstawę do oznaczeń poziomu tego markera w płynach ustrojowych jako wskaźnika skuteczności leczenia, remisji czy też wznowy, jak również do wyboru metody leczenia. Markery te nazywane są markerami bezpośrednimi. Są one produktami komórek guza, w odróżnieniu od opisanych uprzednio markerów pośrednich, których zmiany wynikały z reakcji organizmu na rozwijający się nowotwór. Należy podkreślić, że są to prawidłowe białka komórkowe, tylko produkowane w nadmiernych ilościach. Przy interpretacji wyników stwarza to konieczność różnicowania wzrostów poziomu markera wywołanych guzami złośliwymi od wzrostów tych parametrów wywołanych przez guzy łagodne, stany zapalne lub degeneracyjne itp.

3.3.1. *Znaczenie markerów w diagnostyce i obserwacji leczenia nowotworów*

3.3.1.1. **Badania przesiewowe**

Badania przesiewowe w onkologii mają na celu wykrycie określonej choroby nowotworowej jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych, lub też ocenę ryzyka jej wystąpienia. Dzięki temu możliwe jest skuteczniejsze leczenie nowotworu lub zapobieżenie jego wystąpieniu. Takie kryteria zdają się spełniać badania polimorfizmów i dziedzicznych mutacji różnych onkogenów: *BRCA1* i *2* w rakach piersi i jajników; *APC* w rodzinnej polipowatości gruczolakowej; *MSH2* i *MLH1* w dziedzicznym nie polipowym raku jelita grubego. Do tego typu markerów oznaczanych w określonych grupach ryzyka można zaliczyć już omawiane badania krwi utajonej w kale w rakach jelita grubego, kalcytoninę w MEN 2 oraz AFP w pierwotnych rakach wątroby, czy też badanie cytologiczne wymazów z szyjki macicy w rakach tej tkanki (tabela 3.7). Badania przesiewowe w kierunku określonego nowotworu prowadzi się zwykle w zdefiniowanych grupach ryzyka.

Tabela 3.7. Markery nowotworowe w badaniach przesiewowych grup ryzyka

Marker	Nowotwór	Czułość/Ryzyko
Krew utajona	Rak jelita grubego	80%
Kalcytonina	MEN2	100%
β hCG	Zaśniad groniasty, nabłoniak kosmówkowy	100%
PSA/badanie <i>per rectum</i>	Rak prostaty	65%
AFP	Rak pierwotny wątroby	70%
Cytologia szyjki macicy DNA wirusa brodawczaka	Rak szyjki macicy	85-95%/80%* 100%/99%**
Mutacje <i>BRCA1 i 2</i>	Rak piersi Rak jajników	100%/50-85% 100%/23-63%
Mutacje <i>APC</i>	Rodzinnna polipowatość gruczolakowa	100%/100%
Mutacje <i>MSH2, MLH1</i>	Nie polipowy rak jelita grubego	100%/80%

* Regularna kontrola wymazów szyjki macicy metodą Papanicolau i likwidacja dysplazji zmniejsza ryzyko choroby inwazyjnej o 80%. **W 99% przypadków komórki raka szyjki macicy są zakażone wirusem brodawczaka. 80% kobiet aktywnych płciowo jest bezobjawowymi nosicielkami wirusa. U około 10% z nich rozwiną się zmiany dysplastyczne lub rakowe

Istnieją również mutacje i polimorfizmy genów, które zwiększają ryzyko wystąpienia wielu typów nowotworów. Zalicza się do nich mutacje genów *p53*, *uPA*, *uPAR*, *PAI-1* itp. W takich przypadkach badanie przesiewowe nie ma większego znaczenia.

3.3.1.2. Wartość diagnostyczna markerów nowotworowych

Wzrost poziomu markera nowotworowego rzadko może być uznany, jako samodzielny wskaźnik choroby nowotworowej. Jego nieprawidłowe stężenie jest zwykle wskazówką do przeprowadzenia dalszych badań, głównie obrazowych, mających na celu wykluczenie bądź potwierdzenie istnienia określonego nowotworu. Poza wyjątkami, dotyczącymi rzadko występujących lub zaawansowanych nowotworów (tabela 3.8), żaden ze stosowanych obecnie markerów nowotworowych nie ma 100% czułości i specyficzności. Dlatego jego prawidłowy poziom nie wyklucza obecności podejrzanego guza. Czułość tych testów zwiększa się wraz ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej (tabela 3.8). We wczesnych stadiach choroby poziom większości markerów nowotworowych jest niestety podwyższony tylko w małym procencie przypadków. Natomiast w zaawansowanych, oczywistych klinicznie, stadiach choroby nowotworowej, użycie markera nie ma większego znaczenia.

Tabela 3.8. Markery nowotworowe jako samodzielne wskaźniki choroby nowotworowej

Marker	Nowotwór	Stężenie markera
AFP	Guzy komórek zarodkowych Hepatoblastoma (<6 miesiąca życia) Rak pierwotny wątroby	>1.000 kJ/L >1.000.000 kJ/L AFP↑↑, HBsAg(+), anty HCV(+)
βhCG	Guzy komórek zarodkowych Nabłoniak kosmówkowy	>10.000 j/L >10.000 j/L
PSA	Rak gruczołu krokowego	>100 μg/L

Górna granica wartości referencyjnych, zwana poziomem odcięcia nigdy nie rozdziela całkowicie populacji zdrowej od chorej. Zgodnie z ogólną zasadą analityczną, przy przyjęciu niskiego poziomu odcięcia czułość diagnostyczna markera będzie wysoka, natomiast specyficzność mała. Jeżeli przyjmuje się wysoki poziom odcięcia to czułość testu obniży się, a wzrośnie specyficzność (tom 1, rozdz. 1).

Zarówno w przypadku podwyższonych jak i prawidłowych stężeń markera w surowicy, jego obecność w tkance guza powinna być sprawdzona badaniem immunochemicznym. W wypadku wyniku pozytywnego, stężenie markera powinno być oznaczane w okresie po zabiegu operacyjnym lub/i podczas leczenia uzupełniającego (tabela 3.8).

3.3.1.3. Wartość rokownicza markerów nowotworowych

W poszczególnych przypadkach, po uwzględnieniu indywidualnych cech klinicznych nowotworu (złośliwość histologiczna, lokalizacja itp.), stężenie danego markera może korelować z masą guza, lub/i obecnością/nieobecnością przerzutów, a tym samym pomagać w ustaleniu rokowania i sposobu leczenia. Dla przykładu wysokie poziomy antygeny rakowo-łożyskowe (CEA) stanowią niezależny wskaźnik złego rokowania w rakach jelita grubego. Wysokie stężenie βhCG, przed rozpoczęciem leczenia kosmówczaka decyduje o zastosowaniu bardziej agresywnej chemioterapii.

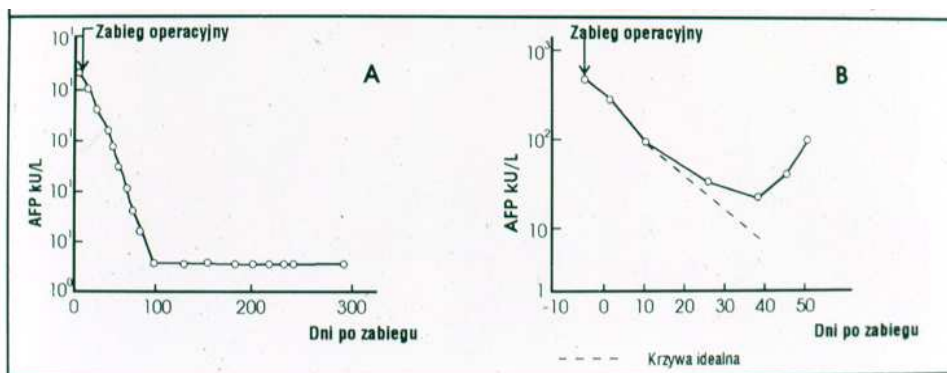
3.3.1.4. Obserwacja leczenia i wykrywanie wznowy choroby nowotworowej

Największą pomoc dla lekarza i korzyść dla pacjenta nowotworowego przynosi stosowanie markerów nowotworowych przy obserwacji przebiegu leczenia, remisji czy też wykrywaniu wznowy guza. Warunkiem jest ich odpowiedni dobór. Skuteczna chemio- czy radioterapia czy też leczenie chirurgiczne powinny powodować odpowiedni spadek poziomu markera. Dla różnych nowotworów i istnieją ustalone kryteria oceny odpowiedzi na leczenie,

w których istotne miejsce zajmują markery nowotworowe. Przykłady zachowania poziomu markera przy skutecznym i nieskutecznym leczeniu nowotworu przedstawiono na rycinie 3.5 i w tabeli 3.8.

Pomiary poziomu markera nie są konieczne w przypadkach, w których postępowanie nie będzie ulegało zmianie, gdy zamiast spodziewanego spadku nastąpi wzrost jego poziomu.

Przy bardzo dobrej odpowiedzi guza na leczenie, poziom markera powinien obniżyć się do poziomu, a czasem poniżej wartości referencyjnych. Należy jednak pamiętać, że nawet w takiej sytuacji pacjent może nadal mieć dużą liczbę komórek nowotworowych, np. przy poziomie β hCG w surowicy rzędu 1 j/L w organizmie pacjentki nadal będzie obecne około 1000 komórek nabłonniaka kosmówkowego. Dlatego pomimo osiągnięcia prawidłowego poziomu markera powinien być on ciągle monitorowany, jako podstawowy element obserwacji klinicznej.



Ryc. 3.5. Zmiany poziomu AFP w surowicy po chirurgicznym usunięciu dużego guza jąder. A – pełna eliminacja guza; B – wznowa

Wzrost stężenia markera nowotworowego w okresie po zakończeniu „skutecznej” terapii, może wykręć wznowę procesu nowotworowego na kilka tygodni do kilku miesięcy przez pojawieniem się jakichkolwiek objawów klinicznych. Jest to szczególnie istotne, gdy nawracająca choroba nowotworowa ma szansę być skutecznie leczona lub powstrzymana, przy zastosowaniu mniej obciążającego postępowania. Do takich nowotworów należą: kosmówczaki, guzy komórek rozrodczych oraz zróżnicowany rak gruczołowy tarczycy. Wczesne wykrycie nawrotu jest szczególnie ważne po chirurgicznym usunięciu guza, jeżeli uzupełniająca chemio czy radioterapia daje szansę wyleczenia. Leczenie to jest tym skuteczniejsze im mniejsze jest(są) ognisko(a) wznowy.

Tabela 3.8. Markery nowotworowe w obserwacji leczenia

Nowotwór	Marker	Kryteria odpowiedzi na leczenie
Rak jelita grubego	CEA	Spadek do normy lub stabilnie niższego poziomu w ciągu 6-8 tygodni. Wzrost po tym okresie wskazuje na niekompletność zabiegu i/lub przerzuty. Do obserwacji wznowy po skutecznym zabiegu, pomiar CEA co 2-3 miesiące w ciągu 2 lat. Dodatnia wartość predycyjna przy wzroście ok. 75%, ujemna przy wartościach prawidłowych ok. 90%.
Pierwotny rak wątroby	AFP	Spadek do normy w ciągu tygodnia po skutecznym zabiegu operacyjnym, lub w czasie chemio lub radioterapii.
Rak stercza	PSA	Spadek do wartości nieoznaczalnych po skutecznym zabiegu operacyjnym, lub do wartości 2,0 µg/L po radioterapii/chemioterapii. Monitorowanie za pomocą wysoko czułego hsPSA co 3-6 miesięcy. Wzrost jest wskaźnikiem wznowy.
Rak jajnika	CA125	Spadek do normy w ciągu 2-4 tygodni po skutecznym zabiegu operacyjnym. Chemioterapia: pomiar co 4 tygodnie; Postęp leczenia: odpowiedź 50% spadek po 2 pomiarach brak obniżenia do 4 pomiaru; odpowiedź 75% spadek postępujący w 3 pomiarach. Postęp choroby: 25%, wzrost w 3 pomiarze po dwóch prawidłowych; 50% stopniowy wzrost do 50% w 3 pomiarze; 100% trwały wzrost pow. 100 j.m. w ciągu 2 miesięcy.
Nabłoniak kosmówkowy	βhCG	Spadek do wartości <0,2 j.m./L przy skutecznym leczeniu w ciągu 12 tygodni.
Szpiczak mnogi	Ig monoklonalna	Remisja – całkowity zanik Ig monoklonalnych w surowicy i moczu, w szpiku plazmocyty <5% 2 × co 6 tygodni; Odpowiedź częściowa >50% obniżenie Ig monoklonalnych w surowicy, w moczu 90% obniżenie łańcuchów lekkich (lub <200 mg/dobę) 2 × co 6 tygodni; >50% redukcja guzów w RTG.

Podczas leczenia jak i po leczeniu, przyjęte wartości referencyjne (poziomy odcięcia) stosowane w postępowaniu diagnostycznym przestają mieć znaczenie. W tej fazie choroby nowotworowej istotne znaczenie ma obserwacja zmian stężenia markera w czasie, w stosunku do poprzedniego badania. Nawet niewielki wzrost stężenia markera, jest wskazaniem do wykonania częstszych pomiarów oraz dokładniejszego badania klinicznego i obrazowego. Należy

krytycznie rozważyć celowość wykrywania wczesnej wznowy za pomocą markerów tam gdzie jedynym dostępnym leczeniem jest leczenie paliatywne.

3.3.2. Indywidualne markery nowotworowe

Poszczególne markery mają zróżnicowaną przydatność w diagnostyce i prowadzeniu leczenia różnych chorób nowotworowych. Do najbardziej przydatnych zalicza się te, które mają wysoką czułość i/lub specyficzność, a ich poziom w surowicy dobrze odzwierciedla masę czy też aktywność proliferacyjną nowotworu (tabela 3.10).

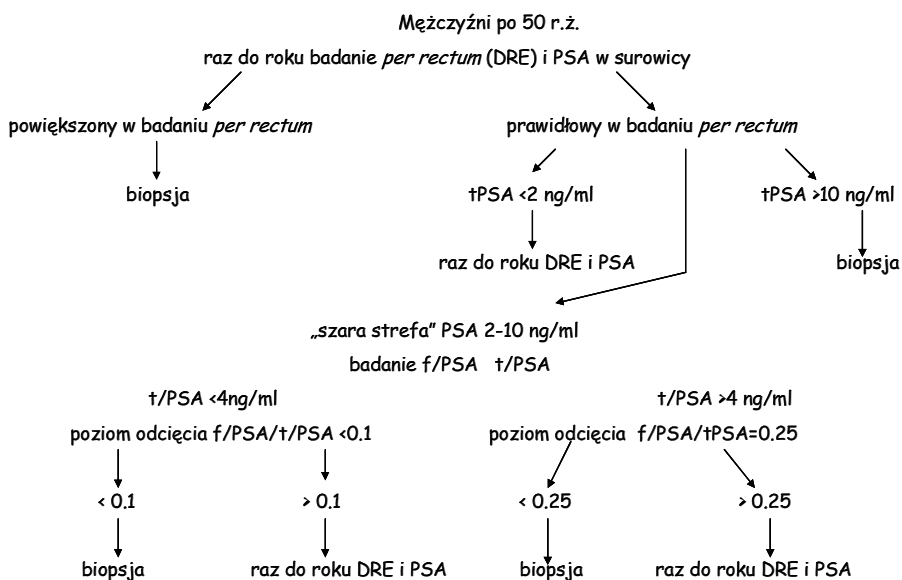
3.3.2.1. Specyficzny antygen gruczołu krokowego (PSA)

PSA (*Prostate Specific Antigen*) jest jednołańcuchowym białkiem wydzielniczym o masie cząsteczkowej 34 kDa z 7% zawartością reszt glikozydowych. Jest produktem genu *PSA* znajdującego się w chromosomie 19q13. W surowicy zdrowego mężczyzny około 60-90% PSA w surowicy jest skompleksowane z α_1 -antychymotrypsyną. Jest białkiem specyficznym narządowo, ponieważ jest wydzielany do płynu nasiennego wyłącznie przez komórki kanalików gruczołu krokowego, w którym jego stężenie jest rzędu 0,2-5,5 $\mu\text{g/mL}$. Jego rola biologiczna polega na proteolizie żelu nasienia i śluzu szyjkowego. Dzięki temu uwolnione plemniki uzyskują mobilność i możliwość dotarcia do komórki jajowej. PSA wydzielają zarówno komórki zdrowe jak i rakowe. Wartość poziomu odcięcia dla PSA w surowicy nieselekcjonowanej populacji mężczyzn wzrasta z 2,5 $\mu\text{g/L}$ u czterdziestolatków do 6,5 $\mu\text{g/L}$ w ósmej dekadzie życia. Jednak ze względów praktycznych przyjęto jedną wartość graniczną dla PSA surowicy równą 4 $\mu\text{g/L}$. Takie podejście zmniejsza frakcję wyników fałszywie dodatnich u mężczyzn młodszych, u których częstość raka prostaty jest mniejsza. Jednocześnie zwiększa ono czułość wykrywania raka stercza w populacji mężczyzn starszych, w której rak prostaty pojawia się częściej. W USA zatwierdzono oznaczanie PSA w skojarzeniu z badaniem *per rectum*, jako obligatoryjny test przesiewowy w corocznej kontroli stanu zdrowia mężczyzn po 50 roku życia. Poziomy PSA między 4-10 $\mu\text{g/L}$ wskazują na podejrzenie istnienia raka i stanowią wskazanie do przeprowadzenia transrektalnej ultrasonografii, a w razie potrzeby do biopsji przezodbytniczej. W tej („szarej”) strefie mieszczą się również przypadki łagodnego przerostu i gruczolaka stercza, oraz stany zapalne tego gruczołu. Przy stężeniach PSA powyżej 10 $\mu\text{g/L}$ prawdopodobieństwo raka jest powyżej 90%. Przy wartościach powyżej 100 $\mu\text{g/L}$ PSA jest samodzielnym wskaźnikiem raka stercza szczególnie w obecności bólów kostnych wskazujących na istnienie przerzutów.

Czułość PSA w diagnostyce raka stercza jest dwa razy większa niż izoenzymu sterczowego fosfazy kwaśnej. W stadium A raka stercza wynosi ona około 70% i wzrasta do 90% w jego stadium D.

Przy wartościach PSA w zakresie „szarej strefy” jego czułość diagnostyczną i siłę różnicującą przypadki raka i łagodnych schorzeń stercza, zwiększa oznaczenie frakcji wolnego PSA (fPSA – *free PSA*). Zasada metody polega oznaczeniu wolnego PSA za pomocą przeciwciał monoklonalnych przeciw epitopowi blokowanemu przez α_1 -antychymotrypsynę oraz PSA całkowitego za pomocą przeciwciał wykrywających epitopy nieblokowane przez ten inhibitor proteaz. Wynik dla fPSA wyraża się jako frakcję PSA całkowitego. U zdrowych zawartość wolnego PSA wynosi około 25% a w rakach poniżej 10% całkowitego PSA, tak jak to przedstawiona na schemacie diagnostycznym (ryc. 3.6). Wartości fPSA poniżej 10% z dużym prawdopodobieństwem wskazują na obecność raka, natomiast przy wartościach powyżej 25% prawdopodobieństwo raka stercza jest niewielkie (ryc. 3.6).

Po skutecznym zabiegu operacyjnym usunięcia raka wartości PSA powinny spaść do wartości nieoznaczalnych, a po radioterapii do wartości rzędu 0,2 $\mu\text{g/L}$.



Ryc. 3.6. Zastosowanie całkowitego i wolnego PSA w algorytmie diagnostycznym raka gruczołu krokowego

W tych przypadkach oznaczenie wolnego PSA nie ma znaczenia w obserwacji wyników leczenia i ewentualnej wznowy. Również powszechnie stosowany standardowy test na oznaczenie PSA całkowitego o czułości analitycznej 0,1 $\mu\text{g/L}$, jest niewystarczający do wczesnego wykrycia wznowy

lub/i odległych przerzutów. Dlatego też do obserwacji po zakończonym leczeniu powinien być stosowany ultraczuły test do oznaczania PSA (czułość analityczna 0,001 $\mu\text{g/L}$). Pozwala to wykryć początkową fazę nawrotu choroby, a tym samym zwiększyć szanse na wyleczenie przy mniej obciążającej terapii.

3.3.2.2. Immunoglobuliny monoklonalne i łańcuchy lekkie

Białka te bardzo dobrymi markerami szpiczaka mnogiego i makroglobulinemii Waldenstrom o łącznej 100% czułości i specyficzności. Szczegółowy opis dotyczący diagnostycznego znaczenia Ig monoklonalnych znajduje się w rozdziale „Laboratoryjne wskaźniki zaburzeń metabolizmu białek” (tom II, rozdz. 2).

3.3.2.3. Białko płodowe alfa (AFP)

AFP (α -fetoproteina) jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 70 kDa, produktem genu *AFP* w chromosomie 4q11-22. Wykazuje ona 30% homologię z albuminą. AFP jest syntetyzowana w dużych ilościach przez pęcherzyk żółtkowy, a po jego zaniku przez przewód pokarmowy i wątrobę płodu. Jego poziom w osoczu płodu wzrasta do 3 trymestru ciąży, a następnie obniża się.

Dlatego również w surowicy kobiet ciężarnych stwierdza się wysokie poziomy AFP. Nadmierny wzrost poziomu AFP we krwi ciężarnej między 14 a 18 tygodniem ciąży wskazuje na obecność wad rozwojowych cewy nerwowej i mózgu płodu, natomiast obniżenie poziomu na obecność zespołu Downa.

W surowicy noworodka poziom AFP wynosi około 100 mg/L i w ciągu 1 roku życia obniża się o 4 rzędy wielkości do poziomu ludzi dorosłych $<10 \mu\text{g/L}$. W związku z tym u dzieci do 6 miesiąca życia zmiany stężenia AFP muszą być interpretowane w stosunku do odpowiednich do wieku wartości referencyjnych. W tym wieku, rozpoznanie dziedzicznego nowotworu wątroby, *hepatoblastoma*, na podstawie poziomu AFP jest możliwe, jeżeli jego poziom w surowicy przekracza 1400 mg/L. U dzieci starszych wartości diagnostycznie istotne są niższe.

Nie nowotworowe choroby wątroby związane z równoczesną jej regeneracją również mogą zwiększać stężenie AFP nawet do 700 $\mu\text{g/L}$. Około 30% ostrych i przewlekłych wirusowych zapaleń wątroby typu B i C oraz 10-60% marskości wątroby przebiega ze wzrostem poziomu AFP. Inne choroby wątroby takie jak: toksyczne uszkodzenia, mononukleozą zakaźną lub cholestazą rzadko prowadzą do wzrostu poziomu AFP. W praktyce przy stwierdzeniu podwyższonego poziomu AFP, badanie należy powtórzyć za dwa do trzech miesięcy.

Przewlekłe nosicielstwo wirusów zapalenia wątroby typu B i C oraz marskość stwarzają znaczne ryzyko rozwoju pierwotnego raka wątroby w perspektywie kilkunastu lat. Do grupy ryzyka tej choroby zalicza się pacjentów

dializowanych, leczonych preparatami krwi i osocza, alkoholików z marskością wątroby, homoseksualistów, narkomanów, więźniów, osoby heteroseksualne mające licznych partnerów oraz personel medyczny. Największe obszary ryzyka to Chiny i południowo-wschodnia Azja oraz Afryka na południe od Sahary. Siła diagnostyczna tego testu dla pierwotnych raków wątroby wynosi około 70%. Z tego względu prawidłowe stężenie AFP nie wyklucza obecności tego nowotworu. Pomimo tego oznaczanie AFP jest uznawane za test przesiewowy dla pierwotnych raków wątroby w wymienionych grupach ryzyka.

Obok badania obrazowego okresowe badanie poziomu AFP pomaga we wczesnym wykryciu ogniska raka pierwotnego, co daje szansę na jego chirurgiczne usunięcie. Usunięta zmiana musi być poddana badaniu histopatologicznemu, ponieważ raki żołądka czy też jelit, dające przerzuty do wątroby również mogą powodować wzrost poziomu AFP.

Resztę glikozydową AFP stanowi N-acetylo-glukozamina (AFP-L1 i AFP-L2) lub alfa 1,6-fruktoza (AFP-L3). Zawartość procentowa frakcji AFP-L3 w całkowitej puli AFP wzrasta powyżej 10% w pierwotnych rakach komórek wątrobowych. Nie wzrasta natomiast w łagodnych guzach i stanach zapalnych wątroby. Przy ujemnym wyniku badania obrazowego, u osób z grup ryzyka, pojawienie się podwyższenia frakcji AFP-L3 może wyprzedzać pojawienie się objawów klinicznych o 3-18 miesięcy. Pozwala to na wczesne rozpoznanie różnicowe nienowotworowej i nowotworowej przyczyny wzrostu AFP.

AFP może być także podwyższone u pacjentów z nowotworami komórek zarodkowych, zwykle wskutek obecności komórek pęcherzyka żółtkowego w tkance tych guzów.

3.3.2.4. Podjednostka β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (β hCG)

hCG (*human chorionic gonadotropin*) jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 36,7 kDa, heterodimerem składającym się z niespecyficznej podjednostki α (m.cz. 14,5 kDa) i specyficznej podjednostki β (m.cz. 22 kDa). Podjednostka α wchodzi również w skład innych dimerycznych hormonów: lutropiny, follikuliny i tyreotropiny. Natomiast podjednostka β determinująca specyficzną aktywność biologiczną hCG, jest produktem genu *CGB* zlokalizowanego w chromosomie 19q13.3. Po zapłodnieniu, hormon ten jest produkowany przez rozwijający się płód, a później przez sycytiotrofoblast - zewnętrzną część płodową łożyska. Zapobiega on inwolucji ciała żółtego, przez co utrzymuje wysoki poziom progesteronu niezbędnego do utrzymania ciąży.

Dlatego oznaczanie poziomu β hCG w moczu (suche testy) lub w surowicy (met. ELISA) służy jako test ciążyowy, którego czułość jest równa 100%, a specyficzność około 85%, przy wartościach referencyjnych dla miesiączkujących kobiet <5 jm/L. U mężczyzn wartości referencyjne są <5 jm/L, a u kobiet w okresie menopauzy <10 jm/L.

U kobiet nieciążarnych wzrost poziomu β hCG wskazuje ze 100% czułością na obecność nowotworu złośliwego – nabłoniaka kosmówkowego, lub stanu przedrakowego – zaśniadu groniastego. Choroby te powodują wzrost β hCG do wartości powyżej 1.000.000 jm/L. Wzrost poziomu β hCG koreluje przy tym z masą guza. Obniżenie poziomu tego markera do wartości prawidłowych jest wskaźnikiem skutecznej chemioterapii. Jego poziom powinien być monitorowany do 3 tygodni po normalizacji wyników. Poziom β hCG powinien być oznaczany u kobiet po zabiegach przerwania ciąży lub po poronieniach samoistnych, u których istnieje podwyższone ryzyko wystąpienia choroby trofoblastycznej.

Poziom β hCG może być podwyższony w 50-85% nie nasieniakowych i w 20% przypadków nasieniakowych guzów jąder. W tych przypadkach jego oznaczanie powinno być skojarzone z oznaczaniem poziomu AFP.

Poziom β hCG może być również podwyższony w kilku do kilkadziesiąt procentach przypadków nowotworów nietrofoblastycznych jelita grubego, wątroby, płuc, trzustki, żołądka, jajnika, piersi i nerek.

3.3.2.5. AFP i β hCG w diagnostyce nowotworów komórek zarodkowych

Guzy komórek zarodkowych występują częściej u młodych mężczyzn niż u kobiet. Ognisko pierwotne znajduje się przeważnie w jądrach, ale zdarzają się guzy rozwijające się w śródpiersiu, tylnej przestrzeni pozaotrzewnowej lub w szyszynce. Mogą to być zarówno nasieniaki jak i guzy nie nasieniakowe lub mieszane. Istnienie guzów komórek zarodkowych należy brać pod uwagę u osób poniżej 45 roku życia z nowotworami o nieznanym pierwotnym pochodzeniu. W tych przypadkach należy oznaczać łącznie AFP i β hCG, gdyż pierwszy marker jest wytwarzany przez komórki pochodzące z pęcherzyka żółtkowego, a drugi przez komórki trofoblastu. Wzrost któregoś lub obu markerów zależy więc od składu komórek guza. Ponad 80% nienasieniakowych guzów komórek zarodkowych uwalnia AFP lub β hCG, a około 40% oba te markery jednocześnie. Kilkanaście procent nienasieniakowych guzów nie wydziela żadnego z nich. Dlatego poziomy AFP i β hCG poniżej poziomu odcięcia nie wykluczają istnienia nowotworu. Badanie immunohistochemiczne biopsji lub usuniętego guza może zweryfikować celowość ich oznaczania podczas obserwacji pooperacyjnej pacjenta.

Zawsze należy zbadać poziom markerów przed zabiegiem operacyjnym, gdyż często sam zabieg operacyjny wystarcza do wyleczenia. Gdy poziom markera nie obniża się do wartości prawidłowych lub gdy obniża się zbyt wolno istnieje wskazanie do uważnej obserwacji i ewentualnego wdrożenia chemioterapii.

Podczas chemioterapii pomiary stężeń AFP i β hCG powinny być wykonywane raz w tygodniu w celu obserwacji dynamiki inwolucji guza. Pomiary te stanowią element rutynowej obserwacji pooperacyjnej pacjentów z

guzami zarodkowymi gdyż wczesne wykrycie powikłań daje szansę na odpowiednią modyfikację leczenia. Nie zwalnia to od wnikliwej obserwacji klinicznej, ponieważ niektóre wznovy mogą przebiegać bez wzrostu stężeń AFP i β hCG.

Nasieniaki stanowią 40% guzów jąder, lecz nie dają nigdy wzrostu poziomu AFP. Natomiast β hCG wzrasta tylko w 20% przypadków. Markerem z wyboru jest w tych przypadkach izoenzym łożyskowy fosfatazy zasadowej. Jej aktywność wzrasta niemal we wszystkich przypadkach nasieniaka. Również niektóre guzy komórek niezarodkowych takie jak raki: gruczolu krokowego, piersi z przerzutami do kości, oraz mięsaki kości i szpiczaki mogą zwiększać aktywność fosfatazy zasadowej.

Poziomy AFP i β hCG stanowią czynnik prognostyczny u chorych z guzami komórek zarodkowych. Przy poziomach AFP <1000 μ g/L i β hCG <5000 jm/L, przewidywany czas 5-letniego przeżycia wynosi 92%; przy AFP >1000 i <10000 μ g/L oraz β hCG >5000 i <50000 jm/L – 80%, a przy wartościach wyższych 48%.

3.3.2.6. Antygen rakowo-łpłodowy (CEA)

Pod nazwą CEA (*carcinoembryonic antigen*) kryje się rodzina błonowych białek adhezyjnych o strukturze immunoglobulin. U ludzi rodzina CEA składa się z 29 genów *CEACAM*, spośród których ekspresji ulega zwykle 18. Są to glikoproteiny o masie cząsteczkowej 175-200 kDa zawierające około 50% reszt glikozydowych. Antygeny te reagują krzyżowo z przeciwciałami anty-CEA, używanymi w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej. Poziom odcięcia dla CEA w surowicy ludzi niepalących wynosi 2,5 μ g/L, zaś dla palących 5,0 μ g/L. Ani czułość ani specyficzność tego markera nie są duże. Czułość diagnostyczna CEA w rakach okrężnicy, żołądka, trzustki i wątroby waha się od 30-85% w zależności od rodzaju i stopnia zaawansowania tych guzów. Dla nowotworów o innych pierwotnych lokalizacjach takich jak: płuca, gruczoł piersiowy, gruczoł krokowy, jajniki, macica czułość diagnostyczna jest jeszcze niższa. Dlatego CEA nie może służyć, jako test przesiewowy do wykrywania jakiegokolwiek raka. Przy zabiegu operacyjnym potwierdzenie lub wykluczenie obecności CEA w tkance guza ma istotne znaczenie dla jego zastosowanie w obserwacji skuteczności eradykacji guza lub jego ewentualnej wznovy. Parametr ten ma największe znaczenie w rakach jelita grubego i odbytu. Prawdopodobieństwo wzrostu stężenia CEA jest znacznie większe niż AFP u pacjentów z nieprawidłowym obrazem ultrasonograficznym wątroby, sugerującym obecność przerzutów do tego narządu. Brak stabilizacji tego markera na poziomie normalnym po 6-8 tygodniach od zabiegu usunięcia guza wskazuje na istnienie ognisk przerzutowych lub/i niekompletną resekcję. Niezależnie od wyniku monitorowanie poziomu CEA powinno odbywać się co 2 miesiące.

Umiarkowany wzrost stężenia CEA (nie przekraczający 20 µg/L), mogą powodować stany nienowotworowe takie jak: stany zapalne i marskość wątroby, żółtaczka zastoinowa, ostre i przewlekłe stany zapalne trzustki i jelit. Wyniki fałszywie dodatnie zdarzają się we włóknisto-torbielowatym zwyrodnieniu gruczołów piersiowych, niewydolności nerek i zapaleniach płuc.

3.3.2.7. CA125 (marker raka jajnika i podobnych guzów)

Antygen CA125 jest białkiem powierzchniowym z rodziny mucyn (mucyna 16) kodowanym przez gen *MUC16* w chromosomie 19. Pełni ono rolę bariery nawilżającej, zabezpieczającej powierzchnię komórek nabłonkowych przed obcymi cząsteczkami i czynnikami infekcyjnymi. Jest on najszerzej stosowany jako marker raków wychodzących z komórek niezarodkowych jajnika. CA125 jest również obecny w komórkach nabłonkowych jajowodów, jamy i szyjki macicy oraz w nabłonkach otrzewnej, opłucnej, gruczołu krokowego i osierdzia. Dlatego poziom CA125 w osoczu może wzrosnąć w 10-70% przypadków nowotworów wychodzących z tych tkanek. Wzrasta on również w przebiegu ciąży, krwawienia miesięcznego i zapaleniu przydatków (20%), a także w stanach zapalnych otrzewnej (60%), opłucnej oraz w endometriozie. Podwyższony poziom CA125 ma miejsce w marskości i ziarnicy wątroby (50%), ostrym zapaleniu trzustki i pęcherzyka żółciowego (30%). Tak, więc CA125 nie jest specyficznym markerem dla nowotworów złośliwych wychodzących z wymienionych tkanek.

Największą czułość diagnostyczną wynosząca około 80%, przy poziomie odcięcia 65 j/mL, CA125 wykazuje w stosunku do nabłonkowych raków jajnika. Należy jednak zaznaczyć, że czułość diagnostyczna zależy od stadium raka jajnika i wzrasta z około 50% w I i II fazie do 80-100% w fazie III i IV. Zawsze trzeba brać pod uwagę możliwość znacznego wzrostu poziomu CA125 z innych przyczyn takich jak puchlina brzuszna (>5000 kJ/L) lub wysięki do opłucnej (200-300 kJ/L).

Nie wykazano przydatności oznaczeń CA125 do badań przesiewowych w kierunku raka jajnika. Niektórzy zalecają coroczne oznaczanie CA125 w połączeniu badaniem ultrasonograficznym miednicy małej u kobiet z wysokim ryzykiem dziedzicznego raka jajnika.

Głównym zastosowaniem CA125 jest monitorowanie przy jego pomocy przebiegu leczenia oraz wykrywanie wznowy raka jajnika. Spadek poziomu CA125 dobrze koreluje z inwolucją nowotworu. Stałe lub zwiększające się stężenia markera świadczą o nieskutecznej terapii i stanowią wskazanie do zastosowanie innego schematu chemioterapii. Stężenia CA125 >35 kJ/L po zakończonej terapii zawsze związane są z przetrwałym nowotworem. Natomiast niskie stężenia, nawet <15 kJ/L, nie wykluczają przetrwałego aktywnego ogniska raka.

U takich pacjentek wzrost poziomu CA 125 do wartości dwukrotnie przekraczających górną granicę wartości prawidłowych z 90% czułością wyprzedza wznowę kliniczną o kilka miesięcy. Nie ma jednak dowodów na to, że wcześniejsze włączenie chemioterapii drugiego rzutu u pacjentów asymptomatycznych poprawia ostateczny wynik leczenia.

3.3.2.8. CA-15.3 (marker raka piersi)

Antygen CA-15.3 jest glikoproteiną z rodziny mucyn, wydzielaną do mleka kobiecego jako składnik globulin cząstek lipidowych. Białko to jest produktem genu *MUC1*, znajdującego się w chromosomie 1. Jego poziom wzrasta nieznacznie w niewielkim procencie różnych chorób nienowotworowych takich jak: niewydolność nerek w stadium dializoterapii, przewlekłe stany zapalne wątroby, HIV, choroba reumatyczna, gruźlica jak również mastopatie. Czułość diagnostyczna CA-15.3 waha się od 13-50% w stadium I i II, a od 50-94% w stadium IV raka piersi, kiedy rozpoznanie kliniczne jest oczywiste. Nie ma, więc on znaczenia ani w badaniach przesiewowych ani w diagnostyce tego nowotworu. W przypadkach z podwyższonym poziomem CA-15.3 jego spadek, w okresie pooperacyjnym lub podczas chemioterapii, jest dobrym wskaźnikiem skuteczności leczenia. W około 70% wznowy dochodzi do wzrostu poziomu CA-15.3, który może poprzedzać wystąpienie objawów klinicznych.

3.3.2.8.1. Markery komórkowe raka piersi

Większe znaczenie w ustalaniu metody leczenia ma ustalenie rodzaju receptorów obecnych w komórkach raka piersi. Obecność receptorów estrogenowych (50-70% przypadków) i/lub progesteronowych w biopsjach guza lub próbkach materiału resekcyjnego wskazuje na konieczność przeprowadzenia ablacji endokrynej antagonistami estrogenów (Tamoxifen). Obecność tych receptorów ma pozytywne znaczenie rokownicze; wskazuje na dobrą odpowiedź guza na leczenie. Z kolei obecność receptora naskórkowego czynnika wzrostu (HER-2), który obecny jest w 30% raków piersi, wskazuje na skuteczność leczenia trastuzumabem (monoklonalnym przeciwciałem przeciw temu receptorowi) podawanego bez lub w skojarzeniu z innymi chemioterapeutykami.

W niektórych krajach europejskich wykonuje się rutynowo oznaczanie poziomu urokinazowego aktywatora plazminogen (uPA) oraz inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI), jako wskaźników prognostycznych dla tej choroby. Niski poziom uPA i wysoki PAI są czynnikami pogarszającymi rokowanie.

3.3.2.9. CA-19.9

Antygen CA-19.9 jest wydzielniczym sialylowanym antygenem Lewis, identycznym z białkiem układu grupowego Lewis erycytów o masie cząsteczkowej około 1000 kDa. Jest on produktem genów FUT2 i FUT3 w chromosomie 19p13.3 kodujących fenotypy odpowiednio Le a⁺ i Le b⁺ o aktywności fukozylotransferazy. Wysokie stężenie tego białka znajdują się w wydzielinach i wydalinach: ślinie, mleku, smółce, wydzielinie oskrzeli, śluzie szyjki macicy i płynie nasiennym itp.

Zwiększona ekspresja CA-19.9 nie jest związana specyficznie ani z typem nowotworu ani z określoną tkanką. Nie występuje u ludzi Le a⁻, Le b⁻. Jego stężenie w surowicy ulega podwyższeniu powyżej poziomu odcięcia 37 j/L, w kilkunastu procentach przypadków żółtaczek zastoinowych, kamicy i zapaleniach dróg żółciowych, przewlekłych zapaleniach wątroby, marskościach wątroby oraz zwyrodnieniu włóknisto-torbielowatym.

Czułość diagnostyczna CA-19.9 dla raków ogona trzustki wynosi około 60%, a dla raków głowy trzustki około 80%. Zarówno czułość jak i specyficzność tego testu jest zbyt niska by stanowić tańszą alternatywę dla ultrasonografii i innych metod diagnostyki obrazowej.

Natomiast przy stwierdzonym podwyższonym poziomie spadek/wzrost poziomu CA-19.9 jest dobrym wskaźnikiem skuteczności bądź nieskuteczności leczenia. W tym ostatnim przypadku poziom CA-19.9 wzrasta w 70% przypadków wznowy lub progresji choroby.

U 5% populacji antygeny Le są nieobecne. W tych przypadkach nawet duże guzy trzustki nie powodują wzrostu poziomu antygeny CA-19.9.

3.3.2.10. Cytokeratyny – markery proliferacji guza

Cytokeratyny są rodziną kilkunastu białek strukturalnych, które są składnikami filamentów cytoszkieletu wewnątrzcytoplazmatycznego komórek nabłonkowych. Są one kodowane przez rodzinę 30 genów. Cytokeratyny tworzą szkielet wewnętrzny łączący jądro komórkowe z błoną plazmatyczną. Poszczególne rodzaje komórek nabłonkowych mają specyficzne profile cytokeratynowe.

Rearanżacja cytokeratyn spełnia kluczową rolę w procesach podziału i różnicowania komórek. Podczas podziału komórek część cytokeratyn uwalnia się do przestrzeni pozakomórkowej. Transformacja nowotworowa komórek nie zmienia ich składu, lecz zwiększa uwalnianie do przestrzeni pozakomórkowej. Dlatego, wzrost poziomu cytokeratyn w osoczu odzwierciedla nie tylko masę nowotworów wychodzących z komórek nabłonkowych, ale i dynamikę ich proliferacji. Zmiany poziomu cytokeratyn związane są wprost z zahamowaniem lub przyspieszeniem wzrostu guza. Cytokeratyny mają pewną specyfikę komórkową nie mają natomiast specyfiki narządowej. W związku z tym nie są pomocne w pierwotnej diagnostyce lub ustaleniu w lokalizacji ogniska

pierwotnego. Jedynie w nowotworach płuc, niezależnie od klasyfikacji histologicznej, ich czułość jest rzędu 50%. Cytokeratyny są natomiast dobrymi wskaźnikami skuteczności czy też nieskuteczności wdrożonego leczenia. Obniżenie poziomu cytokeratyn jest markerem zmniejszenia szybkości proliferacji guza, który w tym czasie może być poddany leczeniu chirurgicznemu. Spadek poziomu cytokeratyn w przypadku efektywnej terapii pojawia się szybciej niż obniżenie markerów masy guza. Również w przypadku nawrotu choroby nowotworowej poziom cytokeratyn wzrasta szybciej niż markerów masy guza i znacznie wyprzedza pojawienie się objawów klinicznych wznowy.

W praktyce stosowane są trzy markery cytokeratynowe o podobnej czułości i specyficzności: TPS, TPA i CYFRA 21-1.

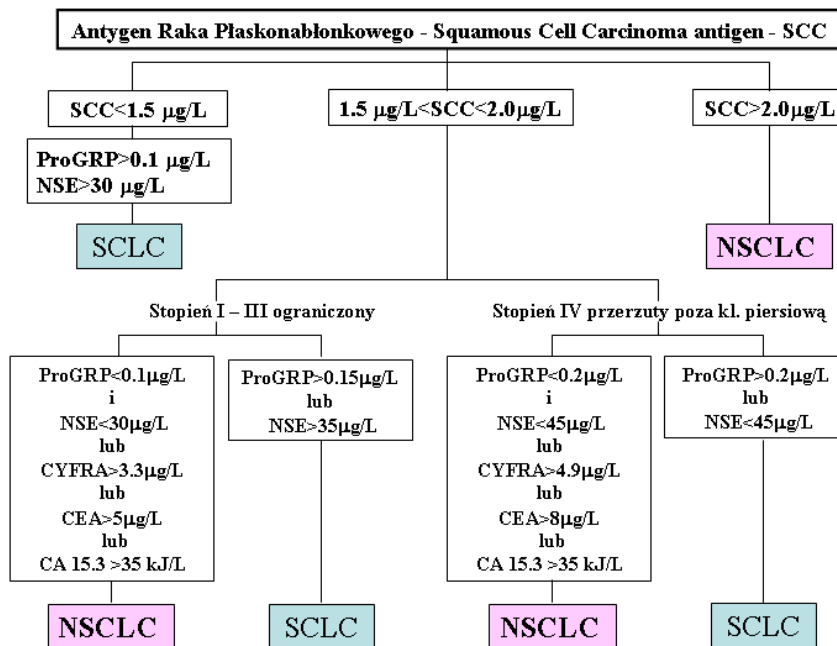
TPS (*Tissue Polypeptide Specific antigen*) jest rozpuszczalnym fragmentem cytokeratyny 18; TPA (*Tissue Polypeptide Antigen*) to produkt degradacji cytokeratyn 8, 18 i 19; a CYFRA 21-1 jest fragmentem cytokeratyny 19. Antygeny te, w przypadku stwierdzenia ich podwyższonego stężenia mogą być wskaźnikami proliferacji nowotworów nabłonkowych wychodzących: z płuc, pęcherza moczowego, jajników, gruczołów piersiowych, trzustki.

Należy pamiętać, że guzy łagodne oraz różne stany zapalne i zastoinowe w tych tkankach oraz cukrzyca i uogólnione zakażenia również mogą zwiększać poziomy tych antygenów w płynach ustrojowych.

3.3.2.11. Mnogie markery w diagnostyce choroby nowotworowej

Brak odpowiednio czułych i specyficznych markerów dla najczęściej występujących chorób nowotworowych skłania do stosowania kilku markerów jednocześnie. Założeniem tego postępowania diagnostycznego jest to, że w indywidualnych przypadkach proces nowotworowy może w zróżnicowany sposób może zwiększać ekspresję poszczególnych markerów. Takie podejścia diagnostyczne są stosowane szczególnie tam gdzie przy dużej częstotliwości występowania nowotworu nie ma dobrego pojedynczego testu diagnostycznego.

Nowotwory złośliwe płuc stanowią około 20% wszystkich chorób nowotworowych, a są odpowiedzialne za około 30% zgonów z powodu tych chorób. Mimo intensywnych prac badawczych nie znaleziono jak dotąd dobrego markera białkowego dla tej patologii. W tych przypadkach zarówno w badaniach przesiewowych jak i diagnostycznych znacznie lepsze wyniki dają różne metody diagnostyki obrazowej. Jednak i one wykazują małą czułość i często są wykonywane zbyt późno.



Ryc. 3.7. Algorytm zastosowania diagnostycznego mnogich markerów w rakach płuc. Skróty: SCLC – drobnokomórkowy rak płuca; NSCLC – niedrobnokomórkowe raki płuca; ProGRP – peptyd uwalniający progastrynę, NSE – neurospecyficzna enolaza; CYFRA – CYFRA 21-1 – fragment cytokeratyny 19; CEA – antygen rakowo-płodowy (wg Molina i wsp. 2010)

Spośród kilkudziesięciu szeroko badanych, krążących markerów nowotworowych najlepsze, choć niezadowalające wyniki uzyskano dla CYFRA 21-1 i antygeny komórek raka płaskonabłonkowego (SCC – *squamous cell carcinoma antigen*) w rakach płaskonabłonkowych; dla CEA w gruczołorakach i rakach wielkokomórkowych; dla neurospecyficznej enolazy (NSE) i peptydu uwalniającego progastrynę (*Progastrin releasing peptide*, ProGRP) w rakach drobnokomórkowych, przeważnie hormonalnie czynnych.

Według wyników badań z ośrodków klinicznych, współpracujących z firmami diagnostycznymi, możliwe jest stworzenie algorytmu diagnostycznego dla raków drobnokomórkowych i niedrobnokomórkowych płuc (ryc. 3.7).

Według tego algorytmu wysoki poziom SCC wskazuje na obecność raka drobnokomórkowego płuc z 99% pewnością. Wysokie poziomy NSE lub/i ProGRP wskazują na wysokie prawdopodobieństwo raka drobnokomórkowego płuc. Łączne stosowanie wymienionych markerów u pacjentów z podejrzeniem klinicznym raka płuca daje około 80% czułość diagnostyczną w tych dwóch podstawowych grupach tych nowotworów.

3.4. Podsumowanie

Niektóre z przedstawionych markerów nowotworowych mogą stanowić wartościowy, lecz zawsze komplementarny w stosunku do badania klinicznego i obrazowego, składnik procesu diagnozowania, prognozowania, obserwacji przebiegu leczenia i wznowy choroby nowotworowej. Przy ich stosowaniu obowiązują ogólne niżej podane zasady (tabela 3.9 i 3.10).

Tabela 3.9. Ogólne zasady stosowania markerów nowotworowych w klinice

1.	Prawidłowe stężenie markera nie wyklucza obecności nowotworu
2.	Umiarkowane podwyższenie poziomu markerów może występować w chorobach nienowotworowych
3.	Badanie markerów ma znaczenie pomocnicze w stosunku do badania obrazowego i klinicznego
4.	Właściwe wnioski są możliwe po sesyjnych oznaczeniach wykonywanych w odpowiednich dla danego nowotworu odstępach czasu.
5.	Wyniki niezgodne z obrazem klinicznym powinny być zweryfikowane przez powtarzne i komplementarne badania
6.	Markery rzadko są specyficzne tkankowo a leczenie może przejściowo zwiększyć uwalnianie markera z tkanek zdrowych
7.	Częstość oznaczania: - stężenie markera musi być ustalone przed rozpoczęciem leczenia - należy potwierdzić obecność markera w tkance guza - po radykalnym zabiegu - kontrola min. co 2-3 miesiące przez 3 lata, potem co 6 miesięcy - przy wzroście stężenia – co 2-4 tygodni - w czasie chemioterapii przed każdym kursem leczenia i po jego zakończeniu - w czasie radioterapii przed w połowie i po jej zakończeniu

W rozdziale nie opisano potencjalnych markerów dla raków tkanek takich jak ślinianki, skóra, kości, pęcherz moczowy, pęcherzyk żółciowy, ponieważ nie są one stosowane w praktyce klinicznej ze względu na małą czułość i specyficzność, jak również wartość predykcyjną i brak korelacji ze zmianami masy guza w wyniku leczenia bądź progresji choroby nowotworowej.

Tabela 3.10. Zastosowanie markerów nowotworowych w onkologii klinicznej

Marker	Nowotwory powodujące wzrost poziomu – częstość (%)	Zastosowanie w chorobie podstawowej	Inne przyczyny podwyższonego poziomu
AFP	Raki komórek zarodkowych – 40-80% Rak pierwotny wątroby – 90%	P, D, R, L, W P, D, R, L, W	Nienowotworowe choroby wątroby Guzy przewodu pokarmowego Cięża, noworodki
CEA	Rak jelita grubego/odbytu, stadium A – 15-25%; stadium D – 80-90%	R, L, W	Stany zapalne i nowotwory zapalenie/marskość wątroby, żółtaczką zastoinową, zapalenia trzustki i jelit, włóknisto-torbielowate zwyrodnienie gruczołów piersiowych, niewydolność nerek, zapalenia płuc itp.
PSA	Rak gruczołu krokowego – stadium A raka stercza około 70% i 90% w stadium D	D, R, L, W	Łagodny przerost i zapalenia gruczołu krokowego
β hCG	Zaśniad groniasty – 95% Nabłoniak kosmówkowy – 100% Guzy komórek zarodkowych – nienasieniakowate nowotwory jądra 40-85%; nasieniakowate nowotwory jądra – 20-30%	P, D, R, L, W P, D, R, L, W D, R, L, W	Cięża Guzy pęcherza moczowego, jelita grubego, wątroby, płuc, trzustki, żołądka jajnika, piersi i nerek.
Ig monoklonalne	Szpiczak mnogi – 90% Makroglobulinemia Waldenstrom – 100%	D, R, L, W D, R, L, W	Gammapatie łagodne Zespoły limfoproliferacyjne
Tyreoglobulina	Rak gruczołowy tarczycy	L, W	Wole z eutyreozą i guzowate Tyreotoksykoza Zapalenie tarczycy deQuervain

Marker	Nowotwory powodujące wzrost poziomu – częstość (%)	Zastosowanie w chorobie podstawowej	Inne przyczyny podwyższonego poziomu
CA 125	Rak jajnika – 13-50% w stadium I i II, a od 50-94% w stadium IV	R, L, W	Nowotwory i stany zapalne jajowodów, jamy i szyjki macicy otrzewnej, opłucnej, gruczołu krokowego i osierdza
CA 15.3	Rak piersi – od 13-50% w stadium I i II, a od 50-94% w stadium IV raka piersi	L, W	niewydolność nerek, stany zapalne wątroby, HIV, choroba reumatyczna, gruźlica, mastopatie.
ER/PR	Rak piersi – 50-70% i	D, R, L	-
HER-2	Rak piersi – 30%	D, R, L	-
CA 19.9	Rak trzustki – 60%, a dla raków głowy trzustki około 80%.	L, W	żółtaczkę zastoinową, zwyrodnienie włóknisto-torbielowe, kamica i zapalenia dróg żółciowych, zapalenia i marskości wątroby
Kalcytonina	Rak rdzeniasty tarczycy – ok. 100%	P, D	Zespół MEN, Nowotwory piersi i płuc.
TPS, TPA CYFRA 21-1	Różne nowotwory - szybkość proliferacji	L, W	Nienowotworowe choroby i guzy łagodne różnych tkanek.

P – przesiew, D – diagnoza, R – rokowanie, L – obserwacja leczenia, W – obserwacja wznowy

Tabela 3.11. Wartości referencyjne dla markerów nowotworowych

Marker	Wartości referencyjne		
AFP	$\leq 5,8$ j/L		
CA-125	< 35 kJ/L		
CA-15.3	< 25 kJ/L		
CA-19.9	< 27 kJ/L		
PSA <40 r. ż. 40-50 r.ż. 50 – 60 r.ż. 60-70 r.ż. >70 r.ż.	<table style="border: none;"> <tr> <td style="border: none;"> $< 1,4$ $\mu\text{g/L}$ $< 2,0$ $\mu\text{g/L}$ $< 3,1$ $\mu\text{g/L}$ $< 4,1$ $\mu\text{g/L}$ $< 6,45$ $\mu\text{g/L}$ </td> <td style="border: none; vertical-align: middle;"> $< 4,0$ $\mu\text{g/L}$ </td> </tr> </table>	$< 1,4$ $\mu\text{g/L}$ $< 2,0$ $\mu\text{g/L}$ $< 3,1$ $\mu\text{g/L}$ $< 4,1$ $\mu\text{g/L}$ $< 6,45$ $\mu\text{g/L}$	$< 4,0$ $\mu\text{g/L}$
$< 1,4$ $\mu\text{g/L}$ $< 2,0$ $\mu\text{g/L}$ $< 3,1$ $\mu\text{g/L}$ $< 4,1$ $\mu\text{g/L}$ $< 6,45$ $\mu\text{g/L}$	$< 4,0$ $\mu\text{g/L}$		

Marker	Wartości referencyjne
CEA	< 5 µg/L
β HCG	< 10 jm/L
TPS	< 80 j/L
CYFRA 21-1	< 3,3 µg/L
NSE	< 25 µg/L
Ig monoklonalne	0

3.5. Opis przypadków

Przypadek 3.1

Mężczyzna lat 60, zgłosił się do przychodni urologicznej z objawami częstego parcia na mocz i utrudnienia w jego oddawaniu. Posiadał wynik oznaczenia PSA – 3,2 µg/L. Badanie urodynamiczne wykazało utrudnienie odpływu moczu. Badaniem *per rectum* stwierdzono równomierne powiększenie prostaty i dobre odgraniczenie od otaczających tkanek. Przewodbytnicze USG nie wykazało zmian ogniskowych, objętość gruczołu około 37 mL.

- Jaka jest wstępna diagnoza? Jakie badania zleciłbyś?

Zalecono leczenie objawowe i kontrolę poziomu PSA co 6 miesięcy. Po 10 miesiącach pacjent przestał zażywać leki. W ciągu 3 lat nie następowało nasilenie objawów; poziom PSA wzrósł do 4,6 µg/L. Ponowne USG wykazało pojedyncze drobne zwapnienia i zachowaną torebkę gruczołu, objętość gruczołu 40 mL.

Po roku poziom PSA wynosił 6,6 µg/L, przy wolnym-fPSA = 12%.

- Jakie badania należałoby wykonać?

Pod kontrolą USG pobrano 6 próbek do badania histopatologicznego. W dwóch wykazano obecność *adenocarcinoma*.

- Zinterpretuj wyniki. Jakie badanie należałoby wykonać?

Przewodbytnicza PET z kontrastem gadolinowym wykazała obecność 6 ognisk wielkości 3-5 mm, w obwodowej części gruczołu. Część z nich łączyła się z jego torebką.

- Jakie jest zaawansowanie nowotworu? Jakie są możliwości leczenia?
- Czy oznaczanie poziomu PSA może mieć znaczenie przy obserwacji postępu leczenia i ewentualnej wznowy?

Pacjenta leczono radioterapią (35 × 2 Gy) z następczym leczeniem uzupełniającym antagonistą testosteronu. Poziom PSA po zakończeniu terapii wynosił 0,350 µg/L. W okresie 3 lat po zakończeniu leczenia poziom PSA badany, co 3 miesiące wynosił od 0,145 do 0,260 µg/L. Pacjent, obecnie lat 67, nie zgłasza dolegliwości związanych z utrzymaniem i oddawaniem moczu.

- O czym to świadczy?

Po skutecznej i prawidłowej prostatektomii poziom PSA jest nieoznaczalny, a po radioterapii może dochodzić nawet do 2 µg/L bez wznowy nowotworu.

Przypadek 3.2

Pacjentka lat 73, 4 ciąży, menopauza od 23 lat, zgłosiła się z powodu trwających od 3 tygodni krwawień z dróg rodnych, bólami okolicy nadłonowej i zatrzymaniem moczu od 2 dni. Badanie ginekologiczne wykazało obecność guza (7 cm) wychodzącego z lewej ściany pochwy. Przepochwowe USG wykazało zgrubienie endometrium (około 2,4 cm), jajniki w normie. TK klatki piersiowej, kości i głowy nie wykazało obecności przerzutów. W wątrobie dwa guzy o średnicy 7,8 i 3,5 cm.

Badanie histo-patologiczne wskazywało na nabłoniaka kosmówkowego. Immunohistochemicznie wykazano obecność antygenów cytokeratynowych β AE1 i 2 oraz nieobecność AFP i CD-30.

- Jakie jest rozpoznanie? Czy oznaczanie rozpuszczalnych markerów nowotworowych ma w tym przypadku znaczenie?

Poziom β hCG w surowicy 2.700.000 jm/L; poziomy CA125 i AFP w normie.

- Jakie leczenie należy wdrożyć? Dlaczego wykonano badania CA125 i AFP? Podano chemioterapię złożoną.
Po pierwszym cyklu chemii - β hCG, 646 jm/L. Ustało krwawienie.
Po siódmym cyklu – β hCG, 5 jm/L
- Jakie badania należy wykonać? Jak kontrolować stan pacjentki po skończonej terapii?

Przypadek 3.3

Mężczyzna, lat 50 zgłosił się z powiększeniem jądra lewego. Dzień przed zabiegiem badania laboratoryjne wykazały w surowicy: AFP i CEA w normie, β hCG 13 jm/L.

Badanie histopatologiczne usuniętego jądra wykazało nienasieniakowego raka jądra.

Po 6 miesiącach chemioterapii poziom β hCG wynosił 0,4 jm/L.

- Czy nowotwór można uznać za wyleczony?
Po 12 miesiącach poziom β hCG wzrósł do 95 jm/L przy prawidłowych wartościach CEA i AFP.
- Jakie badanie należy przeprowadzić?
TK klatki piersiowej – ognisko w płucach o średnicy 15 mm.

Przeprowadzono chemioterapię. Po 8 miesiącach ognisko w płucach zanikło, a poziom β hCG obniżył się do 3,0 j/m/L, a po następnych 4 miesiącach do 0,5 j/m/L.

Oceń rolę markerów nowotworowych w monitorowaniu leczenia tego nowotworu.

Przypadek 3.4

Mężczyzna lat 64 przyjęty z powodu 11 dniowego zatrzymania stolca, bólów brzucha i wzdęcia. RTG brzucha wykazało poszerzenie pętli jelita cienkiego, sugerujące niedrożność. Podczas zabiegu dokonano resekcji prawej części jelita grubego wraz guzem 5×6 cm w części wstępującej. Badanie histopatologiczne – średnio-zróżnicowany rak gruczołowy naciekający otaczającą tkankę tłuszczową, lecz nieobejmujący otrzewnej. Spośród 26 okolicznych węzłów chłonnych 4 miały ogniska przerzutowe. TK brzucha i klatki piersiowej nie wykazało przerzutów odległych. We krwi pobranej przed zabiegiem poziom CEA – 1,7 μ g/L.

Zastosowano chemioterapię uzupełniającą 5-fluorouracylem przez 6 miesięcy. Badanie kontrolne po 3 i 6 miesiącach wykazało CEA około 1 μ g/L.

- Czy oznaczanie poziomu CEA miało w tym przypadku znaczenie?

Po 12 miesiącach od zabiegu zgłosił się z dusznością trwającą od 2 tygodni. Stwierdzono średnio-duże wole wieloguzkowe, potwierdzone badaniem USG. CEA – 8,9 μ g/L, tyreoglobulina, TSH i fT4 w normie. Nie wykonano biopsji cienkoigłowej. Wypisano z rozpoznaniem wola wieloguzkowego.

- Jaka jest twoja interpretacja badań laboratoryjnych?

Po 2 miesiącach pacjent przyjęty z ciężką dusznością, oddech świszczący; laryngoskopia wykazała znaczne zwężenie tchawicy. TK klatki piersiowej: duża masa tarczycy zstępująca do klatki piersiowej, liczne ogniska przerzutowe w płucach, wątroba wolna, CEA 130 μ g/L.

- Czy oznaczanie CEA miało znaczenie na tym etapie?

Dwa kursy chemioterapii zredukowały rozmiary przerzutów w tarczycy i płucach, poprawiając komfort pacjenta. Mimo dalszych 6 cykli chemioterapii pacjent zmarł 18 miesięcy po rozpoznaniu rozsiewu choroby.

- Podaj swoje uwagi.

Rzadko zdarza się żeby guz początkowo niedający wzrostu CEA przy dużej masie nowotworu (T3N1), następnie dawał wzrost CEA przy progresji. Przerzuty raka jelita grubego do tarczycy to wielka rzadkość.

Przypadek 3.5

Mężczyzna lat 67, były palacz – 60 paczko/lat. W wywiadzie niewydolność nerek (niedializowany) i przewlekła obturacyjna choroba płuc. Przyjęty na

oddział z powodu nasilającej się duszności. RTG klatki piersiowej – przejaśnienie płuc, pęcherze rozejmowe, sylwetka serca powiększona, płyn opłucnej w katach przeponowo-żębrowych, bez zmian ogniskowych. Badania laboratoryjne: kreatynina 1,9 mg/dL, SCC 8,6µg/L, Pro GRP 60 ng/L, NSE 14 µg/L, CYFRA 21.1 3,3 µg/L, CEA 6,5 µg/L, CA15.3 7 kj/L, CA125 36 kj/L, CA 19.9 10 kj/L.

- Jak zinterpretujesz przedstawione wyniki? Jakie rozpoznanie postawiono?
Większość markerów nowotworowych wydała się drogą nerek. Niewydolność nerek powoduje ich wzrost z powodu retencji. Większość markerów w tym przypadku wzrosła umiarkowanie. Stan pacjenta, należącego grupy ryzyka raka płuc, pogorszył się z powodu zatorowości płucnej. W takich przypadkach powtórne oznaczenie po 3-4 tygodniach może odpowiedzieć czy obserwowany wzrost był z powodu zmian łagodnych histologicznie (wartości stabilne), czy z powodu raka płuc (wówczas obserwuje się przyrost).

Przypadek 3.6

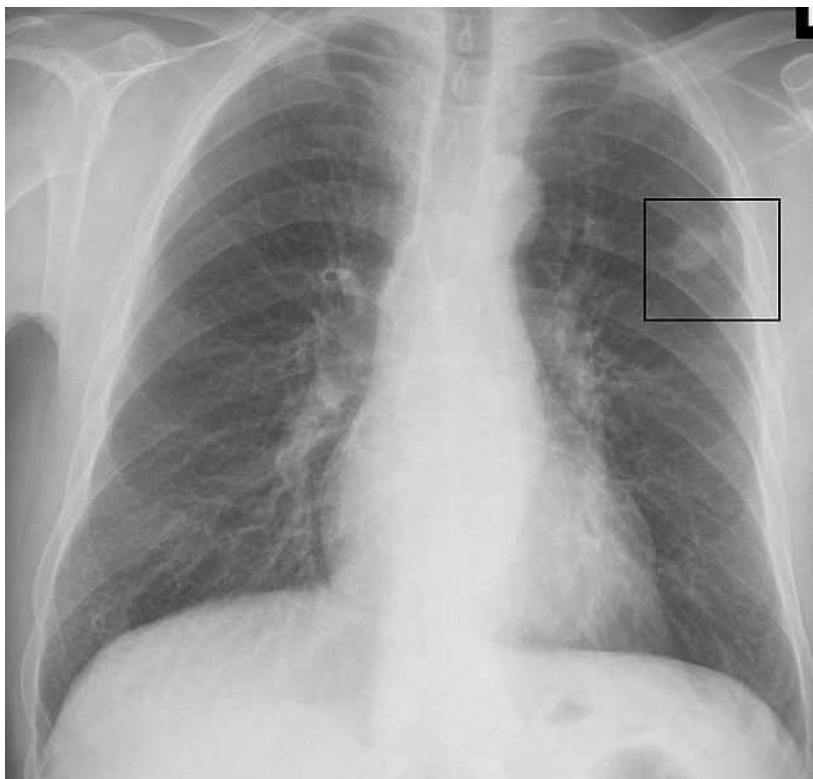
Mężczyzna lat 71, niepalący, przyjęty na oddział celem dalszej diagnostyki zmiany stwierdzonej w przeglądowym RTG klatki piersiowej. Zdjęcie wykonano z powodu nawracających infekcji dróg oddechowych.

Badanie RTG wykazało pojedyncze ognisko w płucu lewym, bez zajęcia węzłów chłonnych. Wykonano badania TK klatki piersiowej i jamy brzusznej bez zajęcia węzłów i ognisk przerzutowych.

Pobrano krew na podstawowe badania laboratoryjne (bez odchyień od wartości prawidłowych) oraz na oznaczanie markerów nowotworowych.

Poziomy markerów:

Parametr	Wynik	Wartości prawidłowe
SCC	0,1	<2 µg/L
ProGRP	41	<50 ng/L
NSE	11	<25 µg/L
CYFRA 21.1	5,7	<3,3 µg/L
CEA	8,1	<5 µg/L
CA 15.3	22	<30 kj/L
CA 125	13	<35 kj/L
Kreatynina	1,1	<1,3 mg/dL



- Oceń wyniki badań laboratoryjnych. Jakie znaczenie ma oznaczenie poziomu kreatyniny dla interpretacji tych wyników?
Badanie histopatologiczne wycinka z gruboigłowej biopsji transtorakalnej wykazało obecność gruczolakoraka.
- Czy wyniki badania markerów nowotworowych są zgodne z wynikami innych badań? Jakie rozpoznanie postawiłbyś?
Adenocarcinoma T2N0M0, Stadium 1B.

4. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA WYBRANYCH ZABURZEŃ HEMATOLOGICZNYCH

Agnieszka Jankowska-Kulawy

4.1. Niedokrwistości (*Anaemiae*)

Niedokrwistość to stan kliniczny, w którym stężenie hemoglobiny (HGB), liczba krwinek czerwonych (E) i wartość wskaźnika hematokrytowego (HCT) są niższe od przyjętych dolnych zakresów wartości referencyjnych dla danego wieku, płci i warunków środowiska.

Najbardziej wiarygodnym parametrem w diagnostyce niedokrwistości jest stężenie hemoglobiny. Przy założeniu, że objętość krwi krążącej nie ulega istotnym zmianom, jako kryterium stopnia niedokrwistości przyjęto stężenie hemoglobiny w jednostce objętości krwi, ponieważ to właśnie ona jest nośnikiem jednego z najistotniejszych dla życia pierwiastków – tlenu.

Niedokrwistość ze względu na nasilenie możemy podzielić na:

- łagodną: HGB 10-12 g/dL u kobiet i <13,5 g/dL u mężczyzn
- umiarkowaną: HGB 8-9,9 g/dL
- ciężką: HGB 6,5-7,9 g/dL
- zagrażającą życiu: HGB <6,5 g/dL

Wskaźnik hematokrytowy (HCT) jest parametrem zależnym od gospodarki wodno-elektrolitowej organizmu i może podlegać znacznym wahaniom w różnych stanach chorobowych. Rozbieżności między wielkością wskaźnika hematokrytowego i rzeczywistą masą krwinek czerwonych mogą być spowodowane:

- wzrostem objętości osocza (hematokryt będzie nieproporcjonalnie niski w stosunku do masy erytrocytów) w: przewodnieniu, ciąży, niewydolności nerek z oligurią, zastoinowej niewydolności serca, przewlekłych chorobach przebiegających z hipalbuminemią, splenomegalii, długotrwałym przebywaniu w pozycji leżącej;
- zmniejszeniem objętości osocza (hematokryt będzie nieproporcjonalnie wysoki w stosunku do masy erytrocytów) w: odwodnieniu organizmu przy współistniejącej nadmiernej utracie Na⁺, przedłużających się biegunkach, wadliwej czynności jelit i zwężeniu odźwiernika, dializie otrzewnowej roztworami hipertonicznymi, kwasicy w przebiegu cukrzycy, rzekomej nadkrwistości (tzw. *stress erythrocytosis*), przewlekłej utracie płynów;
- zmniejszeniem zarówno objętości osocza, jak i ilości składników komórkowych w: ostrej utracie krwi, niektórych chorobach nowotworowych i gruczołów dokrewnych (panhipopituitarizm).

W rozpoznawaniu niedokrwistości parametrem lepszym niż wskaźnik hematokrytowy jest liczba krwinek czerwonych, jednakże parametr ten ma ograniczone zastosowanie, ponieważ w niedokrwistości liczba krwinek

czerwonych może być prawidłowa, a nierzadko spotyka się niedokrwistość ze zwiększoną liczbą krwinek czerwonych. Wobec tego, opieranie się tylko i wyłącznie na liczbie krwinek czerwonych może prowadzić do dużych błędów diagnostycznych.

Wspomniane powyżej parametry morfologiczne krwi obwodowej są przydatne w szczegółowej diagnostyce różnych typów niedokrwistości. Natomiast aby ustalić dominujące cechy w zakresie zmian morfologii krwinek czerwonych (kształt, wielkość), stopień ich wysycenia hemoglobina oraz obecność poszczególnych typów krwinek czerwonych przydatne są wskaźniki czerwokrwińkowe: MCV (*mean cell volume* – średnia objętość krwinki czerwonej), MCH (*mean cell hemoglobin* – średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej), MCHC (*mean cell hemoglobin concentration* – średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej) i RDW (*red cell distribution width* – wskaźnik anizocytozy), histogram krwinek czerwonych oraz rozmaz krwi obwodowej.

MCV jest podstawą jednego z najczęściej stosowanych podziałów niedokrwistość tj. podziału morfologicznego. Ze względu na MCV niedokrwistości możemy podzielić na:

- mikrocytowe: MCV <80 fL
- normocytowe: MCV w zakresie wartości referencyjnych 80-100 fL
- makrocytowe: MCV >100 fL

Z kolei wśród niedokrwistości mikrocytowych można wyróżnić:

- normochromiczne MCV 72-80 fL, MCHC 30-34 g/dL: przewlekłe choroby nieinfekcyjne, przewlekłe stany zapalne, choroby endokrynologiczne (nadczynność tarczycy, niedoczynność kory nadnerczy), przewlekłe choroby wątroby i nerek, choroby rozrostowe układu krwiotwórczego, nowotwory lite naciekające szpik kostny;
- hipochromiczne MCV 50-72 fL, MCHC <30 g/dL: niedobór żelaza, anemia syderoblastyczna, niedobór pirydoksyny (wit. B₆), przewlekłe zatrucie łożowcem, talasemie, niektóre hemoglobinopatie.

Inny podział niedokrwistości obejmuje klasyfikację patogenetyczną. O patogenezie niedokrwistości można wnioskować na podstawie wywiadu, badania przedmiotowego oraz na podstawie stopnia odnowy układu czerwono-krwinkowego ocenianego ilością retikulocytów. Najbardziej wartościowym wskaźnikiem odnowy erytrocytów jest bezwzględna liczba retikulocytów (RETC) tj. liczba retikulocytów w jednostce objętości krwi. Jeżeli analizatory hematologiczne nie podają wartości tego parametru, to można go wyliczyć z następującego wzoru:

$$\text{RETC} = \text{retikulocyty} \times \text{liczba erytrocytów} / 100 \text{ (G/L)}$$

gdzie: retikulocyty (%), liczba erytrocytów (T/L)

Wartości referencyjne dla bezwzględnej liczby retikulocytów wynoszą: 20-100 G/L.

Podziały niedokrwistości według przyczyn są liczne i dość zróżnicowane. Jedną z możliwych klasyfikacji patogenetycznych podaje następujące przyczyny niedokrwistości (tabela 4.1).

Tabela 4.1. Klasyfikacja patogenetyczna niedokrwistości

I. Niedostateczne tworzenie erytrocytów (niedokrwistości aregeneracyjne)
1. Niedokrwistości aplastyczne
2. Niedokrwistości hipoplastyczne
II. Utrata krwi (niedokrwistość pokrwotoczna)
1. Ostra niedokrwistość pokrwotoczna
2. Przewlekła niedokrwistość pokrwotoczna
III. Zaburzenia erytropoezy z niedoboru czynników krwiotwórczych (niedokrwistości niedoborowe i achrestyczne)
1. Niedokrwistość z niedoboru żelaza
2. Niedokrwistości megaloblastyczne
3. Niedokrwistości z niedoboru innych czynników (wit. B ₁ , B ₆ , C)
IV. Zaburzenia erytropoezy towarzyszące różnym chorobom - niedokrwistości objawowe w: zakażeniach kolagenozach, chorobach nerek, wątroby, nowotworowych ołowicy z powodu naciekania szpiku kostnego
V. Nadmierny rozpad erytrocytów i skrócenie czasu ich przeżycia (niedokrwistości hemolityczne)
<u>1. Niedokrwistości wywołane przez czynniki wewnątrzkrwinkowe:</u> defekty błonowe: wrodzona sferocytoza, owalocytoza, nocna napadowa hemoglobinuria defekty enzymatyczne: niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G-6-PD), kinazy pirogronianowej defekty hemu: porfiria erytropoetyczna defekty globiny: <ul style="list-style-type: none"> • jakościowe: hemoglobinopatie • ilościowe: talasemie
<u>2. Niedokrwistości wywołane przez czynniki pozakrwinkowe:</u> immunologiczne (przeciwciała) mikroangiopatyczne (zespół hemolityczno-mocznicowy, DIC, nadciśnienie złośliwe, przerzuty nowotworowe) hipersplenizm zakażenia (<i>Clostridium perfringens</i> , malaria) oparzenia hemoglobinuria marszowa chemiczne (ołów, benzen, pestycydy, chinidyna) biologiczne (jady węży, owadów, pasożyty, wirusy) mechaniczne (sztuczne zastawki, endoprotezy)

Niedokrwistość rozpoznajemy, jeżeli występują następujące objawy kliniczne (objawy ogólne niedokrwistości):

- bladość skóry i śluzówek
- skłonność do omdleń
- objawy związane ze zmniejszeniem zdolności przenoszenia tlenu: ogólne osłabienie, duszność, zła tolerancja wysiłku fizycznego, przyspieszone bicie serca, bóle dławicowe
- szum w uszach
- uczucie senności
- łatwe męczenie się

Nasilenie tych dolegliwości zależy od szybkości narastania niedokrwistości i zdolności kompensacyjnych ustroju (wiek, dotychczasowa wydolność różnych narządów). Objawy te są bardziej nasilone przy gwałtownej anemizacji (np. w przebiegu ostrego krwotoku), a łagodniejsze przy powolnej utracie krwi. W przypadku wolno narastającej niedokrwistości organizm pacjenta stopniowo adaptuje się do zmieniających się warunków i stosunkowo dobrze toleruje nawet bardzo niskie stężenia hemoglobiny tak, że objawy ze strony układu krążenia i oddechowego pojawiają się dopiero przy stężeniach hemoglobiny rzędu 6-7 g/dL.

4.1.1. Niedokrwistość z niedoboru żelaza

Niedostateczna podaż żelaza w diecie (dieta wegetariańska) jest częstą przyczyną niedokrwistości z niedoboru żelaza. Jedną z najczęstszych przyczyn są krwawienia: z przewodu pokarmowego (krwotoczne stany zapalne błony śluzowej przewodu pokarmowego, choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy), dróg rodnych (obfite miesiączki) i układu moczowego (kamica, nowotwory). Do utraty krwi dochodzi również w wyniku skaz krwotocznych (hemofilia, małopłytkowość) oraz w wyniku stosowania antykoagulantów i leków działających drażniąco na błonę śluzową przewodu pokarmowego. Do zmniejszenia stężenia żelaza w surowicy dochodzi również w wyniku upośledzenia jego wchłaniania np. w stanach po resekcji żołądka zmniejszających powierzchnię wchłaniania, w wyniku uporczywych biegunek, w zespołach złego wchłaniania, a także przy stosowaniu diety upośledzającej wchłanianie (przewaga pokarmów mlecznych oraz zwiększona zawartość w pokarmach fosforanów, fitynianów, szczawianów, taniny, także stosowanie środków alkalizujących). Zwiększone zapotrzebowanie na żelazo występuje w okresie ciąży, porodu, laktacji, w okresie intensywnego wzrostu organizmu. W przypadku pacjentów z niedokrwistością z niedoboru witaminy B₁₂ lub/i kwasu foliowego, w trakcie leczenia tymi witaminami zwiększone zapotrzebowanie na żelazo występuje w czasie przełomu retikulocytowego.

U pacjentów z niedokrwistością z niedoboru żelaza oprócz objawów ogólnych niedokrwistości mogą pojawić się: zajady, kruchość i charakterystyczne prążkowanie paznokci, matowość włosów, ich rozdawianie

oraz wypadanie, trudności w połykaniu pokarmów, spaczone łąknienie, zaburzenia pamięci i koncentracji uwagi.

4.1.1.1. Zmiany parametrów morfologicznych w niedokrwistości z niedoboru żelaza

Dla niedokrwistości z niedoboru żelaza charakterystyczny jest spadek stężenia hemoglobiny, o wiele większy niż zmniejszenie liczby krwinek czerwonych, wskaźnika hematokrytowego. Zmianie ulegają wyliczane parametry erytrocytów. Obserwuje się: wzrost RDW, zmniejszenie wartości wskaźników czerwonekrwinkowych: MCV, MCH, MCHC w zależności od nasilenia niedokrwistości oraz zmniejszenie liczby retykulocytów. Liczba płytek może być prawidłowa lub zwiększona, przy czym ich morfologia pozostaje bez zmian. W rozmazie krwi obwodowej stwierdza się różnego stopnia anizocytozę, z przewagą mikrocytów, poikilocytozę oraz różnego stopnia hipochromię. W rozmazie krwi obwodowej pacjentów z niedokrwistością z niedoboru żelaza mogą pojawić się charakterystyczne dla tego typu niedokrwistości krwinki czerwone: anulocyty, krwinki tarczowate oraz krwinki ołówkowate.

W badaniu cytologicznym szpiku kostnego stwierdza się zmiany głównie w układzie czerwonekrwinkowym szpiku kostnego, dwa pozostałe układy – granulocytotwórczy i megakariocytowy pozostają bez zmian. Dochodzi do hiperplazji układu czerwonekrwinkowego, erytropoeza jest bogato reprezentowana, z przewagą erytroblastów z małą ilością hemoglobiny (zasadochłonne i wielobarwliwe). W dojrzewających erytroblastach obserwuje się nierównomierną wakuolizację cytoplazmy. Barwienie preparatów szpiku kostnego metodą Perlisa ujawnia brak rezerw wolnego żelaza i brak syderoblastów.

4.1.1.2. Odchylenia w badaniach biochemicznych w niedokrwistości z niedoboru żelaza

Odchylenia w badaniach biochemicznych i kierunek zmian w niedokrwistości z niedoboru żelaza przedstawia tabela 4.2.

Tabela 4.2. Odchylenia w badaniach biochemicznych w niedokrwistości z niedoboru żelaza

Parametr	Kierunek zmian	Wartości referencyjne
Stężenie żelaza w surowicy	↓	60-160 µg/dL (M) 40-145 µg/dL (K)
Stężenie ferrytyny w surowicy	↓	15-300 µg/L
Całkowita zdolność wiązania żelaza TIBC	↑	45-75 µmol/L
Stężenie transferyny w surowicy	↑	2-4 g/L
Wysycenie transferyny żelazem	↓	16-45%
Zawartość syderoblastów w szpiku	brak	40-60%
Stężenie rozpuszczalnego receptora dla transferyny w surowicy (sTfR)	↑	0,6-8,5 µg/dL
Wchłanianie żelaza w przewodzie pokarmowym	↑	–

4.1.2. Niedokrwistość makrocytowa

Najbardziej charakterystyczną postacią tego typu niedokrwistości jest niedokrwistość megaloblastyczna, której główną przyczyną są niedobory witaminy B₁₂ i/lub kwasu foliowego. Niedobór tych czynników prowadzi do upośledzenia syntezy zasad purynowych, co z kolei upośledza syntezę DNA. Obserwuje się nieprawidłowości w zakresie wytwarzania erytroblastów, przedwczesne ich niszczenie w szpiku kostnym (nieefektywna erytropoeza) oraz skrócenie czasu przeżycia prawidłowych erytrocytów. Wytwarzane erytrocyty mają większą objętość niż prawidłowe krwinki czerwone (tor odnowy megaloblastycznej). Zaburzenia dotyczą komórek wszystkich układów szpiku kostnego ale szczególnie ujawniają się w układzie czerwono krwinkowym.

Witamina B₁₂ produkowana jest przez bakterie, rośliny w ogóle jej nie zawierają, wobec tego wegetarianizm i szczególnie jego odmiana - weganizm są jedną z częstych przyczyn niedokrwistości megaloblastycznej.

Witamina B₁₂ wchłaniana jest w końcowej części jelita cienkiego, a czynnikiem niezbędnym do jej wchłaniania jest czynnik wewnętrzny (IF). Wrodzony brak lub zaburzona funkcja tego czynnika mogą prowadzić do niedokrwistości megaloblastycznej. Witamina B₁₂ może być nieprawidłowo wchłaniana w wyniku zmian chorobowych jelita cienkiego. Dotyczy to zmian nowotworowych, zapalnych błony śluzowej jelita cienkiego lub jego resekcji. Nieprawidłowy poziom witaminy B₁₂ w surowicy może być również spowodowany niedostatecznym uwalnianiem tej witaminy z pokarmów, w przypadku niedoborów kwasu solnego i pepsyny po gastrektomii, wagotomii.

W wielu przypadkach w niedokrwistości złośliwej w surowicy pacjentów stwierdza się obecność auto przeciwciał. W 85% przypadków stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko komórkom okładzinowym trzonu i dna żołądka

produkującym czynnik wewnętrzny, w 55% przeciwciał przeciwko czynnikowi wewnętrznemu. W surowicy pacjentów stwierdza się również obecność przeciwciał przeciwko kompleksowi czynnik wewnętrzny/witamina B₁₂, co uniemożliwia jej wchłanianie.

Witamina B₁₂ może być zużywana w nadmiarze przez bakterie bytujące w zastoinowych pętlach jelit (zespół pętli zastoinowej). Również pasożyty skutecznie konkurują z gospodarzem o witaminę B₁₂ (bruzdogłowiec szeroki – *Diphyllobothrium latum*).

Zwiększone zapotrzebowanie na witaminę B₁₂ występuje w przebiegu licznych ciąż, w okresie porodu, laktacji, u dzieci w okresie intensywnego wzrostu, a także w chorobach przebiegających z nasiloną proliferacją.

Z kolei niedokrwistość megaloblastyczna spowodowana niedoborem folianów może być spowodowana wzmożoną syntezą kwasów nukleinowych u kobiet w ciąży, w przewlekłych niedokrwistościach hemolitycznych, w wyniku nadmiernej utraty folianów z organizmu np. w wyniku zakażeń z długotrwałą gorączką. Ten typ niedokrwistości może występować u dzieci karmionych mlekiem kozim, które jest ubogie w foliany, u ludzi starszych (zaburzenia łaknienia), osób z zaburzeniami umysłowymi, nadużywających alkoholu oraz w wyniku długotrwałego gotowania potraw i braku w diecie produktów roślinnych. Obniżone stężenie folianów w surowicy może być spowodowane zaburzeniami wchłaniania w chorobach jelita cienkiego (celiakia, sprue tropikalne, stany po zabiegach chirurgicznych, zespół ślepej pętli). Wady metaboliczne, takie jak wrodzony brak lub nieprawidłowa funkcja enzymów biorących udział w metabolizmie kwasu foliowego oraz działanie antymetabolitów kwasu foliowego to również częste przyczyny prowadzące do niedokrwistości megaloblastycznej.

Niedokrwistość megaloblastyczna charakteryzuje się triadą objawów. Ze strony układu krwiotwórczego (objawy ogólne niedokrwistości), ze strony układu pokarmowego: brak apetytu, nudności, wymioty, niestrawność, utrata poczucia smaku, stany zapalne języka, cechy stanu zapalnego błony śluzowej jamy ustnej, histaminooporna achlorhydria. Objawy neurologiczne wynikają z demielinizacji neuronów rdzenia kręgowego i kory mózgowej i w wielu przypadkach mogą być pierwszymi oznakami niedoboru witaminy B₁₂. Im więcej czasu upłynie od momentu pojawienia się objawów neurologicznych do rozpoczęcia leczenia, tym szanse na to, że objawy te cofną się, są mniejsze. Uważa się, że zmiany trwające dłużej niż pół roku są trwałe. Do najczęstszych objawów neurologicznych należą: parestezje rąk i stóp, uczucie drętwienia kończyn, niestabilność chodu, zwyrodnienie sznurów tylnych i bocznych rdzenia kręgowego, co wiąże się z utratą czucia wibracji i położenia kończyn (najwcześniejszy objaw), zaburzenia psychiczne, takie jak: utrata pamięci, depresja, urojenia. Objawy skórne dotyczą zmiany zabarwienia skóry na kolor cytrynowożółty, woskowy.

4.1.2.1. Zmiany parametrów morfologicznych w niedokrwistości makrocytowej

Jedną z najwcześniejszych zmian jest wzrost MCV >100 fL, wyprzedza on pojawienie się objawów niedokrwistości. W dalszym etapie spada stężenie hemoglobiny, hematokryt i liczba krwinek czerwonych, rośnie MCH. W rozmazie krwi obwodowej w zależności od nasilenia niedokrwistości stwierdza się anizocytozę i poikilocytozę z obecnością makrocytów, megalocytów i owalocytów. Liczba retikulocytów jest mała. W erytrocytach mogą pojawić się ciała Howella-Jolly'ego, pierścienie Cabota i nakrapiania zasadochłonne. Stwierdza się leukopenię i hipersegmentację jąder granulocytów obojętno-chłonnych (liczba segmentów jądrowych >6), umiarkowaną małopłytkowość.

Warunkiem prawidłowej oceny preparatów szpiku kostnego w przypadku diagnozowania niedokrwistości megaloblastycznej jest pobranie szpiku przed rozpoczęciem leczenia witaminą B₁₂. Szpik kostny jest hiperplastyczny, wybitnie bogatokomórkowy, z torem odnowy megaloblastycznej. Stwierdza się spadek stosunku mielopojezy (M) do erytropoezy (E). Stosunek M:E w niedokrwistości megaloblastycznej wynosi 1:1. Erytropoeza wykazuje cechy odmłodzenia i dysplazji o różnym stopniu nasilenia, tor odnowy megaloblastycznej, rośnie liczba syderoblastów. Układ granulocytotwórczy również wykazuje cechy dojrzewania megaloidalnego, co przejawia się pojawieniem się szpiku kostnym olbrzymich metamielocytów i pałeczek. Zmiany w układzie megakariocytowym dotyczą zaburzenia płatowatości jąder megakariocytów.

4.1.2.2. Odchylenia w badaniach biochemicznych i immunologicznych w niedokrwistości makrocytowej

Odchylenia w badaniach biochemicznych i immunologicznych w niedokrwistości makrocytowej oraz kierunek zmian przedstawia tabela 4.3.

Tabela 4.3. Odchylenia w badaniach biochemicznych i immunologicznych w niedokrwistości makrocytowej

Parametr	Kierunek zmian	Wartości referencyjne
Stężenie witaminy B ₁₂ w surowicy	↓	165-675 pmol/L
Stężenie aktywnej witaminy B ₁₂ (holotranskobalaminy) w surowicy	↓	42-174 pmol/L
Stężenie kwasu metylomalonowego w surowicy i moczu	↑	w surowicy: 10-30 µg/dL w moczu: 1,4-2,8 mg/dobę
Stężenie homocysteiny w surowicy	↑	4,1-21,3 µmol/L [^]
Miano przeciwciał przeciwko komórkom okładzinowym	↑	–

Parametr	Kierunek zmian	Wartości referencyjne
żołądka		
Miano przeciwciał przeciwko czynnikowi IF	↑	–
Miano przeciwciał przeciwko kompleksowi czynnik IF/wit. B ₁₂	↑	–

wg Lothar Thomas Clinical Laboratory Diagnostics 1998

4.1.2.3. Testy czynnościowe w diagnostyce laboratoryjnej niedokrwistości makrocytowej

Test Schillinga (1953 r.) – test na wchłanianie witaminy B₁₂. Jest pośrednią metodą ustalenia obecności czynnika wewnętrznego IF w soku żołądkowym. Pacjentowi podaje się jednocześnie domięśniowo dużą dawkę (1 mg) witaminy B₁₂ i doustnie 1 µg witaminy B₁₂ znakowanej ⁵⁷Co. Podana domięśniowo witamina B₁₂ powoduje wysycenie białka wiążącego tą witaminę w osoczu i wydalanie dużej części wchłoniętej witaminy B₁₂ z moczem. Frakcję wydalonej witaminy B₁₂ ocenia się w 24-godzinnej zbiorce moczu. Jeżeli w moczu znajdzie się mniej niż 10% dawki podanej doustnie, świadczy to o upośledzeniu wchłaniania witaminy B₁₂.

4.1.2.4. Odchylenia w badaniach biochemicznych oraz kierunek zmian w niedokrwistości makrocytowej spowodowanej niedoborem kwasu foliowego

Tabela 4.4. Odchylenia w badaniach biochemicznych w niedokrwistości makrocytowej spowodowanej niedoborem kwasu foliowego

Parametr	Kierunek zmian	Wartości referencyjne
Stężenie kwasu foliowego w surowicy	↓	2-11 µg/L
Stężenie kwasu foliowego w erytrocytach	↓	150-700 µg/L
Stężenie kwasu formiminoglutaminowego (FIGLU)	↑	w moczu: <50 mg/12 h
Stężenie homocysteiny w surowicy	↑	4,1-21,3 µmol/L [^]

wg Lothar Thomas Clinical Laboratory Diagnostics 1998

4.1.3. Niedokrwistość hemolityczna

Niedokrwistości hemolityczne są grupą chorób związanych ze skróconym czasem przeżycia krwinek czerwonych, który generuje wzmożoną aktywność szpiku kostnego. Nasiloną erytropoeza stymuluje produkcję hemoglobiny, co umożliwia przy nieznacznie skróconym czasie przeżycia krwinek czerwonych, utrzymanie stężenia hemoglobiny w zakresie wartości prawidłowych. Niezależnie od przyczyny niedokrwistości skrócenie czasu przeżycia krwinek czerwonych do 5-10 dni powoduje rozwój pełnoobjawowej niedokrwistości.

Czynniki patogenetyczne niedokrwistości hemolitycznej przedstawione zostały w części ogólnej dotyczącej niedokrwistości. Szczegółowe omówienie poszczególnych typów niedokrwistości hemolitycznych wykracza poza ramy tego opracowania.

Typowe objawy kliniczne związane z występowaniem niedokrwistości hemolitycznej obejmują: ogólne objawy niedokrwistości (przy spadku stężenia hemoglobiny do ok. 8 g/dL lub gdy niedokrwistość hemolityczna rozwija się bardzo szybko), zażółcenie skóry i błon śluzowych i żółtaczkę o różnym stopniu nasilenia, powiększenie śledziony.

4.1.3.1. Parametry hematologiczne hemolizy

Niedokrwistość hemolityczna jest typową niedokrwistością normochromiczną i normocytową (w niektórych przypadkach występuje makrocytoza). W morfologii krwi obwodowej obserwuje się spadek stężenia hemoglobiny i hematokrytu, natomiast MCV, MCH oraz MCHC pozostają w zakresie wartości prawidłowych. Liczba retykulocytów jest znacznie zwiększona. W rozmazie krwi obwodowej zmiany w wyglądzie krwinek czerwonych sugerujące niedokrwistość hemolityczną zależą od typu niedokrwistości. Mogą pojawić się sferocyty we wrodzonej sferocytozie, eliptycyty we wrodzonej eliptycytozie, krwinki sierpowate w niedokrwistości sierpowatokrwinkowej, akantocyty w niedoborze β -lipoprotein, fragmenty krwinek (schistocyty) w niedokrwistościach mechanicznych i immunologicznych. W szpiku kostnym oprócz zmian opisanych dalej jako parametry kompensacyjne obserwuje się wzmożoną komórkowość oraz spadek stosunku mielopoezy (M) do erytropoezy (E). Stosunek M/E w niedokrwistości hemolitycznej wynosi 1:1.

4.1.3.2. Parametry kompensacji w niedokrwistości hemolitycznej

Wzmożone niszczenie krwinek czerwonych jest wyrównywane przez nasiloną erytropoezę. Wobec tego, jeżeli mówimy o parametrach kompensacyjnych niedokrwistości hemolitycznej obserwowanych w szpiku kostnym, to jest wzmożona hiperplazja układu czerwonekrwinkowego, o prawidłowym torze dojrzewania, bez cech odmłodzenia i dysplazji. Z kolei wyrównawcze (kompensacyjne) zwiększenie aktywności układu czerwonekrwinkowego szpiku kostnego będzie przejawiało się we krwi: erytroblastozą, zwiększeniem liczby

retikulocytów do kilku a nawet kilkunastu procent oraz polichromatofilią (polichromazją) czyli pojawieniem się we krwi obwodowej erytrocytów zabarwionych w różnych odcieniach fioleto. Jest to zjawisko związane z niedokończonym procesem hemoglobinizacji i wcześniejszym niż prawidłowo przekazywaniem krwinek ze szpiku do krwi obwodowej. Im więcej w krwince pozostałości zasadochłonnego RNA z prekursorów krwinek czerwonych, tym krwinka jest bardziej fioletowa. Na skutek rozrostu tkanki krwiotwórczej będzie się ona rozprzestrzeniła do jam szpikowych i spowodowała zmniejszenie masy korowej części kości, stąd deformacje kostne i zmiany w badaniach radiologicznych.

4.1.3.3. Odchylenia w badaniach biochemicznych w niedokrwistości hemolitycznej

Odchylenia w badaniach biochemicznych w niedokrwistości hemolitycznej przedstawia tabela 4.5.

Tabela 4.5. Odchylenia w badaniach biochemicznych w niedokrwistości hemolitycznej

Parametr	Norma	WzmóŜona hemoliza
Bilirubina pośrodkowa w surowicy	<17 µmol/L	>17 µmol/L
Urobilinogen w moczu	obecny	wzmóŜony
Kał	prawidłowe zabarwienie	ciemne zabarwienie
Żelazo w surowicy	10-30 µmol/L	>20 µmol/L
Endogenny CO	16-20 µmol/L	>30 µmol/L
Haptoglobina w surowicy	30-150 µmol/L	spadek nawet do 0
LDH w surowicy (zwłaszcza frakcja LDH1)	norma	wzrost
Wolna hemoglobina w surowicy/osoczu	surowica: do 50 mg/dL heparynizowane osocze: do 20 mg/dL	wzrost
Hemoglobinuria	nieobecna	obecna
Hemosyderynuria	nieobecna	obecna

Dla ustalenia szczegółowej przyczyny niedokrwistości hemolitycznej konieczne jest wykonanie badań dodatkowych. Rodzaj tych badań oraz typy niedokrwistości hemolitycznych, w których dochodzi do zmian określonych parametrów przedstawia tabela 4.6.

Jednocześnie można badać bezpośrednio aktywność enzymów czerwono-krwinkowych (niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, kinazy pirogronianowej), metodami cytometrii przepływowej można badać strukturę błony komórkowej erytrocytów (wrodzona sferocytoza, eliptycytoza), metody elektroforetyczne są użyteczne w rozdziale elektroforetycznym hemoglobin

(hemoglobinopatie, talasemie), a badania immunofenotypowe pozwalają na identyfikację antygenów powierzchniowych (nocna napadowa hemoglobinuria).

Tabela 4.6. Badania laboratoryjne potwierdzające typ niedokrwistości hemolitycznej

Test	Typ niedokrwistości
Pośredni test antyglobulinowy PTA Bezpośredni test antyglobulinowy BTA	Niedokrwistości immunohemolityczne
Liza erytrocytów w zakwaszonym glicerolu AGLT – test przesiewowy	Wrodzona sferocytoza
Oporność osmotyczna erytrocytów	Wrodzona sferocytoza Niedokrwistość sierpowatokrwinkowa, talasemie
Test sacharozowy – test przesiewowy Kwaśny odczyn Hama	Nocna napadowa hemoglobinuria
Próba autohemolizy	Typ I – wrodzona niedokrwistość hemolityczna z niedoboru dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, niedokrwistość autoimmunohemolityczna Typ II – niedokrwistość hemolityczna z niedoboru kinazy pirogronianowej, nocna napadowa hemoglobinuria Typ III – sferocytoza wrodzona

4.1.4. Niedokrwistość aplastyczna

Niedokrwistość aplastyczna definiowana jest jako trójukładowa pancytopenia przebiegająca z obniżeniem liczby krwinek czerwonych, leukocytów i/lub płytek krwi, z hipo- bądź aplastycznym szpikiem kostnym, bez współistniejącego procesu nowotworowego.

Niedokrwistość aplastyczna może być wrodzona: zespół Fanconiego, zespół Diamonda i Blackfana, rodzinna niedokrwistość aplastyczna lub nabyta. Wśród czynników patogenetycznych mogących wywołać niedokrwistość aplastyczną należy wymienić:

- czynniki chemiczne: rozpuszczalniki organiczne, benzen, środki owadobójcze
- leki: metotreksat, chloramfenikol, sulfonamidy, niesterydowe leki przeciwzapalne
- zakażenia: wirus zapalenia wątroby (WZWB, WZWC), cytomegalowirus (CMV), wirus Epstein-Barr (EBV, mononukleozą zakaźną)
- czynniki fizyczne: promieniowanie jonizujące
- zaburzenia krwiotwórcze
- zaburzenia hormonalne

- inne: wstrząs anafilaktyczny, endotoksyczny, głódzenie, alkoholizm, toczeń układowy, hipersplenizm, neutropenia autoimmunizacyjna, neutropenia rodzinna
- postać „samoistna”

Niedokrwistość aplastyczna jest typem niedokrwistości normochromicznej, normocytowej lub makrocytowej. Obserwuje się leukopenię ze zmniejszeniem odsetka granulocytów w rozmazie krwi obwodowej, monocytopenię oraz małopłytkowość. Liczba retikulocytów jest obniżona, co wskazuje na zahamowanie procesu erytropoezy. Zasadnicze znaczenie dla rozpoznania ma badanie szpiku kostnego. Szpik jest ubogokomórkowy, hipoplastyczny. Stwierdza się zmniejszoną zawartość (<30%) komórek hematopoetycznych. Ich miejsce w szpiku kostnym zajmuje tkanka tłuszczowa, tak że stosunek liczby komórek tłuszczowych do krwiotwórczych wynosi >3. W przypadku ciężkich postaci niedokrwistości aplastycznej (w ok. 80% przypadków) następuje zwiększenie w szpiku kostnym odsetka komórek limfoidalnych, plazmatycznych, czasem też tucznych. Kryteria rozpoznania i ustalenia stopnia klinicznej ciężkości niedokrwistości aplastycznej obejmują:

Postać ciężka: spełnienie przynajmniej dwóch spośród trzech kryteriów:

- obniżenie liczby granulocytów poniżej 0,5 G/L
- obniżenie liczby płytek krwi poniżej 20,0 G/L
- obniżenie skorygowanego odsetka retikulocytów poniżej 1% oraz komórkowości szpiku kostnego poniżej 25%

Postać bardzo ciężka: odchylenia jak wyżej, z liczbą granulocytów poniżej 0,2 G/L oraz występowanie nawracających infekcji.

W badaniach biochemicznych stwierdza się zwiększenie stężenia żelaza w surowicy krwi, co spowodowane jest jego zmniejszonym wbudowywaniem do erytroblastów oraz wzrost szybkości opadania krwinek czerwonych, co związane jest między innymi z występowaniem niedokrwistości.

4.2. Nadkrwistości (*Polycythemiae*)

Mianem nadkrwistości określa się zwiększenie całkowitej masy krążących erytrocytów, co przejawia się między innymi wzrostem hematokrytu. O nadkrwistości możemy mówić, gdy wartość hematokrytu u kobiet przekracza 47%, a u mężczyzn 52%. Nadkrwistość prawdziwa (pierwotna czyli czerwienica prawdziwa) została omówiona w części dotyczącej przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych (rozd. 4.3.2). Również różnicowanie poszczególnych typów nadkrwistości jest omówione w tej części. Natomiast nadkrwistości wtórne mogą być spowodowane:

- niedotlenieniem tkanek: przebywanie na dużych wysokościach, hipowentylacja spowodowana znaczną otyłością, palenie tytoniu
- chorobami płuc (przewlekła obturacyjna choroba płuc)
- wadami serca

- chorobami nerek: wielotorbielowatość, wady anatomiczne, utrudniony przepływ krwi, stany po przeszczepieniu nerki
- nowotworami: wątroby, nerek
- mięśniakami macicy
- zaburzeniami endokrynologicznymi: gruczolaki wytwarzające w nadmiarze aldosteron, zespół Schwartz-Barttera

Nadkrwistość rzekoma jest zwykle stanem przemijającym, związanym z zaburzeniami regulacji objętości osocza wynikającymi z niedostatecznego uzupełniania traconych przez organizm płynów. Nadkrwistość rzekoma może pojawić się w następstwie: utraty płynów (wymioty, przedłużające się biegunki), wymuszonej diurezy w wyniku stosowania środków moczopędnych, przy zmniejszonym poborze płynów, w następstwie nadużywania alkoholu i w wyniku nadmiernej utraty białka (enteropatie, rozległe oparzenia).

4.3. Zaburzenia układu granulocytowego

4.3.1. *Przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne* (*chronic myeloproliferative neoplasms, MPN*)

4.3.1.1. Przewlekła białaczka szpikowa (CML)

Przewlekła białaczka szpikowa (*chronica myelosis leucaemia* – CML) jest chorobą nowotworową powstającą w wyniku klonalnego rozrostu zmienionej, wielopotencjalnej komórki macierzystej szpiku. Ten typ białaczki wiąże się z występowaniem chromosomu Philadelphia (Ph). Defekt molekularny polega na translokacji fragmentów chromosomów t(9;22) (q34;q11) powodującej powstanie genu fuzyjnego bcr-abl. Fragment bcr znajdujący się na chromosomie 22 w rejonie q11 zostaje połączony z genem abl znajdującym się na chromosomie 9 w rejonie q34. Powstający gen fuzyjny bcr/abl koduje białko o masie cząsteczkowej około 210 kD wykazujące aktywność kinazy tyrozynowej, co prowadzi do wzmożonej proliferacji nowotworowej komórki macierzystej. W wyniku tego procesu dochodzi również do zahamowania procesu apoptozy oraz do zaburzenia funkcji integryn, co z kolei upośledza adhezję komórek białaczkowych do podścieliska szpiku. Dodatkowo blokuje on naprawę DNA, co powoduje szybkie gromadzenie się mutacji w kolejnych pokoleniach komórek. Wszystko to prowadzi do wzrostu masy nowotworu, a w konsekwencji do kryzy blastycznej. Przewlekła białaczka szpikowa przebiega zwykle w trzech fazach. Czas trwania fazy przewlekłej jest zmienny (3-6 lat), faza ta charakteryzuje się akumulacją dojrzewających komórek układu białokrwinkowego. Zmodyfikowane kryteria pozostałych faz przewlekłej białaczki szpikowej wg WHO przedstawiono w tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Zmodyfikowane kryteria fazy akceleracji i kryzy blastycznej przewlekłej białaczki szpikowej

Faza akceleracji	Faza kryzy blastycznej
Blasty we krwi obwodowej lub szpiku 10-19%	Odsetek blastów we krwi obwodowej lub szpiku $\geq 20\%$
Bazofilia $\geq 20\%$	Pozaszpikowe nacieczenia białaczkowe
Małopłytkowość < 100 G/L nie związana z leczeniem	
Nadpłytkowość > 1000 G/L	
Klonalna ewolucja cytogenetyczna (dodatkowe aberracje chromosomalne)	
Powiększenie śledziony lub wzrost leukocytozy oporny na terapię	
Obecność co najmniej jednego z wymienionych objawów jest konieczna do rozpoznania fazy akceleracji	Obecność co najmniej jednego z wymienionych objawów jest konieczna do rozpoznania fazy kryzy blastycznej

4.3.1.2. Zmiany morfologiczne w przewlekłej białacze szpikowej

W morfologii krwi obwodowej obserwuje się znaczną leukocytozę, nadpłytkowość, eozynofilię i bazofilię. W momencie rozpoznania stężenie hemoglobiny jest zwykle prawidłowe, w późniejszym okresie występują objawy niedokrwistości normochromicznej, normocytowej (zmniejszenie stężenia hemoglobiny, hematokrytu i liczby krwinek czerwonych). W rozmazie krwi obwodowej występuje proliferacyjne przesunięcie w lewo. We krwi obwodowej pojawiają się komórki linii granulocytowej na wszystkich etapach rozwoju. Badanie cytologiczne wykazuje, że szpik jest bogatokomórkowy, ze zwiększeniem odsetka komórek układu granulocytowego, przy czym odmłodzenie w szpiku jest jeszcze większe niż we krwi obwodowej. Zmniejsza się ilość komórek pozostałych układów. Stwierdza się wzrost stosunku mielopoety (M) do erytropoety (E). W przewlekłej białacze szpikowej stosunek M:E wynosi 25:1. Szybkość opadania krwinek czerwonych w przewlekłej białacze szpikowej rośnie.

4.3.1.3. Inne badania stosowane w diagnostyce przewlekłej białaczki szpikowej

W przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej obserwuje się wzrost stężenia kwasu moczowego i witaminy B₁₂ w surowicy oraz wzrost aktywności LDH.

Aktywność fosfatazy alkalicznej granulocytów (FAG) spada do 0 lub jest bardzo niska (0-30 *score*).

Badania cytogenetyczne szpiku kostnego metodą klasyczną i/lub FISH oraz badania molekularne krwi (chromosom Ph, rearanżacja bcr/abl) mają znaczenie diagnostyczne oraz służą do oceny i obserwacji postępów leczenia choroby resztkowej.

4.3.2. Czerwienica prawdziwa (PRV)

Czerwienica prawdziwa (*polycythaemia rubra vera* – PRV) należy do przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych i charakteryzuje się zwiększeniem produkcji erytrocytów, leukocytów i płytek krwi. Przyczyną tej choroby jest proliferacja zmutowanego klonu komórkowego wywodzącego się z wielopotencjalnej komórki macierzystej szpiku kostnego. Rozwijające się z patologicznego klonu prekursorzy krwinek czerwonych są nieprawidłowe i wykazują nadmierną wrażliwość na erytropoetynę. O klonalnym charakterze tego zaburzenia świadczy występowanie tylko jednego izoenzymu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G-6-PD) w krwinkach czerwonych (także granulocytach i płytkach krwi). Badania ostatnich lat wykazały, że dużą rolę w rozwoju przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych odgrywa aktywacja kinaz tyrozynowych, co z kolei powoduje zwiększenie przewodzenia sygnału przez kinazy Janus2 i aktywatory transmisji sygnału JAK-STAT, a zwłaszcza *JAK2*. Ten ostatni jest cytoplazmatyczną kinazą tyrozynową, która odgrywa rolę w nasilonym przewodzeniu sygnałów przez receptory erytropoetyny, trombopoetyny oraz G-CSF i GM-CSF. Mutacja *JAK2* występuje u prawie wszystkich chorych na czerwienicę prawdziwą.

Wśród objawów klinicznych czerwienicy można wymienić: objawy niecharakterystyczne (ból głowy, szum w uszach, zawroty głowy), świąd skóry zwłaszcza przy kontakcie z ciepłą wodą, zaczerwienienie twarzy, erytromelalgie, skazę krwotoczną, powiększenie śledziony, zakrzepy i zatory tętnicze lub żyłne (występują u około 1/3 pacjentów).

Kryteria rozpoznania czerwienicy prawdziwej wg WHO, zrewidowane w 2008 roku zostały przedstawione w tabeli 4.8.

Dla rozpoznania czerwienicy prawdziwej konieczne jest spełnienie: obu kryteriów głównych i jednego kryterium mniejszego lub pierwszego kryterium głównego i dwóch kryteriów mniejszych.

Tabela 4. 8. Kryteria rozpoznania czerwienicy prawdziwej wg WHO (2008)

Kryteria główne	Kryteria mniejsze
<ul style="list-style-type: none"> • HGB >18,5 g/dL (mężczyźni) HGB >16,5 g/dL (kobiety) • lub HGB albo HCT >99 percentyla wartości dla określonego wieku, płci lub wysokości przebywania nad poziomem morza • lub HGB >17 g/dL (mężczyźni), >15 g/dL (kobiety), jeśli jednocześnie stwierdza się przyrost HGB ≥ 2 g/dL w porównaniu z wartością wyjściową niepowiązaną z leczeniem stanu niedoboru żelaza • lub wzrost masy krwinek czerwonych >25% ponad przewidzianą średnią wartość normalną 	Bogatokomórkowy szpik w odniesieniu do linii erytroidalnej, granulocytowej i megakariocytowej (<i>panmyelosis</i>)
Obecność mutacja V617F genu <i>JAK2</i> lub innych funkcjonalnie podobnych mutacji	Spadek stężenia erytropoetyny w surowicy poniżej wartości referencyjnych
	Samoistny wzrost kolonii erytroidalnych przez komórki prekursorowe linii erytropoetycznej <i>in vitro</i>

W morfologii krwi obwodowej stwierdza się znaczne zwiększenie stężenia hemoglobiny, hematokrytu i liczby krwinek białych (głównie granulocytów obojętnochłonnych i często też zasadochłonnych) oraz płytek krwi. Zwiększa się również całkowita masa i objętość krwinek czerwonych, co można wykazać w badaniu izotopowym. W przypadku zwiększenia masy erytrocytów >25% średnich wartości prawidłowych można rozpoznać czerwienicę. W rozmazie krwi obwodowej stwierdza się dyskretną anizocytozę erytrocytów, a w układzie krwinek białych przesunięcie w lewo (do metamielocytów i mielocytów w 75% przypadków).

W badaniu cytologicznym szpiku kostnego stwierdza się szpik bogatokomórkowy o zwiększonej komórkowości w obrębie wszystkich trzech linii komórkowych: erytroidalnej, granulocytowej i megakariocytowej, z obecnością nieprawidłowych megakariocytów.

Badania genetyczne: obecność mutacji V617F genu *JAK2*. Zaburzenie to występuje u 95% pacjentów z czerwienicą prawdziwą.

Zmiany w niektórych badaniach laboratoryjnych w czerwienicy prawdziwej oraz różnicowanie czerwienicy prawdziwej, nadkrwistości wtórnej i rzekomej przedstawia tabela 4.9.

Tabela 4.9. Diagnostyka różnicowa czerwienicy prawdziwej, nadkrwistości wtórnej i rzekomej

Parametr	Czerwieńca prawdziwa	Nadkrwistość wtórna	Nadkrwistość rzekoma
Etiologia	klonalność	niedotlenienie, nowotwory	zaburzenie regulacji objętości osocza
Powiększenie śledziony	80% pacjentów	N	N
HGB, HTC, masa krążących erytrocytów	↑↑↑	↑	N
WBC	↑ przesunięcie w lewo	N	N
PLT	↑	N	N
Mielogram	rozrost trzech linii	rozrost linii erytroidalnej	N
Saturacja O ₂	N	N lub ↓	N
Stężenie erytropoetyny w surowicy	↓ lub N	↑ lub N	N
Stężenie witaminy B ₁₂ w surowicy	↑	N	N
Fosfataza alkaliczna granulocytów FAG	↑	N	N
Stężenie kwasu moczowego w surowicy	↑	N	N
Samoistny wzrost kolonii erytroidalnych	+	–	–
Gen <i>JAK2</i>	Mutacja V617F	nieobecna	nieobecna

4.3.3. Białaczki ostre

Białaczki ostre są nowotworowymi chorobami układu krwiotwórczego wywodzącymi się z komórek prekursorowych, które uległy nieprawidłowej transformacji. Białaczki ostre cechują się między innymi: niekontrolowanym (nowotworowym) rozrostem klonu komórek białaczkowych, wyparciem prawidłowego szpiku przez komórki białaczkowe, naciekaniem przez komórki białaczkowe różnych narządów oraz obecnością komórek białaczkowych we krwi. Komórki klonu nowotworowego nie dojrzewają i cechują się dużą złośliwością. Zasadniczo wyróżnia się dwa typy ostrych białaczek: ostre białaczki szpikowe i limfoblastyczne. W obrębie każdej grupy wyróżnia się typy i podtypy w zależności od różnic w badaniach cytochemicznych, immunologicznych i cytogenetycznych.

4.3.3.1. Ostra białaczka szpikowa (AML)

W ostrej białaczce szpikowej (*Myelosis leucaemia acuta* – AML) obrazie krwi obwodowej dominującym zjawiskiem jest leukocytoza, w niektórych przypadkach występuje prawidłowa liczba krwinek białych lub leukopenia, która może być wczesnym objawem choroby. Stwierdza się niedokrwistość normocytową, normochromiczną i małopłytkowość. W rozmazie krwi obwodowej przeważają komórki blastyczne (mieloblasty), w bardzo niewielkiej liczbie mogą występować także inne nieprawidłowe komórki, takie jak: promielocyty, mielocyty, neutrofile pozbawione ziarnistości, dojrzałe komórki układu białokrwinkowego są nieliczne.

Tabela 4.10. Klasyfikacja wg FAB ostrej białaczki szpikowej oraz zmiany w badaniach cytochemicznych

Typ ostrej białaczki		Pero- ksydaza, lipidy	Pałecz- ki Auer	Glikogen PAS	Esteraza chloroocetanowa lub inna	
					blasty z aktywnością 3° i 4°	hamowa- nie przez NaF
M1	mieloblastyczna bez cech dojrzewania	+	+	–	<25%	–
M2	mieloblastyczna z cechami dojrzewania	+++	–	–	<25%	–
M3	promielocytowa	+++	+	–	<25%	–
M4	mielomono- cytowa	++	+	–	25-50%	+
M5	monocyto- towa	–	–	–	>50%	+
M6	ostra erytroleukemia	+	+	+	<25%	–
M7	megakariocy- towa	–	–	–	–	–

Badanie cytologiczne szpiku kostnego oraz różnice w badaniach cytochemicznych pozwalają na rozpoznanie oraz zakwalifikowanie do danego podtypu ostrej białaczki szpikowej, zgodnie z klasyfikacją morfologiczną FAB (francusko-amerykańsko-brytyjska grupa robocza) (tabela 4.10). Przy czym, zaleca się stosowanie w nazewnictwie pełnych nazw poszczególnych podtypów, zamiast oznaczeń literowych. W ostrej białaczce szpikowej szpik kostny jest zwykle bogatokomórkowy. Około 30% komórek jądrzastych stanowią białaczkowe mieloblasty. Mieloblasty w ostrej białaczce są duże, jądro komórkowe ma zwykle dość luźną strukturę. W jądrze widoczne są jąderka, a cytoplazma jest obfita i ma szarobłękitne zabarwienie, bez jasnej wąskiej strefy

przejaśnienia wokół jądra. W cytoplazmie części mieloblastów mogą pojawić się ziarnistości azurochłonne, które mają tendencję do zlewania i tworzenia zabarwionych na fioletowo-czerwono pałeczek Auera. Różnice w badaniach morfologicznych, cytochemicznych i immunologicznych pozwalające na odróżnienie mieloblastów (ostra białaczka szpikowa) i limfoblastów (ostra białaczka limfoblastyczna) zostały przedstawione w tabeli 4.11.

Tabela 4.11. Różnice między mieloblastami i limfoblastami występującymi w ostrych białaczkach

Parametr	Mieloblast	Limfoblast
Liczba jąderek	2-5	1-2
Ilość cytoplazmy	umiarkowana	skąpa
Pałeczki Auera	czasami obecne	brak
Obecność lipidów wykrywanych Sudanem czarnym	reakcja dodatnia	reakcja ujemna
Peroksydaza (POX)	reakcja dodatnia	reakcja ujemna
Obecność glikogenu wykrywanego kwasem nadjodowym Schiffa (PAS)	reakcja ujemna	reakcja silnie dodatnia
Esteraza chloroocetanowa	reakcja dodatnia	reakcja ujemna
Markery immunologiczne	markery linii mieloidalnej (np. CD13, CD15, CD33, CD65)	markery linii T-komórkowej (np. CD2, CD4, CD7, CD8) lub linii B-komórkowej (np. CD19, CD20)

Ostrą białaczkę szpikową rozpoznaje się, gdy liczba blastów w szpiku $\geq 20\%$. Niezależnie od dużej liczby blastów w szpiku, ten typ białaczki można rozpoznać w przypadku występowania następujących zmian cytogenetycznych: t(15;17), inv(16), t(8;21).

4.3.3.2. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)

W obrazie krwi obwodowej w ostrej białaczce limfoblastycznej (*Leucaemia lymphoblastica acuta* – ALL) również zjawiskiem dominującym jest leukocytoza, która w niektórych podtypach może bardzo szybko narastać. Leukopenia może być wczesnym objawem choroby. Stwierdza się niedokrwistość, małopłytkowość, w niektórych podtypach eozynofilię. W rozmazie krwi obwodowej przeważają limfoblasty, brak jest form pośrednich (bardziej dojrzałych postaci). Zjawisko to związane z brakiem pośrednich postaci układu białokrwinkowego określane jest jako przerwa białaczkowa (*hiatus leucaemicus*) czyli w ostrej białaczce limfoblastycznej przerwa białaczkowa jest całkowita. Właściwości limfoblastów zostały opisane w tabeli 4.11.

W badaniu cytologicznym szpiku kostnego stwierdza się obfite nacieczenie szpiku limfoblastami i limfocytami. Ostłą białaczkę limfoblastyczną rozpoznaje się, gdy liczba blastów w szpiku $\geq 20\%$ przy równoczesnej regresji pozostałych linii komórkowych. Znaczenie mają badania immunofenotypowe, konieczne jest stwierdzenie co najmniej dwóch markerów linii limfocytów B lub T.

4.3.3.3. Klasyfikacja ostrych białaczek

Klasyfikacji białaczek dokonano w oparciu o badania cytogenetyczne. Są one niezbędne w celu podjęcia celowanego leczenia, jego monitorowania, a także w celu określenia rokowania. Klasyfikacja zawiera nazwy poszczególnych postaci białaczek z nazwą odpowiadającą zmianie cytogenetycznej. Obecnie obowiązującą klasyfikacją ostrych białaczek jest klasyfikacja WHO (WHO Classification of Tumors of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues, International Agency for Research on Cancer; Lyon; 2008).

4.4. Nowotworowy rozrost układu limfatycznego

4.4.1. Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (B-CLL)

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (*chronic lymphocytic leucaemia* – B-CLL) charakteryzuje się nagromadzeniem się limfocytów we krwi obwodowej, szpiku kostnym i w narządach limfatycznych. Limfocyty reprezentowane w tym typie białaczki charakteryzują się ekspresją na powierzchni komórki antygenów powierzchniowych typowych dla linii B: CD19, CD20, CD23 oraz koekspresją antygeny CD5. Stwierdza się również obniżoną ekspresję immunoglobulin powierzchniowych.

Podstawową cechą obserwowaną w morfologii krwi obwodowej w przypadku przewlekłej białaczki limfocytowej jest wzrost liczby limfocytów, która zwykle przekracza 15 G/L. W rozmazie krwi obwodowej również dominu-

ją limfocyty. Większość z nich, to dojrzałe, małe limfocyty ze skąpą cytoplazmą i silnie wybarwionym jądrem. Obecne są również cienie komórkowe, które powstają w wyniku zniszczenia i rozgniatań podatnych na uszkodzenia mechaniczne limfocytów w trakcie wykonywania rozmazu. W późniejszym okresie pojawia się niedokrwistość i trombocytopenia.

Obraz szpiku kostnego jest monomorficzny i stopniowo upodabnia się do obrazu krwi obwodowej. Liczba limfocytów początkowo wynosi ok. 40% wszystkich komórek jądrzastych szpiku. Stopniowo zmniejsza się liczba erytroblastów i megakariocytów, są one wypierane przez rozrastający się klon białaczkowych limfocytów tak, że ostatecznie limfocyty mogą stanowić 90-95% wszystkich komórek szpiku kostnego.

Objawy kliniczne i zmiany w badaniach laboratoryjnych występujące w przewlekłej białaczce limfocytowej są spowodowane nie tylko przez naciekanie szpiku kostnego i różnych narządów przez komórki nowotworowe, ale również są spowodowane zaburzeniami odporności i to zarówno komórkowej jak i humoralnej. Jedną z najczęstszych przyczyn zgonu pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową są ciężkie, nawracające infekcje bakteryjne i wirusowe. Białaczkowe limfocyty charakteryzują się pewną „ułomnością” immunologiczną. Defekt ten polega na tym, że limfocyty cechują się niedojrzałością, brakiem powierzchniowych immunoglobulin klasy G oraz brakiem lub zmniejszeniem liczby powierzchniowych receptorów dla fragmentu Fc i dla dopełniacza. W większości przypadków następuje zmniejszenie liczby i upośledzenie czynności limfocytów T pomocniczych, które są odpowiedzialne za pobudzenie syntezy immunoglobulin przez komórki B, jest to jedna z przyczyn hipogammaglobulinemii. Jednym z powikłań towarzyszących przewlekłej białaczce limfocytowej są powikłania autoimmunologiczne, najczęściej niedokrwistość autoimmunohemolityczna z przeciwciałami typu ciepłego w klasie IgG. U pacjentów stwierdza się dodatni pośredni test antyglobulinowy, podwyższone stężenie bilirubiny w surowicy krwi, a w badaniach morfologicznych nasiloną retikulocytozę.

Kryteria rozpoznania przewlekłej białaczki limfocytowej:

- limfocytoza krwi obwodowej ≥ 5 G/L
- limfocyty morfologicznie są dojrzałe, a prolimfocyty i komórki limfoplazmoidalne stanowią $< 55\%$
- limfocyty w biopsji aspiracyjnej szpiku stanowią $> 30\%$ komórek
- monoklonalna ekspresja łańcuchów lekkich immunoglobulin na powierzchni komórek
- charakterystyczny dla linii B immunofenotyp: CD19, CD20, koekspresja CD5.

Dla rozpoznania przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej konieczne jest spełnienie wszystkich kryteriów.

4.4.2. Szpiczak plazmocytowy (*Plasmocytoma*)

W tym rozdziale zostaną przedstawione zmiany morfologiczne we krwi obwodowej i szpiku kostnym pojawiające się u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym oraz kryteria rozpoznania. Zaburzenia biochemiczne oraz diagnostyka laboratoryjna zostały omówione szczegółowo w rozdziale „Białka osocza” (tom II rozdz. 2).

W morfologii krwi obwodowej pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym stwierdza się niedokrwistość normocytową i normochromiczną. W późniejszych stadiach choroby może wystąpić leukopenia i małopłytkowość. W nielicznych przypadkach stwierdza się obecność plazmocytów we krwi obwodowej. Obecność białka monoklonalnego może powodować wzmożone zasadochłonne wybarwienie tła pomiędzy krwinkami czerwonymi. W rozmazie krwi obwodowej obserwuje się tendencję erytrocytów do rulonizacji. Zasadnicze znaczenie dla rozpoznania szpiczaka plazmocyтового ma badanie cytologiczne szpiku kostnego. W szpiku stwierdza się zwiększony odsetek komórek plazmatycznych, przy czym plazmocyty mogą wykazywać anomalie i znaczny polimorfizm. Mogą występować plazmocyty atypowe, dwujądrzaste, wielojądrzaste, płomieniowate, z niedojrzałym jądrem komórkowym, aż wreszcie plazmocyty mogą tworzyć skupiska (wyspy plazmocytowe). Ze względu na to, że choroba może mieć wielogniskowy charakter, w niektórych przypadkach odsetek plazmocytów w szpiku jest mniejszy lub nie ma ich wcale. W takich przypadkach, przy podejrzeniu szpiczaka plazmocyowego zaleca się wykonanie biopsji aspiracyjnej w kilku miejscach.

Kryteria rozpoznania szpiczaka plazmocyowego pełnoobjawowego wg WHO 2008:

- obecność białka monoklonalnego w surowicy i (lub) moczu (brak minimalnych wartości stężenia)*
- klonalna populacja plazmocytów w szpiku (brak odsetka minimalnego)[#]
- uszkodzenie narządów lub tkanek zależne od szpiczaka (uszkodzenie narządów krytycznych).

* u większości pacjentów stężenie białka monoklonalnego wynosi:

>1 g/24 h łańcuchów lekkich w moczu oraz:

>30 g/L w przypadku szpiczaka IgG,

>25 g/L w przypadku szpiczaka IgA.

W niektórych przypadkach pacjenci z pełnoobjawowym szpiczakiem mogą mieć stężenie białka monoklonalnego poniżej podanych wartości.

[#] plazmocyty w szpiku stanowią zazwyczaj więcej niż 10% wszystkich komórek jądrzastych. W kryteriach rozpoznania brak odsetka minimalnego, ponieważ u około 5% pacjentów ze szpiczakiem pełnoobjawowym odsetek plazmocytów wynosi <10%.

Uszkodzenie narządów lub tkanek spowodowane szpiczakiem (narządy krytyczne) (CRAB):

- zwiększone stężenie wapnia (C): powyżej górnej granicy stężenia prawidłowego lub skorygowanego stężenia wapnia w surowicy $>2,75$ mmol/L (11,0 mg/dL)
- niewydolność nerek (R): stężenie kreatyniny w surowicy $>173,0$ μ mol/L (2,0 mg/dL)
- niedokrwistość (A): HGB $<10,0$ g/dL lub spadek o co najmniej 2,0 g/dL poniżej wartości referencyjnych dla danego laboratorium
- uszkodzenia kostne (B): ogniska osteolityczne lub osteoporoza ze złamaniami patologicznymi rozpoznawanymi metodą konwencjonalnej radiologii
- inne: objawy nadmiernej lepkości surowicy, amyloidoza, nawracające infekcje bakteryjne.

4.5. Wybrane przypadki kliniczne

Przypadek 4.1

35-letnia kobieta w 24 tygodniu ciąży zgłosiła się do lekarza rodzinnego z powodu narastającego od kilku tygodni osłabienia. Kobieta jest matką dwójki zdrowych dzieci. W trzeciej ciąży nie odbyła do tej pory wizyty u ginekologa, nie przyjmuje żadnych witamin, nie pali, nie pije alkoholu. Ostatnio stwierdziła u siebie apetyt na napoje z lodem. W badaniu fizykalnym stwierdzono: błądź spojówek, prążkowanie paznokci, szmer skurczowy w okolicy dolnej, lewej części mostka.

W badaniu morfologii krwi stwierdzono:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
HGB	7,1	g/dL	12,0-16,0
HCT	23	%	37-47
RBC	3,5	T/L	4,3-5,3
MCV	74	fL	80-100
MCH	23	pg	27-32
RETC	10,0	G/L	20-100
PLT	450,0	G/L	130-400
RDW	17,1	%	11,6-14,0

Dodatkowo stwierdzono brak zmian charakterystycznych w rozmazie krwi obwodowej. Nie stwierdzono krwi utajonej w kale.

Diagnoza: niedokrwistość z niedoboru żelaza.

Komentarz: obniżone stężenie hemoglobiny, hematokrytu oraz spadek liczby krwinek czerwonych świadczą o niedokrwistości. Zmniejszone wskaźniki

czerwonokrwinkowe wskazują na niedokrwistość mikrocytową, hipochromiczną. Typowe odchylenia w badaniu fizykalnym wskazują na niedokrwistość z niedoboru żelaza. Aby potwierdzić, że rzeczywiście mamy do czynienia z tym typem niedokrwistości należałoby zlecić oznaczenie stężenia żelaza oraz ferrytyny w surowicy krwi i stężenie tych parametrów byłoby obniżone. Brak krwi utajonej w kale wyklucza jedną z przyczyn niedokrwistości z niedoboru żelaza tj. krwawienie z przewodu pokarmowego. W okresie ciąży, a w przypadku tej pacjentki jest to trzecia ciąża zapotrzebowanie na żelazo wzrasta. Kobieta ciężarna potrzebuje o 2-3 mg żelaza na dobę więcej niż normalna dzienna podaż. Wzrost płodu powoduje dalsze zwiększone zapotrzebowanie na żelazo. Część tego pierwiastka tracona jest w łożysku, a część w czasie krwawienia okołoporodowego.

Przypadek 4.2

72-letnia kobieta zgłosiła się do lekarza z powodu duszności, objawów niedotlenienia mięśnia sercowego, zaburzeń psychicznych (splątanie) i utraty pamięci. Jej stan wyraźnie pogorszył się w okresie ostatnich sześciu miesięcy. W badaniu fizykalnym stwierdzono: żółtaczkę niewielkiego stopnia, cytrynowożółty odcień skóry, cechy stanu zapalnego języka. Głębokie odruchy ścięgniste w stawach skokowym i kolanowym były zniesione. Stwierdzono zaburzenia chodzenia. Ciśnienie krwi wynosiło: 140/85. Elektrokardiogram potwierdzał cechy niedotlenienia mięśnia sercowego.

W badaniu morfologii krwi stwierdzono:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
WBC	3,4	G/L	4,5-11,0
HGB	6,0	g/dL	12,0-16,0
HTC	21	%	37-47
RBC	2,6	T/L	4,3-5,3
MCV	120	fL	80-100
MCH	34	pg	27-32
PLT	120	G/L	130-400
RETC	5	G/L	20-100
RDW	19	%	11,6-14,0

Brak zmian charakterystycznych w rozmazie krwi obwodowej. Szybkość opadania krwinek czerwonych wynosiła 30 mm/godz, bilirubina całkowita 2 mg/dL.

Diagnoza: niedokrwistość makrocytowa.

Komentarz: pogarszający się stan psychiczny, rozdrażnienie sugerują depresję. Pogarszająca się pamięć może być objawem typowym dla wieku pacjentki, ale należałoby rozważyć występowanie choroby Alzheimera. Założenie gałek ocznych wskazuje na żółtaczkę. Jej przyczyną może być rak

trzustki, hemoliza albo zapalenie wątroby. Odchylenia w badaniach hematologicznych wskazują na niedokrwistość, makrocytową, hiperchromiczną. Retykulocytoza jest niska, stwierdzono zmniejszoną liczbę płytek krwi. Zlecono dodatkowe badania biochemiczne. Stwierdzono obniżony poziom witaminy B₁₂ w surowicy krwi. Badanie cytologiczne szpiku kostnego potwierdziło diagnozę. W szpiku kostnym stwierdzono tor odnowy megaloblastycznej. Dla szczegółowego ustalenia przyczyny niedokrwistości makrocytovej u pacjentki zlecono oznaczenie w surowicy miana przeciwciał przeciwko komórkom okładzinowym trzonu i dna żołądka i było ono podwyższone, co potwierdza występowanie choroby Addisona-Biermera.

Przypadek 4.3

30-letni mężczyzna zgłosił się do lekarza z powodu silnych bólów brzucha trwających z przerwami od tygodnia. Pacjent odczuwał objawy zmęczenia od trzech tygodni oraz stwierdzono zażółcenie twardówek i ciemnożółty moczu. Do tej pory nie chorował i nie przyjmował żadnych leków. W badaniu fizykalnym stwierdzono powiększenie śledziony.

W badaniu morfologii krwi stwierdzono:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
WBC	11,9	G/L	4,5-11,0
HGB	10,5	g/dL	13,0-18,0
HTC	35	%	42-52
RBC	2,8	T/L	4,5-6,5
MCV	103	fL	80-100
MCH	30	pg	27-32
MCHC	34	g/dL	32,5-37,5
PLT	180	G/L	130-400
RETC	130	G/L	20-100

W rozmazie krwi obwodowej stwierdzono: niedokrwistość, sferocytozę, zwiększoną ilość erytroblastów oraz zwiększenie odsetka retykulocytów.

Badania biochemiczne wykazały:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
Bilirubina całkowita	4,1	g/dL	0,3-1,2
LDH	650	jm/L	230-450
D-dimery	120	µg/mL	<500
Pośredni test antyglobulinowy PTA	ujemny	–	–

W badaniu moczu testem paskowym stwierdzono hemoglobinurię.

Diagnoza: niedokrwistość hemolityczna.

Komentarz: zmiany w morfologii krwi obwodowej sugerują niedokrwistość normochromiczną z niewielkiego stopnia makrocytozą. Rozmaz krwi obwodowej potwierdza, że makrocytoza jest spowodowana obecnością sferocytów. Żółte zabarwienie gałek ocznych, zwiększone stężenie bilirubiny i LDH w surowicy potwierdzają żółtaczkę, spowodowaną nadmiernym niszczeniem krwinek czerwonych w makrofagach układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby i śledziony. Stężenie D-dimerów w zakresie wartości referencyjnych pozwala na wykluczenie wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC). Dla dokładnego ustalenia przyczyny skróconego czasu przeżycia krwinek czerwonych wykonano test lizy erytrocytów w zakwaszonym glicerolu (AGLT) (test przesiewowy) oraz zbadano oporność osmotyczną erytrocytów, które potwierdziły występowanie u pacjenta wrodzonej sferocytozy.

Przypadek 4.4

27-letnia pacjentka została przyjęta do szpitala w trybie pilnym z powodu gorączki (40°C) oraz dreszczy. Pierwsze objawy wystąpiły 48 godzin wcześniej. Oprócz zmian zapalnych i nadżerek na powierzchni migdałków podniebiennych w badaniu fizykalnym nie stwierdzono innych odchyłeń (nie były między innymi powiększone wątroba, śledziona i obwodowe węzły chłonne).

Badanie morfologii krwi obwodowej wykazało:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
WBC	1,0	G/L	4,5-11,0
HGB	11,8	g/dL	12,0-16,0
HCT	35	%	37-47
RBC	3,9	T/L	4,3-5,3
MCV	85	fL	80-100
MCH	29	pg	27-32
MCHC	35	g/dL	32,5-37,5
PLT	140	G/L	130-400

W rozmazie krwi obwodowej stwierdzono: segmenty 1%, limfocyty 95%, monocyty 4%.

Diagnoza: leukopenia.

Komentarz: na podstawie obrazu klinicznego oraz wyniku morfologii krwi obwodowej konieczne było wykluczenie ewentualnej leukopenii i agranulocytozy polekowej. W wywiadzie znaleziono przyjmowanie od: 5 lat doustnych środków antykoncepcyjnych, około 5 miesięcy niesteroidowych leków p/zapalnych (Metamizol) z powodu bólów miesiączkowych, przyjęcie 4 dni wcześniej z powodu objawów grypowych i gorączki niesprecyzowanego leku p/gorączkowego. Niesterydowe leki p/zapalne są jednym z najczęstszych czynników powodujących hipoplazję układu granulocytarnego szpiku kostnego,

co powoduje, że we krwi obwodowej obserwujemy leukopenię, a w cięższych przypadkach agranulocytozę.

Przypadek 4.5

67-letnia kobieta została przyjęta do szpitala z powodu stwierdzonej w badaniu fizykalnym hepatosplenomegalii oraz nieprawidłowości w badaniu morfologii krwi obwodowej zleconym przez lekarza rodzinnego. Kobieta uskarżała się na łatwe męczenie się, nadmierną potliwość, utratę masy ciała oraz uczucie pełności w jamie brzusznej. Objawy trwały od sześciu miesięcy, ale znacznie nasiliły się w ostatnich trzech tygodniach.

W badaniu morfologii krwi obwodowej stwierdzono:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
WBC	35,0	G/L	4,5-11,0
HGB	10,4	g/dL	12,0-16,0
HCT	29	%	37-47
RBC	3,5	T/L	4,3-5,3
MCV	82	fL	80-100
MCH	29	pg	27-32
PLT	480	G/L	130-400

W rozmazie krwi obwodowej: obecne wszystkie formy szeregu granulocytarnego oraz znaczna bazofilia.

Diagnoza: przewlekła białaczka szpikowa.

Komentarz: w morfologii krwi obwodowej zaznaczona hiperleukocytoza, niedokrwistość normocytowa oraz nieznaczna nadpłytkowość. Rozmaz krwi obwodowej jest typowy dla przewlekłej białaczki szpikowej z powodu proliferacyjnego przesunięcia w lewo. Badanie szpiku kostnego potwierdza diagnozę. Szpik jest bogatokomórkowy, a stwierdzona ilość komórek blastycznych wynosi 18%. Barwienie preparatu szpiku w celu określenia aktywności fosfatazy alkalicznej granulocytów wykazuje zerową aktywność tego enzymu. Ostateczne rozpoznanie wymaga analizy kariotypu oraz metod molekularnych (bcr-abl).

Przypadek 4.6

61-letni mężczyzna zgłosił się do lekarza z powodu powtarzających się zawrotów głowy, szumu w uszach, świądu przy kontakcie z ciepłą wodą. Od kilku miesięcy obserwował u siebie zaczerwienienie skóry, głównie twarzy. W badaniu fizykalnym stwierdzono powiększenie śledziony, badanej 4 cm pod łukiem żebrowym.

W badaniu morfologii krwi obwodowej stwierdzono:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
WBC	15,5	G/L	4,5-11,0
HGB	23,0	g/dL	13,0-18,0
HCT	65	%	42-52
RBC	8,1	T/L	4,5-6,5
PLT	650	G/L	130-400

W rozmazie krwi obwodowej: metamielocyty 5%, pałki 7%, neutrocyty segmentowane 64%, bazofile 3%, monocyty 6%, limfocyty 15%.

Diagnoza: czerwienica prawdziwa.

Komentarz: wzrost ilości krwinek czerwonych, białych oraz płytek krwi stwierdzany w morfologii krwi obwodowej sugeruje zaburzenia szpiku kostnego, który w nadmiarze produkuje wszystkie trzy rodzaje elementów morfotycznych krwi. Zmiany w badaniu fizykalnym – powiększenie śledziony oraz zaburzenia zawarte w opisie przypadku sugerują czerwienicę prawdziwą, podobnie jak odchylenia w rozmazie krwi obwodowej, w którym stwierdza się niewielkie przesunięcie w lewo oraz wzrost liczby bazofili. W badaniu szpiku kostnego stwierdzono, że jest on bogatokomórkowy, a nadmierny rozrost dotyczy wszystkich trzech linii komórkowych. Aby potwierdzić diagnozę należałoby wykonać oznaczenie stężenia erytropoetyny w surowicy krwi oraz badania genetyczne w celu stwierdzenia odpowiedniej mutacji.

Przypadek 4.7

40-letni pacjent zgłosił się do lekarza z powodu postępującego ogólnego osłabienia i owrzodzeń gardła, które pojawiły się 3 tygodnie wcześniej. Stwierdził również u siebie wysypkę na nogach, silne krwawienia z dziąseł oraz utrzymującą się od kilku dni podwyższoną temperaturę 38°C. W badaniu fizykalnym stwierdzono błądność skóry i śluzówek oraz wybroczyny na nogach. Gardło było zaczerwienione, co wskazywało na możliwość infekcji. Węzły chłonne, wątroba i śledziona nie były powiększone. Nie było również zmian w badaniu rentgenowskim klatki piersiowej.

W badaniu morfologii krwi obwodowej stwierdzono:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
WBC	35,4	G/L	4,5-11,0
HGB	8,6	g/dL	13,0-18,0
HCT	32	%	42-52
RBC	3,0	T/L	4,5-6,5
MCV	87	fL	80-100
MCH	29	pg	27-32
RETC	35	G/L	20-100
PLT	10	G/L	130-400

W rozmazie krwi obwodowej stwierdzono: pałki 2%, neutrocyty segmentowane 15%, eozynofile 1%, limfocyty 72%, blasty 10%.

Diagnoza: ostra białaczka.

Komentarz: utrata energii, ogólne osłabienie, a w badaniu fizykalnym bladość skóry i śluzówek wskazują na niedokrwistość. Badanie morfologii krwi obwodowej wykazuje, że jest to niedokrwistość normocytowa i normochromiczna. Wybroczyny na nogach, krwawienia z dziąseł sugerują zaburzenia układu krzepnięcia, co potwierdza bardzo mała ilość płytek krwi stwierdzona w badaniu morfologii krwi obwodowej. Owrzodzenia gardła i podwyższona temperatura ciała sugerują infekcję. Z powodu zwiększonej liczby krwinek białych w badaniu morfologii krwi obwodowej wykonano rozmaz, w którym stwierdzono obecność komórek blastycznych. Dla potwierdzenia diagnozy konieczne było badanie szpiku kostnego, w którym stwierdzono 90% komórek blastycznych oraz supresję pozostałych linii komórkowych. Komórki linii erytroblastycznej stanowiły tylko 5%. W celu określenia typu białaczki ostrej i wdrożenia odpowiedniego leczenia konieczne jest wykonanie badań cytochemicznych, immunofenotypowych i cytogenetycznych.

Przypadek 4.8

79-letni mężczyzna został przyjęty do szpitala z powodu znacznej limfocytozy, uogólnionej limfadenopatii, splenomegalii, w stanie ogólnym dobrym. Mężczyzna uskarżał się z powodu ogólnego osłabienia, spadku energii. Pacjent nie pali papierosów i nie pije alkoholu.

Badania morfologii krwi obwodowej wykazały:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
WBC	96,0	G/L	4,5-11,0
HGB	11,5	g/dL	13,0-18,0
HCT	38	%	42-52
RBC	3,8	T/L	4,5-6,5
MCV	83	fL	80-100
PLT	237	G/L	130-400

W rozmazie krwi obwodowej stwierdzono: mieszaną populację dojrzałych, małych i średnich limfocytów z gruboziarnistą chromatyną, które stanowiły 95%, pojedyncze prolimfocyty oraz liczne cienie komórkowe.

Diagnoza: przewlekła białaczka limfocytowa.

Komentarz: niewielkiego stopnia niedokrwistość stwierdzana w badaniu morfologii krwi obwodowej jest przyczyną ogólnego osłabienia i spadku energii. Hiperleukocytoza ze znaczną limfocytozą oraz powiększenie węzłów chłonnych pozwalają na wstępne zdiagnozowanie przewlekłego zespołu limfoproliferacyjnego. Diagnozę potwierdza badanie szpiku kostnego, w którym wykazano, że

limfocyty stanowią 55% wszystkich komórek jądrzastych. Wykonana immunofenotypyzacja określa zespół jako: przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową CD5+, CD19+, CD20+, CD23+.

Przypadek 4.9

58-letni mężczyzna zgłosił się do lekarza rodzinnego z powodu trwającego od około 4 miesięcy bólu w okolicy żeber, w tylnej części pleców oraz ogólnego osłabienia. U pacjenta stwierdzono błąd skóry oraz pacjent zgłaszał utratę wagi. Pacjent przeszedł dwie infekcje dróg oddechowych w ciągu ostatnich kilku miesięcy. W chwili obecnej pacjent nie kaszlał krwią i nie był zachrypnięty. Temperatura ciała wynosiła 38°C, puls 120/min, ciśnienie krwi 120/60. Węzły chłonne i śledziona nie były powiększone. Stwierdzono niewielki tylne wygięcie kręgosłupa.

W morfologii krwi obwodowej stwierdzono:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
WBC	10,1	G/L	4,5-11,0
HGB	9,5	g/dL	13,0-18,0
HCT	32	%	42-52
MCV	90	fL	80-100
PLT	230	G/L	130-400

W rozmazie krwi obwodowej nie stwierdzono odchyleń: neutrocyty segmentowane 60%, eozynofile 1%, bazofile 1%, monocyty 8%, limfocyty 30%. Szybkość opadania krwinek czerwonych wynosiła: 108 mm/godz.

Badania biochemiczne wykazały:

Stężenie w surowicy	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
Żelazo	92	μg/dL	60-160
Kreatynina	2,33	mg/dL	0,3-1,22
Fibrynogen	3,0	g/L	1,8-3,5
Albumina	28	g/L	35-50
Białko całkowite	95	g/L	60-80
IgG	66	g/L	8-18
Wapń	3,36	mmol/L	2,12-2,62

Wykonano rozdział elektroforetyczny białek surowicy krwi. Stwierdzono obecność białka monoklonalnego we frakcji β-2 globulinowej.

Diagnoza: szpiczak mnogi.

Komentarz: błąd skóry i ogólne osłabienie świadczą o niedokrwistości, którą potwierdza badanie morfologii krwi obwodowej. Trzycyfrowe OB świadczy o nowotworowym charakterze schorzenia, podobnie jak utrata wagi i

bóle kostne. W badaniach biochemicznych stwierdzono zwiększone stężenie kreatyniny, wapnia i białka całkowitego oraz obniżone stężenie albuminy. Wzrost stężenia kreatyniny sugeruje uszkodzenie nerek, które może być spowodowane hiperkalcemią oraz obecnością w zwiększonym stężeniu białka monoklonalnego. Zaburzenia białkowe oraz stwierdzenie obecności białka monoklonalnego w proteinogramie surowicy krwi potwierdzają występowanie szpiczaka mnogiego. Dla potwierdzenia klasy przeciwciał tworzących białko monoklonalne należałoby wykonać immunofiksację surowicy krwi.

5. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ KRZEPNIĘCIA

Anna Raszeja-Specht

Istotą procesu krzepnięcia jest przekształcenie fibrynogenu, najważniejszego białka procesów krzepnięcia, w sieć fibryny. W warunkach fizjologicznych *in vivo* procesy hemostazy pierwotnej, krzepnięcia i fibrynolizy są ze sobą nierozzerwalnie połączone, a głównym aktywatorem krzepnięcia w ustroju jest czynnik tkankowy (TF), pochodzący z uszkodzonych tkanek lub związany z monocytami (patrz „Schemat kaskady krzepnięcia” – tom I, rozdział 9)

Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń układu krzepnięcia obejmuje diagnostykę wrodzonych i nabytych zaburzeń krwotocznych oraz zakrzepowozatorowych. Zasady postępowania stosowane w diagnostyce laboratoryjnej obejmują w pierwszej kolejności analizę wyników badań podstawowych i w zależności od obserwowanych zmian (np. wydłużenie tzw. „czasów krzepnięcia”) sugerują wybór dalszych badań laboratoryjnych. Odpowiednie algorytmy postępowania przedstawiono w tomie I oraz w poniższym rozdziale. Omówione poniżej przykłady zastosowania badań układu hemostazy w praktyce klinicznej pozwalają na wykorzystanie wiadomości teoretycznych, zawartych w rozdziale 9 tomu I.

5.1. Błąd przedlaboratoryjny

Materiałem stosowanym do badań koagulologicznych jest osocze. Dla uzyskania wiarygodnego wyniku istotny jest stosunek objętości krwi do objętości roztworu antykoagulantu, który powinien wynosić 9:1. Stosowany jest cytrynian trójsodowy, w stężeniu 3,8% lub 3,2%, który kompleksuje jony wapnia i posiada specyficzne właściwości stabilizujące labilne czynniki krzepnięcia (czynnik V i czynnik VIII). Ponadto osocze cytrynianowe jest bardziej czułe na efekty działania heparyny. Można również stosować mieszaninę antykoagulacyjną, zawierającą cytrynian, teofilinę, adenozyne i dipirydamol (CTAD), która stabilizuje płytki krwi i zalecana jest przede wszystkim w specjalistycznych badaniach układu krzepnięcia (np. do oceny aktywacji płytek i układu fibrynolizy). Badania układu krzepnięcia powinny być wykonane natychmiast po odwirowaniu próbki. Jeśli jest to niemożliwe, osocze może być przechowywane w temperaturze 4°C do dwóch godzin, lub zamrożone do temperatury poniżej -20°C przez okres kilku tygodni. Mrożenie musi być wykonywane z zachowaniem określonych procedur, opisanych szczegółowo w wytycznych opublikowanych przez grupy ekspertów w oparciu o wyniki badań naukowych.

Tabela 5.1. Zmiany parametrów hemostazy, związane z przygotowaniem pacjenta do badań laboratoryjnych oraz zalecenia ogólne

	Krzepnięcie	Fibrynoliza	Płytki
Aktywność fizyczna	Generacja trombiny, wzrost TAT, F1+2, fibrynopeptydu A, vWF i cz. VIII	Aktywacja: wzrost t-PA i PAP oraz D-dimerów	Aktywacja: zwiększona zdolność do agregacji, wzrost β TG i serotoniny
Stres	Obniżenie aktywności cz. V, cz. VIII i IX		
Zmienność dobową godziny poranne	Zwiększone aktywności cz. VII, VIII i białek C/S	Mniej aktywna fibrynoliza, wzrost PAI-1	Zwiększona zdolność do agregacji
Zmienność stężeń żeńskich hormonów płciowych	Ciąża – stan prozakrzepowy Różnice – faza folikularna /faza lutealna cyklu	Ciąża – wzrost D-D, osłabienie lizy (wzrost PAI-1)	Ciąża – obniżenie liczby płytek (z rozcieńczenia), wzrost MPV
Dieta	Zalecana: lekkostrawna, niskotłuszczowa		
Pozycja w czasie pobrania	Zalecana: siedząca		

gdzie: TAT – kompleks trombina-antytrombina, PAP – kompleks plazmina-antypłazmina, F1+2 – fragmenty protrombiny, tPA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu, β TG-betatrofoboglobulina, DD – D-dimery, MPV – średnia objętość płytki

Przypadek 5.1

Do laboratorium dostarczono krew pacjenta, pobraną do 5 różnych probówek, zawierających:

- cytrynian sodu, stężenie 3,2%, w proporcjach 9:1 (obj. krwi: cytrynianu)
- cytrynian sodu, stężenie 3,8%, w proporcjach 4:1 (obj. krwi: cytrynianu)
- wersenian potasu, EDTAK₂
- mieszaninę CTAD (cytrynian+teofilina+adenozyna+dipirydamol)
- bez antykoagulantu („na skrzep”)
- Które z powyższych probówek zawierają materiał (osocze), przydatny w badaniach układu krzepnięcia i dłaczego? Wyjaśnij mechanizm działania poszczególnych środków przeciwkrzepliwych.
- Jakie mogą być przyczyny błędów przedanalizycznych w badaniach zaburzeń hemostazy?

Komentarz: Do badań koagulologicznych należy pobierać krew żylną, najlepiej bez stazy i po 15-20 minutowym odpoczynku. Nieprawidłowe wyniki

badan bardzo często nie są spowodowane błędami analitycznymi, ale wynikają z zaniedbań przedanalizy – nieodpowiedniego przygotowania pacjenta do badania, sposobu pobrania krwi, uzyskania osocza i jego przechowywania (tabela 5.1).

5.2. Wrodzone skazy krwotoczne

Przypadek 5.2

5-letni chłopiec został przyjęty do Kliniki Chorób Dzieci z powodu silnego bólu podbrzusza po stronie prawej z napięciem mięśni brzusznych, gorączki (38,5°C), bez urazu z wywiadzie. Od wczesnego dzieciństwa występowały u niego siniaki po drobnych urazach i przed rokiem wylew do lewego stawu kolanowego. Wywiad rodzinny – ujemny ze strony matki, dziadek zmarł z powodu krwawienia do przewodu pokarmowego.

W badaniach laboratoryjnych stwierdzono:

Badania podstawowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	180	28-34	s
PT-INR	1,1	0,8-1,2	
Fibrynogen	3,5	1,8-3,5	g/L
PLT	250	130-400	G/L
Czas krwawienia	5	1-7	min

Na podstawie starannie zebranego wywiadu oraz badania przedmiotowego można wstępnie zdecydować, czy skaza krwotoczna wynika z zaburzeń naczyniowo-płytkowych czy osoczowych, co z kolei pozwoli na odpowiedni dobór badań laboratoryjnych. Zaburzenia płytkowo-naczyniowe charakteryzują krwawienia powierzchowne, krwawienia z dziąseł i nosa, a zaburzenia osoczowe – rozległe, opóźnione i przedłużone krwawienia domięśniowe i donarządowe (np. wylewy do mięśni i artropatie w hemofiliach). Diagnostyka laboratoryjna w przypadku pacjenta ze skłonnością do krwawień ma na celu zróżnicowanie zaburzeń naczyniowych, płytkowych i osoczowych przy użyciu prostych badań przesiewowych, a w przypadkach wątpliwych pozwala na dobór odpowiednich badań uzupełniających (tom. I, Schemat diagnostyki w przypadku podejrzenia skazy krwotocznej).

Komentarz: W opisanym przypadku pojawia się podejrzenie hemofilii (przedłużony APTT), stąd konieczność przeprowadzenia określonych testów potwierdzenia. Znaczne obniżenie aktywności prokoagulacyjnej czynnika VIII przy prawidłowej aktywności czynnika von Willebranda (vWF:RCo) wskazuje na hemofilię typu A.

U matki wykryto nosicielstwo genu hemofilii A (czynnik VIII – 30%).

Testy potwierdzenia	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT 1:1	41	<42	s
VIII	3	70-130	%
vWF R:Co	75	50-150	%

Diagnoza: Hemofilia A, postać umiarkowana.

Przypadek 5.3

15-letnia dziewczyna została skierowana na konsultację hematologiczno-koagulologiczną z powodu obfitych krwawień miesięczkowych. W wywiadzie podawała częste krwawienia w dzieciństwie, głównie z dziąseł i z nosa. Krwawienia śluzówkowe występowały również okresowo u młodszego brata. Wywiad rodzinny – ujemny ze strony matki i ojca, siostra ojca zmarła przy porodzie.

W badaniach laboratoryjnych stwierdzono:

Badania podstawowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	34	28-34	s
PT-INR	1,1	0,8-1,2	
Fibrynogen	2,9	1,8-3,5	g/L
PLT	240	130-400	G/L
Czas krwawienia	12	1-7	min

Do oceny hemostazy pierwotnej służy pomiar czasu krwawienia metodą standaryzowaną (Ivy), który obecnie stosowany jest coraz rzadziej i zastępowany badaniem funkcji płytek. Aktualnie wykonywane badania obejmują pomiar liczby płytek we krwi obwodowej (płytki jako składnik tzw. „morfologii krwi obwodowej”) oraz ocenę zdolności płytek do adhezji, agregacji, bezpośrednią i pośrednią ocenę reakcji uwalniania płytkowego, oznaczanie czynnika von Willebranda oraz badania glikoprotein płytkowych metodą cytometrii przepływową.

W diagnostyce istotne znaczenie ma mikroskopowa ocena rozmazu krwi obwodowej, która pomaga w ocenie wielkości i anizocytozy płytek, oraz pozwala na stwierdzenie obecności agregatów płytkowych i zjawiska tzw. satelityzmu płytkowego. Zestawienie wyników badań podstawowych i uzupełniających umożliwia rozpoznanie skaz płytkowych, różnicowanie skaz naczyniowo-płytkowych od skaz osoczowych oraz wykluczenie tzw. małopłytkowości rzekomej, spowodowanej aktywacją przeciwciał przeciw-płytkowych typu zimnego (anty-GPIIb/IIIa) w środowisku wersenianowym. Najczęstsze przyczyny małopłytkowości i nadpłytkowości zestawiono w rozdziale 9 tomu I.

Komentarz: Dane z wywiadu oraz przedłużenie czasu krwawienia nasuwają podejrzenie zaburzeń naczyniowo-płytkowych czyli obecność defektu hemostazy pierwotnej, stąd konieczność przeprowadzenia określonych testów potwierdzenia (patrz - tabela poniżej). Prawidłowa aktywność i stężenie czynnika von Willebranda (vWF:RCo, vWF:Ag) oraz czynnika VIII nie potwierdzają podejrzenia choroby von Willebranda, choć w pojedynczym badaniu nie stanowią również podstawy do jej wykluczenia.

Dlatego dodatkowo zlecono badania w kierunku zaburzeń funkcji płytek.

Testy potwierdzenia (1)	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
VIII	70	70-130	%
vWF RCo	75	50-150	%
vWF:Ag	90	50-150	%

Testy potwierdzenia (2)	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
Adhezja płytek	65	> 60	%
Agregacja płytek:			
• Kolagen	15	80-120	%
• Epinefryna	30	80-120	%
• ADP	25	80-120	%
• Rystocetyna	80	50-150	%
Czas okluzji:			
• Kol/Epi	180	85-165	s
• Kol/ADP	136	71-118	s

Badania laboratoryjne funkcji płytek pozwalają na pośrednią ocenę procesów przebiegających w warunkach *in vivo*, a więc pobudzenie płytek wskutek uszkodzenia ściany naczyń, ich zdolność do adhezji i agregacji oraz do uwalniania czynników zawartych w ziarnistościach płytkowych.

Badania funkcji płytek obejmują między innymi:

- automatyczną ocenę adhezji i agregacji płytek przy pomocy prostych analizatorów funkcji płytek – PFA-200 (tzw. czas okluzji), Impact-R, i inne,
- ocenę zdolności płytek do agregacji samoistnej lub po stymulacji agonistami – ADP, kolagenem, epinefryną, rystocetyną (często w dwóch stężeniach) i kwasem arachidonowym, co w w/w przypadku wyraźnie wskazuje na **defekt płytkowy**.

Diagnoza: Zaburzenia funkcji płytek (trombastenia Glanzmana?)
Wyjaśnienie może wymagać cytometrycznej oceny aktywności i reaktywności błonowych glikoprotein płytkowych z użyciem cytometru przepływowego, specyficznych przeciwciał monoklonalnych i odpowiednich agonistów płytkowych.

Różnicowanie: Choroba von Willebranda.

Choroba von Willebranda jest spowodowana zaburzeniami ilościowymi lub jakościowymi czynnika von Willebranda, który odpowiada za adhezję płytek oraz za transport i ochronę czynnika VIII przed proteolitycznym działaniem układu białka C w osoczu. Występująca u pacjentów skaza krwotoczna ma charakter skórno-śluzówkowy i zmienny przebieg, zależny od typu i podtypu zaburzenia. Typy 1 i 3 choroby von Willebranda cechuje ilościowy niedobór czynnika, niewielki w typie 1 i znaczny w typie 3. Typ 2, charakteryzujący się zaburzeniami struktury i funkcji czynnika, podzielono na 4 podtypy: 2A, 2B, 2M i 2N. Szczegółowe badania laboratoryjne pozwalają na rozpoznanie poszczególnych podtypów i tym samym umożliwiają właściwą decyzję terapeutyczną. Tabela 5.2A i 5.2B przedstawiają zmiany wyników podstawowych i uzupełniających badań laboratoryjnych, charakterystyczne dla poszczególnych postaci choroby von Willebranda.

Badania podstawowe (przesiewowe) w kierunku choroby von Willebranda obejmują oznaczanie czasu krwawienia lub czasu okluzji (PFA-100 lub PFA-200), APTT oraz oznaczenie liczby płytek. Zdecydowanie celowe jest oznaczanie aktywności i stężenia antygenu czynnika von Willebranda oraz aktywności czynnika VIII. W badaniach dodatkowych można oceniać:

- agregację płytek w obecności ristocetyny – нефизjologicznego kofaktora czynnika von Willebranda,
- strukturę multimetrów vWF,
- wiązanie czynnika vW z płytkami (glikoproteiną GPIb), kolagenem lub z czynnikiem VIII, a także
- obecność przeciwciał przeciwko czynnikowi von Willebranda.

Badania te umożliwiają rozpoznanie typów i podtypów choroby von Willebranda, rozróżnienie postaci wrodzonych od nabytych i pozwalają na podjęcie decyzji odnośnie leczenia desmopresyną (DDAVP).

Tabela 5.2A. Podstawowe badania laboratoryjne w różnych typach i podtypach choroby von Willebranda

Typ/ podtyp	Cechy charakterystyczne	Czas krwawienia*	Czas okluzji (PFA-200)	APTT
1	Częściowy niedobór ilościowy, proporcjonalne obniżenie antygenu i aktywności (<50%). Skaza krwotoczna łagodna lub umiarkowana.	N lub ↑	↑	N lub ↑
2A	Niedobór jakościowy: upośledzona adhezyjna funkcja płytek, zmniejszenie ilości/brak dużych i pośrednich multimetrów.	↑	↑	N lub ↑

Typ/ podtyp	Cechy charakterystyczne	Czas krwawienia*	Czas okluzji (PFA-200)	APTT
2B	Niedobór jakościowy: wzrost powinowactwa vWF do płytkowej GP Ib/IX, nieprawidłowe/brak dużych multimerów. Antygen i aktywność zmniejszone w różnym stopniu, łagodna małopłytkowość.	↑	↑	N lub ↑ oraz obniżona liczba płytek
2M	Niedobór jakościowy: obniżenie powinowactwa vWF do płytkowej GP Ib/IX, brak zmian multimerowych. Antygen i aktywność zmniejszone w różnym stopniu, głównie spadek aktywności.	N lub ↑	↑	N lub ↑
2N	Niedobór jakościowy: spadek powinowactwa vWF do czynnika VIII, prawidłowy rozkład multimerów.	N	N	↑
3	Całkowity niedobór ilościowy z dużym obniżeniem aktywności czynnika VIII (<5%), brak multimerów. Ciężka skaza krwotoczna.	↑↑↑	↑↑↑	↑↑

*obecnie rzadko stosowany

Tabela 5.2B. Uzupełniające badania laboratoryjne w różnych typach/podtypach choroby von Willebranda

Typ/ podtyp	vWF:Ag	vWF:RCo	VIII:C	RIPA
1	↓	↓	↓ lub N	↓ lub N
2A	↓	↓↓↓	↓ lub N	↓
2B	↓	↓ lub N	↓ lub N	Stymulacja RIPA-LD
2M	↓	↓	↓ lub ↓↓	↓
2N	N	N	↓↓	N
3	↓↓↓ lub brak	↓↓↓ lub brak	↓↓↓	brak

Gdzie: vWF:Ag – antygen czynnika vW, vWF:RCo – aktywność czynnika vW jako kofaktora rystocetyny, VIII:C – aktywność czynnika VIII, RIPA – agregacja płytek indukowana rystocetyną (LD – niskie dawki rystocetyny)

Objawy skazy krwotocznej związanej z tzw. **nabytym zespołem von Willebranda**, mogą towarzyszyć wielu schorzeniom i zespołom chorobowym i pojawiają się najczęściej u osób starszych, u których do tej pory nie obserwowano klinicznych objawów skazy krwotocznej. W tabeli 5.3 zestawiono najczęstsze przyczyny zespołu von Willebranda.

Tabela 5.3. Przyczyny zespołu von Willebranda

Przyczyna	Częstość występowania
Gammapatie monoklonalne (szpiczak, makroglobulinemia, amyloidoza)	42%
Zespoły limfoproliferacyjne (przewlekła białaczka limfatyczna, chłoniak nie-Hodgkina, białaczka włochatokomórkowa)	15%
Zaburzenia mieloproliferacyjne, szczególnie z grupy „prozakrzepowej” (nadpłytkowość samoistna, czerwienica, mielofibroza)	10%
Zaburzenia sercowo-naczyniowe (zwężenie aorty, kardiomiopatia przerostowa, defekty przedsionkowo-komorowe, wady zastawkowe, rozrusznik serca, angiodyspłazje)	10%
Postacie polekowe (kwas walproinowy, ciprofloksacyna, gryzeofulwina)	7%
Niedoczynność tarczycy	5%
Inne (zaburzenia autoimmunologiczne, guz Wilmsa, nowotwory nerek i nadnerczy itp.)	8-10%

Mechanizmy prowadzące do tego typu zaburzeń pozostają nadal w strefie badań, a za najczęstsze uważa się obecnie:

- zmniejszenie syntezy vWF,
- zahamowanie czynności lub przyspieszenie rozpadu kompleksu vWF-VIII – obecność krążących autoprzeciwciał,
- inaktywacja domen funkcjonalnych vWF lub VIII,
- przyspieszenie rozpadu multimerów i przyspieszenie rozpadu kompleksów vWF wskutek absorpcji vWF na komórkach nowotworowych (np. plazmocytach)
- przyspieszenie proteolizy multimerów wskutek działania leków lub proteaz produkowanych przez różne typy komórek.

Przypadek 5.4

30-letnia kobieta została skierowana przez lekarza rodzinnego na konsultację z powodu częstych drobnych wylewów po niewielkich urazach. W badaniu

fizykalnym nie stwierdzono żadnych zmian skórno- śluzówkowych. Wywiad rodzinny – ujemny.

W badaniach laboratoryjnych stwierdzono:

Badania podstawowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	42	28-34	s
PT-INR	1,1	0,8-1,2	s
Fibrynogen	3,5	1,8-3,5	g/L
PLT	350	130-400	G/L
Czas krwawienia	5	1-8	min

Testy potwierdzenia			
APTT 1:1	40	<42	s
cz. VIII	110	70-130	%
cz. IX	6	70-130	%

Komentarz: Ze względu na podejrzenie hemofilii (przedłużony APTT), istnieje konieczność przeprowadzenia określonych testów (oznaczeń czynników krzepnięcia) w celu potwierdzenia poszczególnych postaci hemofilii. Znaczne obniżenie aktywności prokoagulacyjnej czynnika IX przy prawidłowym stężeniu i aktywności czynnika VIII, wskazują na hemofilię typu B. W badaniach rodzinnych – poziom czynnika IX u matki 70%, u starszej siostry 120%.

Diagnoza: Hemofilia B, postać łagodna.

5.3. Nabyte skazy krwotoczne

Przypadek 5.5

25-letni mężczyzna z objawami żółtaczki został przyjęty do szpitala z powodu z powodu gwałtownie pogarszającego się stanu zdrowia oraz drobnych wylewów w miejscach iniekcji. Wywiad rodzinny – ujemny.

W badaniach podstawowych stwierdzono:

Badania podstawowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
AST	1786	<40	jm
ALT	1825	<40	jm
Bilirubina	4,4	<1,1	mg/dL
Albumina	26	35-50	g/L

W badaniach układu krzepnięcia stwierdzono:

Badania podstawowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	90	28-34	s
PT	55	10-12	s
PT-INR	5,2		
PT-wskaźnik	20	80-120	%
TT	40	16-21	s
Fibrynogen	0,85	1,8-3,5	g/L
PLT	60	130-400	G/L

Testy potwierdzenia			
Czas batrosobinowy (reptilazowy)	45	16-22	s
AT	50	85-115	%
DD	3500	<350	µg/L
VIII:C	45	80-120	%
Czas lizy euglobulin	>300	100-300	min
Rozmaz krwi obwodowej	Schistocyty, anizocytoza płytek, obecność płytek olbrzymich		

Diagnoza: WZW - ciężka postać, powikłana rozwojem zespołu rozsianego wykrzepiania śródnacyniowego (DIC)

Zespół DIC jest definiowany jako wtórny (nabyty) zespół wewnątrz-naczyniowej niezlokalizowanej aktywacji krzepnięcia, wynikający z rzutu do krążenia tromboplastyn tkankowych, aktywacji osocznego krzepnięcia i zwolnienia przepływu krwi. Związane jest to z tworzeniem drobnych zakrzepów w naczyniach mikrokrążenia, co może doprowadzić do dysfunkcji wielonarządowej, a wtórnie do aktywacji procesów fibrynolitycznych (np. w przebiegu raka gruczołu krokowego lub ostrej białaczki promielocytowej). Czynniki odpowiedzialnymi za rozwój DIC-u są przede wszystkim: nadmierna generacja trombiny (wskutek aktywacji toru zewnątrzpochodnego zależnego od czynnika tkankowego), wzrost stężenia inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) oraz coraz lepiej poznane interakcje między czynnikami krzepnięcia i mediatorami reakcji zapalnych (działanie trombiny, czynnika Xa i kompleksu VIIa-TF poprzez receptory PAR1, 2, 3, 4). W wyniku uogólnionego wykrzepiania pojawiają się pojedyncze i mnogie zakrzepy w mikrokrążeniu, co prowadzi do niedokrwiennego uszkodzenia wielu narządów. Stopniowe zużycie płytek i czynników krzepnięcia objawia się nasilającą się szką krwotoczną. W praktyce klinicznej przyjęto podział zespołu DIC na ostry (*overt* DIC) oraz przewlekły (*non-overt* DIC).

Główną rolę w przebiegu DIC-u pełni trombina i w określonych sytuacjach plazmina, czyli enzymy odpowiedzialne za aktywację krzepnięcia i fibrynolizy

oraz dodatkowo za aktywację i zwiększone niszczenie płytek. Wyniki przedstawionych powyżej badań laboratoryjnych wskazują na zmiany określonych elementów układu krzepnięcia i tym samym pozwalają na rozpoznanie DIC. Diagnostykę różnicową DIC-u przedstawiono w tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Diagnostyka różnicowa zespołu rozsianego wykrzepiania śródnacyniowego

	DIC	Pierwotna fibrynoliza	TTP	HUS	Przewlekłe choroby wątroby
PLT -liczba	↓	N	N lub ↓	↓	↓
APTT	↑	↑	N	N	N lub ↑
PT	↑	↑	N	N	↑
Fibrynogen	↓	↓	N	N	N, ↑ lub ↓
DD	↑	↑	N	N	N
AT	N lub ↓	N	N	N	N lub ↓
MF	↑	↑ lub N	N lub ↑	N	↑
Liza	N lub ↑	↓	N	N	N
Schistocyty w rozmazie	Obecne	Obecne	Obecne	Obecne	-
BUN	↑	N	↑	↑	N lub ↑
ALT, AST, bilirubina	N lub ↑	N	N lub ↑ bilirubiny	N	↑↑

gdzie: ↑ - przedłużony/podwyższony, ↓ - obniżony, N – norma, (-) nieobecne

TTP – plamica małopłytkowa zakrzepowa; HUS – zespół hemolityczno-mocznicowy; DD – D-dimery; AT – antytrombina; MF – monomery fibryny; BUN – azot mocznika w surowicy

Prawidłowa diagnostyka DIC powinna obejmować badania podstawowe, łatwe do wykonania w warunkach szpitalnych, do których zaliczamy obecnie: tzw. „czasy” (APTT, PT, TT), fibrynogen, liczbę płytek, antytrombinę i D-Dimery. Wyniki tych badań wielokrotnie pozostają niejednoznaczne, stąd konieczne staje się monitorowanie zmian poszczególnych parametrów w czasie (np. obserwacja stopniowego spadku liczby płytek czy stężenia fibrynogeny). Testy bardziej specyficzne są niestety rzadko dostępne w warunkach ostrego dyżuru, ale pozwalają na potwierdzenie stanu nadmiernego wykrzepiania i zaktywowanej fibrynolizy. Należą do nich oznaczenia kompleksów trombina-antytrombina (TAT) i plazmina-antyplazmina (PAP), a także fragmentów protrombiny F1+2, białka C i jego peptydu aktywacyjnego, oraz monomerów fibryny (MF). Coraz częściej zlecane są oznaczenia czynników krzepnięcia: cz. V, cz. VII i cz. VIII. Celowe może być oznaczenie markerów uwalniania płytkowego – β TG i PF4 oraz rozpuszczalnej P-selektyny, świadczących o aktywacji płytek w krążeniu (patrz: „Schemat postępowania w DIC-u” – rozdział 9, tom I). Ewentualna ocena układu fibrynolitycznego polega na oznaczeniu czasu lizy skrzepu euglobulin (czyli pomiarze czasu rozpuszczania

skrzepu zawierającego frakcję euglobulinową osocza, w tym aktywatorów i inhibitorów fibrynolizy) i jest rzadko wykonywana w laboratoriach diagnostycznych. Obecnie laboratoria specjalizujące się w badaniach układu fibrynolitycznego oznaczają stężenie plazminogenu, inhibitora plazminy: α_2 -antyplazminy, oraz wykonują badania aktywacji i hamowania przemiany plazminogenu. W tym celu oznaczany jest tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) – mierzyć można zarówno stężenie antygeny jak i jego aktywność oraz stężenie antygeny inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1). Badania aktywacji plazminy, która ulega natychmiastowej inaktywacji przez tzw. antyplazminy, są trudne i wymagają badań pośrednich – należy do nich oznaczanie kompleksów plazmina-antyplazmina (PAP) oraz produktów degradacji fibrynogenu i fibryny (FDP, D-Dimery, fibrynopeptydy A i B, peptydy B β 1-42, B β 15-42 i B β 1-118).

Gwałtowny spadek liczby płytek, stężenia fibrynogenu i antytrombiny oraz wzrost stężenia D-dimerów, mogą świadczyć o narastaniu objawów DIC. Dlatego w kryteriach diagnostycznych ostrego i przewlekłego DIC-u punktowane są nie tylko zmiany wartości bezwzględnych czasu protrombinowego, płytek, fibrynogenu czy D-dimerów, a przede wszystkim dynamika zmian w danym dniu lub w kolejnych dobach obserwacji. Wymaga to od laboratorium możliwości oznaczania określonych parametrów przez całą dobę.

Komentarz: Zmienione wyniki badań przesiewowych (APTT i PT) z wyraźnym obniżeniem stężenia fibrynogenu i liczby płytek, sugerują dalsze badania w kierunku DIC. Obniżenie AT i czynnika VIII, przedłużenie czasu lizy euglobulin oraz znaczny wzrost DD potwierdzają rozpoznanie. Czas trombinowy jest przedłużony z powodu niskiego fibrynogenu i wysokiego poziomu DD. Objawy skazy krwotocznej mogą wynikać z zaburzeń hemostazy pierwotnej, związanej z zaburzeniami czynności płytek w DIC-u.

Istotne wydaje się różnicowanie DIC z zakrzepową plamicą małopłytkową (TTP, tabela 5.4), która jest definiowana jako mikroangiopatia zakrzepowa z małopłytkowością, wynikającą z wewnątrznaczyniowego powstawania agregatów płytkowych. Wynika to z obecności w krążeniu dużych multimerów czynnika von Willebranda, utrzymujących się w krążeniu wskutek zmniejszonej aktywności proteazy ADAMTS-13. Obniżenie aktywności najczęściej jest wywołane obecnością specyficznych przeciwciał.

5.4. Badania laboratoryjne hemostazy przed zabiegami operacyjnymi

Przypadek 5.6

56-letni mężczyzna zgłosił się na badania podstawowe (przesiewowe) w zakresie układu krzepnięcia przed zabiegiem usuwania kamieni nerkowych. W

wywiadzie nie zgłaszał żadnych objawów wskazujących na skazę krwotoczną lub zakrzepicę. Wywiad rodzinny ujemny.

W badaniach laboratoryjnych stwierdzono:

Badania podstawowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	nie krzepnie (> 150)	28-34	s
PT	11	10-12	s
PT-INR	1,0	0,8-1,2	s
PLT	380	130-400	G/L

Badania zlecono powtórnie, uzyskując identyczny wynik. Badania wykonane po raz trzeci w kolejnym laboratorium nie różniły się od poprzednich.

Zlecono oznaczenia czynników krzepnięcia z układu wewnątrzpochodnego:

Testy potwierdzenia	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
IX	130	70-130	%
XI	150	70-130	%
XII	3	70-130	%

Komentarz: Przedłużony APTT (nieoznaczalny) sugeruje konieczność poszukiwań niedoboru czynników odpowiedzialnych za aktywację układu wewnątrzpochodnego. Brak objawów skazy krwotocznej wyklucza niedobór czynnika VIII i ciężką postać choroby von Willebranda, stąd wynika konieczność oznaczenia pozostałych czynników. Znaczne obniżenie aktywności prokoagulacyjnej czynnika XII przy prawidłowych lub nieco podwyższonych poziomach pozostałych czynników, świadczy o jego niedoborze. Niedobór czynnika XII nie powoduje objawów skazy krwotocznej, w większości przypadków przebiega bezobjawowo lub jest odpowiedzialny za zaburzenia zakrzepowe.

W badaniach rodzinnych – poziom czynnika XII: u siostry 70%, u córki 85%, wnuka (2 miesiące) zalecono dalszą diagnostykę po ukończeniu 1 roku życia.

Diagnoza: Wrodzony niedobór czynnika XII

Przypadek 5.7

Pacjent lat 65, został przyjęty do szpitala z objawami powiększenia wątroby oraz enzymatycznymi wskaźnikami uszkodzenia wątroby. W wywiadzie – choroba alkoholowa od około 15 lat, okresowo leczona bez konkretnych

rezultatów. W wywiadzie i badaniu fizykalnym stwierdzono psychiczne i fizyczne objawy marskości wątroby, powiększenie wątroby i śledziony.

W badaniach tzw. „profilu wątrobowego” zleconych przy przyjęciu do szpitala, stwierdzono:

Badania podstawowe (1)	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
AST	170	<40	jm
ALT	185	<40	jm
Bilirubina	1,4	<1,1	mg/dL
Albumina	28	35-50	g/L
Immunoglobuliny	25	9-16	g/L

W badaniach laboratoryjnych układu krzepnięcia, zleconych przed planowaną biopsją wątroby, stwierdzono:

Badania podstawowe (2)	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	45	28-34	s
PT	23	10-12	s
PT-INR	2,1	0,8-1,2	
Fibrynogen	2,2	1,8-3,5	g/L
Czas trombinowy	31	16-21	s
PLT	120	130-400	G/L

Zlecono badania uzupełniające z zakresu układu hemostazy:

Testy potwierdzenia	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
AT	45	85-115	%
cz. IX	10	70-130	%
cz. VII	20	70-130	%
cz. VIII	140	70-130	%

Diagnoza: Marskość wątroby, poalkoholowa.

Komentarz: Zaburzenia funkcji komórek wątroby prowadzą do obniżenia poziomu czynników krzepnięcia syntetyzowanych w wątrobie, głównie czynników z grupy protrombiny (rozdział 9, tom I). W schyłkowym okresie obok niedoboru czynników krzepnięcia może pojawić się hipofibrynogenemia. Oznaczenie PT jest często zlecane w celu oceny funkcji wątroby, jako tzw. „próba wątrobowa” – obserwujemy wówczas przedłużenie PT i wzrost INR). Przedłużony czas trombinowy w omawianym przypadku jest jednak wynikiem hipalbuminemii i hipergammaglobulinemii. Nieznaczna trombocytopenia może

wynikać z sekwestracji w powiększonej śledzience i/lub być wynikiem zaburzonej trombopoetyzy (spadek trombopoetyny) przy przewlekłym spożywaniu alkoholu.

Różnicowanie: Podejrzenie DIC można wykluczyć oznaczając D-Dimery oraz czynnik VIII, którego poziom pozostaje w normie lub wzrasta w chorobach wątroby.

5.5. Trombofilia

Przypadek 5.8

28-letnia kobieta została przyjęta na Oddział Intensywnej Terapii z rozpoznaniem zatoru tętnicy płucnej, potwierdzonym wynikami badań radiologicznych. W wywiadzie nie zgłaszała żadnych problemów zdrowotnych. Wywiad rodzinny – incydenty zakrzepowo-zatorowe w rodzinie ojca.

Podano dożylnie heparynę (5000 jm/mL).

W badaniach laboratoryjnych przy przyjęciu stwierdzono:

Badania wyjściowe (1)	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	30	28-34	s
PT	11	10-12	s
PT-INR	1,0	0,8-1,2	
Fibrynogen	4,2	1,8-3,5	g/L
PLT	360	130-400	G/L

Po dwóch godzinach oznaczono APTT. Wobec braku spodziewanego przedłużenia APTT nieznacznie zwiększono dawkę heparyny i zlecono ponownie oznaczenie APTT oraz szereg badań uzupełniających:

Badania w trakcie leczenia (2)	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT po 2. godz.	31	28-34	s
APTT-R*	1,0	0,8-1,2	

Po 3. godzinach zlecono dalsze badania:

Badania podstawowe i uzupełniające (3)	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	36	28-34	s
APTT-R*	1,2	0,8-1,2	
PT	12	10-12	s
PT-INR	1,1	0,8-1,2	
Fibrynogen	4,1	1,8-3,5	g/L
PLT	290	130-400	G/L
AT	65	85-115	%
DD	900	<350	µg/L

Diagnoza: Trombofilia spowodowana niedoborem antytrombiny (wrodzonym?).

Komentarz: Obraz kliniczny jest charakterystyczny dla wrodzonych zaburzeń układu antykoagulacyjnego. Oporność na heparynę przy prawidłowo prowadzonej terapii może świadczyć o niedoborze antytrombiny jako kofaktora heparyny lub o obecności heparynazy płytkowej (np. w zakrzepicy u pacjentów z masywnym rozpadem płytek w nadpłytkowości samoistnej). Wynik APTT w przypadku monitorowania leczenia heparyną niefrakcjonowaną (wielko-cząsteczkową) powinien być podawany jako współczynnik APTT-R (stosunek APTT w osoczu leczonego pacjenta do APTT w osoczu prawidłowym). O prawidłowym doborze dawki świadczy APTT-R w granicach 1,5-2,5. Defekty wrodzone występują rzadziej niż nabyte, a wrodzony niedobór antytrombiny obserwowany jest w zakrzepicach uwarunkowanych genetycznie (typy I i II), przy czym typ I charakteryzuje równomierne obniżenie stężenia i aktywności białka, natomiast typ II jest wywołany defektem struktury antytrombiny i może dotyczyć regionu wiązania heparyny, miejsca aktywnego dla czynników krzepnięcia, lub obu regionów równocześnie. Miernie obniżone stężenie AT można obserwować u noworodków i wcześniaków, a także w zaburzeniach syntezy białek w przebiegu marskości wątroby, w zespołach utraty białka (enteropatie, zespół nerczycowy) i po hemodializie. W przebiegu DIC-u oraz w posocznicy poziom AT może znacznie spadać, podobnie jak w przypadku przewlekłego leczenia heparyną niefrakcjonowaną. Oznaczenia antytrombiny prowadzone są metodami pozwalającymi na ocenę ich aktywności i/lub stężenia.

Badania przesiewowe układu krzepnięcia, wykonywane u pacjentów ze skłonnością do zakrzepów nie pozwalają na wykrycie przyczyn zaburzenia, dlatego u pacjentów z podejrzeniem trombofilii po wykonaniu badań przesiewowych wykluczających inne przyczyny zaburzeń zakrzepowozatorowych (patrz „Schemat postępowania w podejrzeniu trombofilii”, rozdział 9, tom I), należy wykonać szczegółowe badania specjalistyczne, uwzględniając częstość występowania niedoborów i dysfunkcji poszczególnych białek. Należy pamiętać, że rozległe zabiegi operacyjne, długotrwałe unieruchomienie, ciąża, połóg i stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych oraz terapii

hormonalnej u osób z wrodzonymi defektami prozakrzepowymi, mogą wywołać objawy zakrzepicy i są wskazaniem do wykonania badań szczegółowych.

W badaniach przesiewowych układu krzepnięcia, obejmujących podobnie jak w przypadku skłonności do krwawień oznaczenia APTT, PT, TT i fibrynogenu, rzadko obserwuje się odchylenia od wartości prawidłowych. U osób ze skłonnością do zakrzepów może pojawić się tzw. „paradoksalne” przedłużenie APTT, wywołane obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (LA, aPL, aCL) u pacjentów ze schorzeniami autoimmunologicznymi (np. toczeń rumieniowaty, reumatoidalne zapalenie stawów itp.). Rzadko obserwuje się dysfibrinogemie, prowadzące do zaburzeń zakrzepowych.

Wśród badań podstawowych u osób z podejrzeniem trombofilii wymienia się obecnie badania układu antykoagulacyjnego białka C (w tym oznaczanie białek C i S oraz oporności na białko C – tzw. *APC-Resistance*), oznaczanie antytrombiny (AT) oraz przeciwciał antyfosfolipidowych (aPL, np. antykoagulantu tocznia – LA) i antykardiolipinowych (aCL) – patrz niżej. Defektem współistniejącym mogą być genetycznie uwarunkowane lub nabyte wysokie aktywności czynników krzepnięcia, w tym czynnika VIII i czynnika von Willebranda. Wzrost aktywności trombino-zależnego inhibitora układu fibrynolitycznego (TAFI) oraz spadek aktywności inhibitora układu zewnątrzpochodnego (TFPI) uznano za nowe czynniki odpowiedzialne za nadkrzepliwość.

Przypadek 5.9

26-letnia kobieta została przyjęta do Kliniki Chorób Tkanki Łącznej z powodu bólów i obrzęku stawów, oraz obrzęku prawego podudzia. W wywiadzie podawała 3 ciąży, w tym jedno poronienie i 2 porody przedwczesne, nigdy nie występowały krwawienia. Wywiad rodzinny - nieistotny.

W badaniach laboratoryjnych przy przyjęciu stwierdzono:

Badania wyjściowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	62	28-34	s
PT-INR	1,0	0,8-1,2	
Fibrynogen	3,6	1,8-3,5	g/L
PLT	90	130-400	G/L

Zlecono powtórnie APTT oraz badania uzupełniające, i stwierdzono:

Badania uzupełniające	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
APTT	58	28-34	s
PLT	112	130-400	G/L
AT	103	85-115	%
DD	1800	<350	µg/L
LA1/LA2 ratio	1,72	< 1,3	

W wynikach badań immunologicznych stwierdzono obecność przeciwciał p-jądrowych i p-mitochondrialnych (nRNP/Sm, SS-A, SSB, Ro52, M2). Odczyn BTA (\pm), przeciwciała ACA IgM i IgG (ujemne), przeciwciała anty- β 2GPI obecne, miano odpowiednio: IgM 1,86, IgG 3,94.

Krążące antykoagulanty są to przeciwciała specyficzne, skierowane przeciwko określonym czynnikom krzepnięcia, występujące samoistnie lub pojawiające się po wielokrotnych przetoczeniach preparatów osoczkowych, podawanych z powodu wrodzonych niedoborów czynników krzepnięcia. Przykładowo, przeciwciała przeciw czynnikowi VIII pojawiają się najczęściej w wyniku terapii zastępczej u pacjentów z hemofilią typu A, ale mogą również występować w układowym toczniu rumieniowatym, RZS, astmie, pęcherzycy, chorobach zapalnych jelit, oraz w okresie poporodowym i w podeszłym wieku. Przeciwciała przeciw czynnikom II, V i X mogą występować w układowym toczniu rumieniowatym, opisuje się również pojawienie takich przeciwciał w ciąży lub po stosowaniu niektórych leków.

Zespół antyfosfolipidowy charakteryzuje się obecnością jednego lub więcej autoprzeciwciał, głównie antyfosfolipidowych (antykoagulant tocznia, LA) i antykardiolipinowych (ACA). Zespół manifestuje się nawracającą zakrzepicą żylną lub tętniczą, nawracającymi poronieniami lub porodami przedwczesnymi, oraz małopłytkowością. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się tzw. „paradoksalne” przedłużenie APTT, oraz fałszywie dodatni wynik badania w kierunku kiły.

Przeciwciała ACA występują 5-krotnie częściej niż LA i mogą należeć do immunoglobulin klasy IgG, IgM lub IgA, a do wykrycia przeciwciał odpowiedzialnych za zakrzepicę konieczna jest obecność kofaktora białkowego – beta₂-glikoproteiny I (β ₂GPI).

Tabela 5.5. Kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego

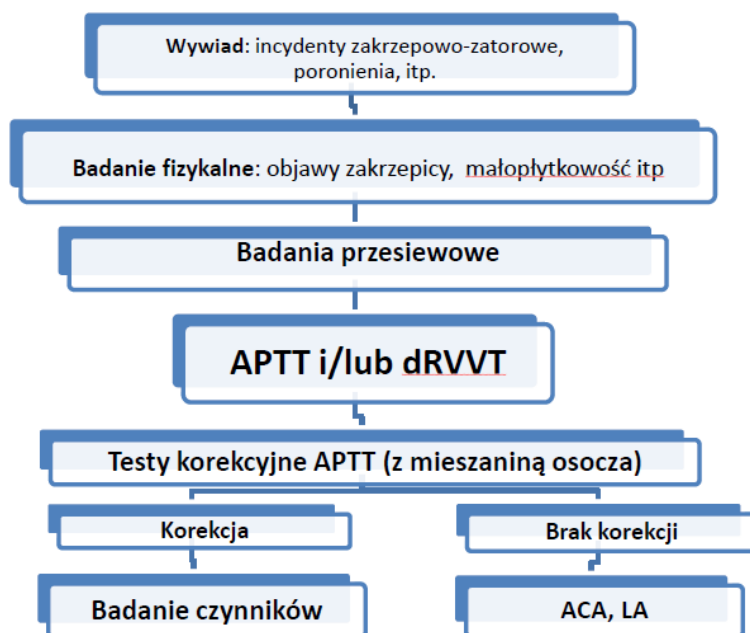
Kryteria kliniczne	Kryteria laboratoryjne
Zakrzepica naczyń - jeden lub więcej epizodów zakrzepicy w naczyniach żylnych, tętniczych lub włosowatych, potwierdzonej badaniem obrazowym, dopplerowskim lub histologicznym	Antykoagulant toczniowy obecny w osoczu, wykryty dwa lub więcej razy w odstępach powyżej 12 tygodni;
Niepowodzenia położnicze – obumarcie płodu po 10. tygodniu ciąży lub przedwczesne porody przed 34. tygodniem ciąży (stan przedrzucawkowy, rzucawka, niewydolność łożyska), lub trzy lub więcej samoistne poronienia o niewyjaśnionej przyczynie przed 10. tygodniem ciąży, z wykluczeniem innych przyczyn.	Przeciwciała antykardiolipinowe obecne w surowicy lub w osoczu, w średnim lub dużym stężeniu, wykryte dwa lub więcej razy w odstępach powyżej 12 tygodni; Przeciwciała przeciwko β_2 -glikoproteinie I obecne w surowicy lub osoczu wykryte dwa lub więcej razy w odstępach powyżej 12 tygodni.
Warunek rozpoznania: spełnione jedno lub więcej kryterium kliniczne i jedno lub więcej kryterium laboratoryjne. Kryteriów nie należy stosować, gdy objawy kliniczne choroby wystąpiły w okresie <12 tygodni lub >5 lat od momentu wykrycia przeciwciał.	

Przeciwciała LA zakłócają czynność anionowych fosfolipidów i wydłużają „czasy krzepnięcia” zależne od fosfolipidów – np. APTT oraz dRVVT. Badanie dRVVT (czasu krzepnięcia w obecności jadu węża Russela) wykazuje większą swoistość niż APTT, ponieważ jest niezależne od niedoborów czynników drogi wewnątrzprochodnej oraz przeciwciał przeciw czynnikom VIII, IX i XI.

Diagnoza: Incydent zakrzepowy w przebiegu zespołu antyfosfolipidowego.

Komentarz: Obraz kliniczny oraz wstępna interpretacja wyników badań laboratoryjnych wskazują na obecność antykoagulantu tocznia w przebiegu zespołu antyfosfolipidowego. Przedłużenie APTT (tzw. „paradoksalne” – czyli występujące u chorej bez objawów skazy krwotocznej), wskazuje na obecność przeciwciał antyfosfolipidowych, co potwierdza badanie LA1/LA2 (połączenie testu przesiewowego w obecności jadu węża Russela i testu potwierdzającego obecność antykoagulantu tocznia po dodaniu wysokich stężeń fosfolipidów). Wartości w zakresie 1,3-1,5 świadczą o obecności słabego antykoagulantu, 1,5-2,0 – o umiarkowanym i powyżej 2,0 – o silnym antykoagulancie.

Schemat postępowania w podejrzeniu zespołu antyfosfolipidowego przedstawia rycina 5.1.



Ryc. 5.1. Schemat postępowania w podejrzeniu zespołu antyfosfolipidowego. Objasnienia skrótów w tekście

5.6. Monitorowanie leczenia przeciwzakrzepowego doustnymi antykoagulantami

Przypadek 5.10

Stosowanie terapeutyczne tzw. doustnych antykoagulantów – antagonistów witaminy K w profilaktyce przeciwzakrzepowej, trwa z reguły od kilku miesięcy do wielu lat. Dlatego monitorowanie leczenia ma na celu w pierwszej fazie ustalenie dawki terapeutycznej, a następnie utrzymywanie dawki na poziomie zapobiegającym zarówno incydentom zakrzepowym, jak i powikłaniom krwotocznym (udary). Stąd konieczność prowadzenia tzw. „stabilnej antykoagulacji” – procesu, który wymaga współdziałania lekarza i pacjenta, oraz dobrej współpracy z laboratorium wykonującym oznaczenia INR. Ponieważ efekty wprowadzenia leku (acenokumarolu, warfaryny itp.) lub korekty dawki ujawniają się z pewnym opóźnieniem (tabela 5.6), wprowadzanie leku wymaga

codziennego monitorowania w okresie pierwszego tygodnia, a w przypadkach niestabilnych – nawet do 3-4 tygodni. Przy leczeniu długoterminowym zaleca się wykonywanie oznaczeń INR co 4-6 tygodni, w czym może pomóc stosowanie koagulometrów domowych (POCT – patrz również rozdział 1). W tym przypadku oznaczenia wykonywane są we krwi włośniczkowej przy pomocy odpowiednich jednorazowych zestawów, a wyniki objęte są wewnętrzną kontrolą i okresowo porównywane z wynikami oznaczeń laboratoryjnych w krwi żyłnej cytrynianowej.

Tabela 5.6. Okresy półtrwania czynników zespołu protrombiny, istotne w czasie leczenia antagonistami witaminy K

Czynnik	Okres półtrwania
VII	4-6 godz.
IX	20-24 godz.
X	48-76 godz.
II	72-100 godz.

Początkowy wzrost INR (już w pierwszej dobie) jest wynikiem spadku aktywności czynnika VII i nie decyduje o pełnym efekcie antykoagulacyjnym, ponieważ równocześnie spada działające antykoagulacyjnie białko C – którego synteza również zależy od witaminy K, a okres półtrwania jest zbliżony (6-10 godzin).

Tabela 5.7 przedstawia przykłady zalecanych zakresów terapeutycznych INR w zależności od wskazań klinicznych (uwaga: wytyczne są modyfikowane regularnie przez ekspertów). Obecnie za ogólnie obowiązujący zakres INR przyjęto wartości 2,0-3,0.

Tabela 5.7. Zalecane zakresy terapeutyczne PT-INR

INR	Stan kliniczny
2,0-2,5	Profilaktyka żyłnej zakrzepicy pooperacyjnej (w chirurgii ogólnej)
<u>2,0-3,0</u>	Profilaktyka żyłnej zakrzepicy pooperacyjnej (w ortopedii i ginekologii) Leczenie żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻchZZ) Leczenie zatoru tętnicy płucnej Napady niedokrwienia mózgu Schorzenia kardiologiczne (migotanie przedsionków, biologiczne zastawki serca itp.)
3,0-4,0	Leczenie nawrotów zakrzepicy żyłnej Leczenie nawrotów zatoru tętnicy mózgowej i nawracających zatorów tętnic Choroby tętnic (przeszczepy, zawał) Mechaniczne zastawki serca

Przypadek 5.11

62-letni pacjent został skierowany na konsultację przez lekarza rodzinnego, z prośbą o ustalenie dawki warfaryny. W wywiadzie – udar mózgu przed 3 laty, utrwalone migotanie przedsionków. Obecnie otrzymuje warfarynę w dawce 7,5 mg/dobę. Dawka została ustalona w czasie pobytu w szpitalu, przed 6. tygodniami.

W kolejnych badaniach laboratoryjnych przed wypisem ze szpitala stwierdzono:

Badania w szpitalu	Wynik	Zakres wartości terapeutycznych	Jednostki
INR - 1	2,4	2,0-3,0	
INR - 2	2,7	2,0-3,0	
INR - 3	2,5	2,0-3,0	

W badaniach laboratoryjnych po 4-6 tygodniach od opuszczenia szpitala kolejno stwierdzono:

Badania w ambulatorium	Wynik	Zakres wartości terapeutycznych	Jednostki
INR - 1	4,5	2,0-3,0	
INR - 2	1,8	2,0-3,0	
INR - 3	5,2	2,0-3,0	
INR - 4	5,6	2,0-3,0	

Diagnoza: Niestabilna antykoagulacja z przyczyn wymagających wyjaśnienia.

Wśród czynników ryzyka niestabilnej antykoagulacji należy wymienić:

- Okresowe przyjmowanie leków
- Nieregularne picie alkoholu ...
- Choroby współistniejące – niewydolność krążenia, infekcje (gorączka)
- Warianty genetyczne – CYP2C9*2 lub*3
- Stosowanie acenokumarolu (w porównaniu z warfaryną, która daje większą stabilność)
- Aktywność zawodową lub jej brak (emeryci, renciści)

Zawsze należy wykluczyć nieregularne przyjmowanie leku oraz błąd laboratoryjny.

Komentarz: Podczas pobytu w domu doszło do zaburzeń funkcji komórek wątroby, co spowodowało obniżenie poziomu czynników krzepnięcia syntetyzowanych w wątrobie, głównie czynników z grupy protrombiny (tabela 5.6). Najczęściej obserwowaną przyczyną jest zmiana diety pacjenta –

nieregularne spożywanie potraw, zawierających różne stężenia witaminy K (tabela 5.8). Ustalono, że pacjent „urozmaicał” dietę zarówno poprzez nieregularne spożywanie pokarmów bogatych/ubogich w witaminę K, jak i nieregularne picie alkoholu oraz przyjmowanie leków antydepresyjnych. Właściwe prowadzenie pacjenta wymagało od lekarza starannego zebrania wywiadu oraz poradnictwa dietetycznego.

Zapotrzebowanie dobowe na witaminę K wynosi 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. m.c. Obniżenie podaży dobowej do wartości poniżej $< 0,5 \mu\text{g}/\text{dobę}$ wywołuje wahania INR. Z kolei regularna podaż witaminy K w diecie (warzywa) w dawce około 700 $\mu\text{g}/\text{tydzień}$, może wywołać zmianę INR nawet o 1,0 (np. spadek INR z 2,5 do 1,5).

Tabela 5.8. Zawartość witaminy K w najczęściej spożywanych pokarmach

Pokarmy bogate w witaminę K	Zawartość witaminy K
Herbata ziołowa/zielona Szpinak Rzepa	300 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ (mrożonki – zawierają więcej witaminy K niż produkty świeże!!!)
Brokuły Brukselka Kapusta Sałata Olej sojowy/produkty sojowe	100-300 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$
Wątróbka Groszek zielony Kalafior Ogórek ze skórką	20-100 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$

5.7. Monitorowanie leczenia heparyną

Leczenie heparyną niefrakcjonowaną (wielkocząsteczkową) podawaną dożylnie, wymaga bezwzględnie monitorowania przy pomocy badań laboratoryjnych. Wynika to z dużej zmienności osobniczej w odpowiedzi na leczenie i w związku z tym indywidualnej korekty dawek. Najczęściej stosowanym badaniem jest pomiar czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), który odzwierciedla efekt działania na trombinę (czynnik II) i czynnik X w obecności prawidłowego stężenia antytrombiny. Właściwy dobór dawki i osiągnięcie terapeutycznego stężenia heparyny we krwi powoduje 1,5-2,5-krotne przedłużenie APTT w stosunku do wartości prawidłowych lub wartości przed leczeniem, co w tym przypadku wyrażane jest jako tzw. R-APTT (*ratio*).

Przypadek 5.12

Pacjentka lat 65, z rozpoznaniem zatorowości płucnej, otrzymała dożylnie heparynę niefrakcjonowaną w dawce 5000 j/m/ml.

W kolejnych badaniach laboratoryjnych stwierdzono:

Badania wyjściowe w szpitalu	Wynik	Zakres wartości terapeutycznych	Jednostki
APTT-R (po 1 h)	1,0	1,5-2,5	
APTT-R (po 3 h)	2,0	1,5-2,5	
APTT-R (po 6 h)	2,5	1,5-2,5	

Komentarz: Częstość oznaczania APTT zależy od sposobu podawania heparyny. W przypadku wlewu ciągłego, pierwsze oznaczenie powinno zostać wykonane po 4-6 godzinach, co daje podstawę do ustalenia szybkości podawania (dawki heparyny) we wlewie dożylnym. Wlew ciągły wymaga kontroli APTT przynajmniej raz dziennie.

Właściwe współdziałanie oddziału i laboratorium wymaga, żeby pobranie krwi odbywało się z oddzielnego wkłucia żylnego, a laboratorium powinno wyznaczyć własne zakresy terapeutyczne dla stosowanej w danym szpitalu heparyny.

Na salach operacyjnych, głównie w przypadku chorych operowanych w krążeniu pozaustrojowym, stosowany jest aktywowany czas krzepnięcia (ACT). Metoda ta pozwala na monitorowanie skuteczności leczenia pacjentów dużymi dawkami heparyny, a także skuteczności działania protaminy, desmopresyny i preparatów płytkowych podawanych w trakcie lub po zabiegach operacyjnych. Aparaty służące do pomiaru ACT są łatwe w obsłudze i kalibracji, oraz wymagają jednorazowych zestawów odczynnikowo-probówkowych.

Czas protrombinowy nie jest wrażliwy na działanie heparyny, dlatego oznaczany jest wspólnie z APTT dopiero w okresie przejścia z heparyny na doustne antykoagulanty, czas trombinowy jest nieoznaczalny w obecności dużych dawek heparyny.

Niezmiernie ważne jest oznaczanie płytek, zwłaszcza przy długotrwałym stosowaniu heparyny, ponieważ pozwala na wykrycie małopłytkowości poheparynowej (HIT). Odpowiedzią na leczenie heparyną (najczęściej przez okres powyżej tygodnia) może być tworzenie kompleksów immunologicznych powstających przeciwciał IgG z heparyną, czynnikiem PF4 i płytkami (poprzez receptor Fc). Powstające agregaty płytkowe oraz generacja trombiny są przyczyną zakrzepów w drobnych naczyniach, a w badaniach laboratoryjnych stwierdza się zmniejszenie liczby płytek. Małopłytkowość indukowana heparyną (łagodny HIT 1 lub HIT 2 - immunologiczny), występuje u około 10% chorych leczonych heparyną i charakteryzuje się spadkiem liczby płytek w ciągu 5-14 dni do wartości < 100 G/L). Po odstawieniu heparyny normalizacja liczby PLT następuje po około 5-7 dniach, a przeciwciała zanikają w okresie 3 miesięcy. W badaniach laboratoryjnych można oznaczać uwalnianie serotoniny przez płytki

oraz obecność przeciwciał p-heparynowych, jednak żadna z tych metod nie jest obecnie powszechnie stosowana.

Leczenie heparyną drobnocząsteczkową (LMWH) nie wymaga monitorowania przez oznaczanie APTT, ponieważ przedłużenie APTT występuje dopiero przy bardzo wysokich dawkach. Metodą z wyboru, choć rzadko stosowaną ze względu na koszty, jest oznaczanie aktywności anty-Xa. Zaleca się monitorowanie terapii u pacjentów z chorobami nerek i wątroby, z patologiczną otyłością, w ciąży, u osób po 70. roku życia i dzieci poniżej 5. roku życia, ponieważ w w/w stanach metabolizm LMWH może być zmieniony. Przewlekłe leczenie LMWH wymaga również okresowej kontroli liczby płytek, ze względu na możliwość wystąpienia małopłytkowości poheparynowej.

W monitorowaniu skuteczności leczenia przeciwwkrzepowego wykorzystywane są wyniki badań ilościowych i jakościowych płytek, oraz podstawowych testów układu krzepnięcia (tabela 5.9).

Tabela 5.9. Wpływ najczęściej stosowanych leków na podstawowe badania układu krzepnięcia

Badanie	Acenokumarol i warfaryna	Aspiryna i pochodne	Dipirydamol i pochodne	Heparyna i pochodne	Streptokinaza i pochodne
PLT- liczba	N	N	N	N lub ↓	N
Zaburzenia czasu okluzji (PFA-200)	N	↑	↑	N	N lub ↑
Zaburzenia agregacji PLT	N	↓	N	N lub ↓	N lub ↓
APTT	N lub ↑	N	N	↑	↑
PT	↑	N	N	↑	↑
TT	N	N	N	↑	↑
Fibrynogen	N	N	N	N	↓

↑ – przedłużony/podwyższony, ↓ – obniżony, N – norma

Problemem monitorowania „leków przyszłości” – podawanych doustnie bezpośrednich inhibitorów trombiny, zajmują się obecnie specjaliści z wielu krajów, ale jak dotąd nie uzgodniono jednoznacznego schematu postępowania laboratoryjnego. Na szczególną uwagę zasłużyły dwa leki, Dabigatran i Riwaroksaban, które w chwili obecnej objęte są badaniami pod kątem wprowadzenia odpowiednich badań laboratoryjnych, umożliwiających monitorowanie skuteczności leczenia w określonych sytuacjach klinicznych. W grupie tych badań znajdują się prawdopodobnie tradycyjne „czasy” – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) i zmodyfikowany czas protrombinowy (nowe „wersje” PT-INR lub PT-Ratio) oraz niedoceniany dotychczas czas ekarynowy (ECT).

6. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ WODNO-ELEKTROLITOWYCH, KWASOWO-ZASADOWYCH I WAPNIOWO-FOSFORANOWYCH

Andrzej Szutowicz

Uwaga: Prosimy w wydrukowanie i przyniesienie na zajęcia tabel 6.1 i 6.2 oraz podrozdziałów 6.6 i 6.7, jak również kalkulatorów.

6.1. Parametry pomiarowe gospodarki wodno-elektrolitowej

Tabela 6.1. Najczęściej używane parametry pomiarowe gospodarki W-E, RKZ i Ca-Pi

OSOCZE/KREW		MOCZ/WYDALANIE	
Albumina	35 - 50 g/L	Stosunek Ca/kreatynina	0,08 – 0,75
AZ	8 - 16 mEq/L	cAMP nefrogenny	8 – 44 %
Ca Ca ²⁺	2,2 – 2,6 mmol/L 1,10 – 1,27 mmol/L*	Diureza	800 – 1800 ml
Cl	95 – 110 mmol/L	Osmolalność (c.wł. 1,001-1,030 g/cm ³)	50 – 1200 mOsm/kg H ₂ O
Fosfataza alkaliczna	39 – 117 jm/L	normalna podaż płynu: (c.wł. 1,008-1,023 g/cm ³)	300 – 900 mOsm/kg H ₂ O
Glukoza	4,16 – 5,56 mmol/L 70 – 100 mg/dL	12 godz. bez płynu: (c.wł. 1,021-1,030 g/cm ³)	850 – 1200 mOsm/kg H ₂ O
K	3,5 – 5,0 mmol/L		
Kreatynina	m: 62 – 113 μmol/L k: 44 – 106 μmol/L	Kreatynina	m 1,0 – 2,0 g/24 godz k 0,8 – 1,6 g/24 godz
Mocznik	3,3 – 7,5 mmol/L	Mocznik	417 – 500 mmol/24 godz.
PO ₄	1,16 – 1,45 mmol/L		
pH	7,35 – 7,45	Na	40 – 220 mmol/24 godz.
pCO ₂	35 – 45 mmHg	K	25 – 125 mmol/24 godz.
pO ₂	65 – 95 mmHg	Tm PO ₄ /FK	0,70 – 1,35 mmol/L
HCO ₃	20,5 – 27,5 mmol/L		
NZ	(-2,5) – (+2,5) mmol/L		
Osmo- lalność	284 – 294 mOsm/kg H ₂ O		
Na	135 – 145 mmol/L		

* Przy pomiarze Ca²⁺ nie stosuje się korekt podanych w tabeli 6.2, ponieważ elektrody jonoselektywne oznaczają rzeczywiste stężenie (aktywność) tej biologicznie aktywnej frakcji wapnia.

Tabela 6.2. Wyliczane parametry gospodarki W-E/RKZ/Ca-Pi

Parametr/równanie	Jednostki
Aniony zalegające $AZ = [Na^+] - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$	mmol/L
Skorygowane [Ca] całkowitego (korekcja albuminowa) $[Ca_{skoryg.}] = [Ca_{ozn.}] + 0,02 \times ([40] - [Alb_{akt.}])$	mmol/L (albumina w g/L)
Skorygowane [Ca] całkowitego (kor. pH)* $[Ca_{skoryg.}] = [Ca_{ozn.}] + 0,5 \times (7,4 - pH_{akt.})$	mmol/L
Osmolalność całkowita obliczona = $2 \times [Na^+] + [glukoza] + [moczniak]$ Osmolalność efektywna = $2 \times [Na^+] + [glukoza]$	mosmol/L
Luka osmotyczna = $Osm_{zmierzona} - Osm_{obliczona}$	mosmol/L
Niedobór wody (odwodnienie hipertoniczne) $[Na^+_{akt.}] - 145$ Niedobór wody = $0,6 \times CWC \times \left[\frac{\quad}{145} \right]$	L
Niedobór wody (odwodnienie izotoniczne) $\frac{Ht_{akt.} - Ht_n.}{Ht_n.}$ Nied. wody. = $0,2 \times CWC \times \left[\frac{\quad}{\quad} \right]$	L
Całkowity NZ = $0,3 \times CWC \times NZ$ (przy $NZ < -10$ mmol/L) Cześciowy NZ = $0,5 \times CWC \times NZ_{całkowity} - NZ_{-10mmol/L}$ (przy $NZ > -10$ mmol/L)	mmol/L

Skróty: AZ – aniony zalegające (mmol/L); NZ – niedobór zasad (mmol/L); CWC – całkowita waga ciała (kg); Ht – hematokryt (%)

Uwaga: Żadna korekta nie jest potrzebna przy pomiarze wapnia zjonizowanego elektrodą jonoselektywną. Mierzy ona stężenie aktualne jonów wapniowych niezależnie od stężenia albuminy i pH krwi.

6.2. Albumina jako wskaźnik nawodnienia.

Oznaczanie poziomu albuminy i białka całkowitego w surowicy ma znaczenie w diagnostyce zaburzeń gospodarki białkowej (rozdz. 2).

Na te zmiany mogą nakładać się zmiany stanu nawodnienia w przebiegu zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej. Te dwa rodzaje zaburzeń mogą występować niezależnie lub też w przebiegu tego samego zespołu chorobowego. Przykładem zaburzeń łączonych jest zespół nerczycowy, gdzie pierwotna utrata

albuminy z moczem powoduje spadek ciśnienia onkotycznego i hipowolemię, która wywołuje wtórny wzrost wydzielania ADH oraz aktywację układu renina–angiotensyna–aldosteron, powodując retencję wody i przewodnienie oraz dalszy spadek poziomu albuminy w surowicy. Dlatego interpretacja stanów przewodnień za pomocą poziomu albuminy jest w praktyce ograniczona do sytuacji, w których wyklucza się współistnienie zaburzeń syntezy i zwiększonej utraty albuminy. Natomiast hiperalbuminemia (po wykluczeniu przyczyn jatrogennych) jest zawsze wskaźnikiem odwodnienia. Nie ma stanów nadprodukcji albuminy w wątrobie (tom II, rozdz. 2).

6.3. Znaczenie diagnostyczne oznaczania jonów potasu w surowicy

Tabela 6.3. Najczęstsze przyczyny hiperkalemii

Nadmierna podaż potasu	Z pokarmami u chorych z niewydolnością nerek Z płynami infuzyjnym Z krwią przeterminowaną Z lekami (np. sól potasowa penicyliny)
Zmniejszone wydalanie potasu przez nerki	Niewydolność nerek Choroba Addisona Różne niedobory mineralokortykoidów (niedobór reniny, inhibitory cyklooksygenazy, blok receptorów angiotensyny) Leki (spironolakton, amylorid, triamteren, cyklosporyna A itp.) Tubulopatie (typ I, II, III)
Redystrybucja/ uwalnianie z tkanek	Rozpad komórek (hemoliza wewnątrznaczyniowa, rądomioliza itp.) Kwasice różnych typów Hipertonia (mannitol) Leki (sukcynylocholina, beta-blokery, alfa-agoniści, glikozydy nasercowe itp.)
Hiperkalemia rzekoma	Błędy przedlaboratoryjne: zbyt późne oddzielenie krwinek od surowicy*, hemoliza w próbówce, zanieczyszczenia

*Np. transport próbek krwi pełnej przy wykonywaniu badań przez laboratoria zewnętrzne

Tabela 6.4. Najczęstsze przyczyny hipokalemii (niedobory ogólnoustrojowe)

Niedostateczna podaż	Głodzenie (niedożywienie) Jadłowstręt psychiczny Prawidłowa podaż przy zwiększonej utracie (przez nerki lub przewód pokarmowy)
Zwiększona utrata	Utrata przez nerki: hiperaldosteronizm pierwotny i wtórny, zespół/choroba Cushinga, zespół Barrtera, zasadowice, kwasice cewkowe dystalne i proksymalne, stany po ostrej niedomodze nerek, diureza osmotyczna Leki: diuretyki pętlowe, glikokortykoidy, amino glikozydy, cis platyna, sirolimus, żywice wiążące potas Utrata przez przewód pokarmowy: wymioty, biegunki, przetoki, zespolenie moczowodowo-esicze, leki przeczyszczające Przez skórę: oparzenia, obfite poty
Redystrybucja między PPK i PWK	Zasadowice Szybkie odżywianie osób niedożywionych bez odpowiedniego uzupełniania potasu i Pi Leki: insulina, beta-agoniści, nadmierna aktywność układu współczulnego, tyreotoksykoza, aldosteron, inhibitory fosfodiesterazy
Hipokalemia rzekoma	Błędy przedlaboratoryjne (rozcieńczenie płynami infuzyjnymi)

6.4. Znaczenie diagnostyczne oznaczanie jonów sodu w surowicy

Poziom sodu w osoczu decyduje o osmolalności PPK, nie jest natomiast wskaźnikiem ogólnoustrojowej zawartości wody. Wysokie poziomy sodu oznaczają hipertonię PPK i jednocześnie spadek objętości PWK zarówno przy odwodnieniach jak i przewodnieniach hipertonicznych.

Tabela 6.5. Choroby i stany patologiczne związane z hiponatremią

Warunki/ choroba/zespół	Mechanizm(y)
1. Hiponatremia związana ze spadkiem objętości PPK i niedoborem ogólnoustrojowym Na	
A. Diuretyki	Zwiększona utrata wody i Na wskutek: wzrostu diurezy (np. kw. etakrynowy, furosemid); eliminacji potasu (np. tiazidy); spadek reabsorpcji zwrotnej NaCl w ramieniu wstępującym pętli Henlego (tzw. diuretyki pętlowe, azasemid, furosemid)

Warunki/ choroba/zespół	Mechanizm(y)
B. Zapalenie nerek z utratą soli	Większość pacjentów z GFR < 15ml/min nie może ograniczyć wydalania Na z moczem przy zmniejszonej podaży soli. Przy normalnej podaży nie potrafi jednak utrzymać prawidłowego poziomu Na w osoczu przy normalnej podaży. Pacjenci wymagają suplementacji NaCl dla zapobieżenia hipowolemii i hiponatremii.
C. Niedobory mineralokortykoidów	Niedostateczna reabsorbcja zwrotna sodu w kanaliku dystalnym powoduje jego utatę z moczem i hipowolemię kompensowaną przez wzrost wydzielania ADH.
D. Niedobory glukokortykoidów	Mechanizm j.w. bez hipowolemii dzięki wzrostowi wydzielania ADH
E. Diureza osmotyczna	Konieczność wydalania zwiększonego ładunku osmotycznego np. glukozy w cukrzycy lub mannitolu przy leczeniu przeciw obrzękowym. Zwiększony przepływ przez dystalną część nefrony zwiększa utratę soli i wody.
F. Kwasice cewkowe/ zasadowice metaboliczne	W kwasicy cewkowej typu II (proksymalnej) utrata wodorowęglanów wiąże się z utratą kationów Na i K.
G. Zapalenie trzustki/otrzewnej, oparzenia	Pozanerkowa utrata wody i soli (do jamy otrzewnej, przewodu pokarmowego – przestrzeń trzecia, lub przez skórę) powoduje zmniejszenie objętości PPK
H. Wymioty, biegunki	Utrata płynów o wysokim stężeniu elektrolitów z kałem i wymiotami i niedostatecznym uzupełnianiu wodą powoduje niedobory Na, K, Ca. Odwodnieni pacjenci wydalają mocz o wysokiej osmolalności (>800 mosm/L)
2. Hiponatrenia związana z lekką hiperwolemią i normalną zawartością ogólnoustrojową sodu	
A. Zespół nieodpowiedniego wydzielania ADH (SIADH)	Występuje w trzech grupach chorób: nowotwory złośliwe, choroby płuc, choroby ośrodkowego układu nerwowego. Objawy to: hiperwoleミア, obrzęki, endokrynopatie, ch. nerek. Nadmiar wody wPPK i PWK (tom I, rozdział 6).
B. Hipotyreoidyzm	Stymulacja ADH poprzez baroreceptory (niskie RR)
C. Choroby psychiczne	Okolo 10% chorych psychicznie pije nadmierne ilości wody, a okolo 5% ma zatrucie wodne. Przyczyną jest zmiana wrażliwości osmoreceptorów, zaburzenie odczuwania pragnienia, nadwrażliwość nerek na ADH.
D. Stany pooperacyjne	Okolo 5% pacjentów po zabiegach operacyjnych ma przejściową hiponaremię spowodowaną nadwrażliwością baroreceptorów.
E. Leki	Nikotyna, morfina, – stymulacja sekrecji ADH przez baroreceptory

Warunki/ choroba/zespół	Mechanizm(y)
	<p>Klofibrat – stymulacja tylnego płata przysadki Karbamazepina – wzrost wrażliwości kanalika dalszego na ADH Chloropropamid i wysokie dawki tolbutamidu - powodują hiponatremię u kilku procent diabetyków (stymulacja cykazy adenylanowej i inhibicja fosfo-deisterazy) Antydepresanty – związane z inhibicją monoaminooksydazy Indometacyna - zniesienie inhibicyjnego działania prostaglandyn na działanie ADH.</p>
3. Hiponatremia związana z hiperwolemią PPK i zwiększoną zawartością ogólnoustrojową sodu	
A. Zastoinowa niewydolność serca	Spadek wyrzutowej pojemności serca powoduje hipowolemię i kompensacyjną aktywację układu renina-angiotensyna-aldosteron (retencja izotoniczna wody i sodu) oraz wydzielania ADH (retencja wody)
B. Marskość wątroby	U pacjentów ze zkompenowaną marskością wątroby hipotonia hipoonkotyczna stymuluje sekrecję ADH, przy obniżonej syntezie angiotensynogenu.
C. Zespół nercycowy	U tych pacjentów hiponatremia występuje zwykle po zastosowaniu diuretyków lub po nadmiernej podaży wody. Przyczyną może być spadek ciśnienia perfuzyjnego w kłębkach nerkowych i niedostateczna objętość płynu w kanalikach, co indukuje wydzielanie ADH.
D. Niewydolność nerek	Spadek filtracji kłębowej powoduje retencję wody zwykle większą od retencji sodu. Również podaż wody może być większa niż możliwości jej wydalenie przez niewydolne nerki.

Tabela 6.6. Choroby i stany patologiczne związane z hipernatremią

Warunki/ choroba/zespół	Mechanizm(y)
1. Hipernatremia z normalną zawartością sodu w ustroju	
A. Pozanerkowa utrata wody	Straty wody z oddechem i przez skórę zwiększane przez hiperwentylację, wysoką ciepłotę ciała, wysoką temperaturę otoczenia przy niedostatecznej podaży wody prowadzą do spadku objętości PPK z hipernatremią, a więc i ze zmniejszeniem objętości PWK.
B. Moczówka prosta	Niedostateczne wchłanianie zwrotne wody w kanalikach zbiorczych wskutek niskiego wydzielania ADH przez tylny płąt przysadki (moczówka centralna, wrażliwa na egzogenny ADH), lub uszkodzenia kanalków nerkowych (moczówka nefrogenna, nie wrażliwa na egzogenny ADH)
C. Hipernatremia samoistna	Podwyższenie progu odpowiedzi na ADH. Upośledzenie odruchu pragnienia. Skojarzone z uszkodzeniami podwzgórza, otyłością, napadową słabością mięśni i niską aktywnością psychomotoryczną jak również z nowotworami (przerzutowe raki płuc, gruczolaki przysadki, potworniaki, oponiaki, sarkoidoza)
2. Hipernatremia ze zmniejszoną zawartością sodu w ustroju	
A. Diureza osmotyczna/ utrata przez skórę, kałbiegunkowy	Wywołana zwiększonym ładunkiem związków, które muszą być wydalone z moczem (glukoza, mannitol, mocznik inne związki osmotycznie czynne). U dzieci może wystąpić przy przedawkowaniu środków przeczyszczających na bazie sorbitolu. Niezbędne jest uzupełnienie niedoborów Na i wody poprzez podanie płynów hipotonicznych.
B. Hipernatremia noworodków	Noworodki mają niższą zdolność nerek do oszczędzania wody - zagęszczania moczu i relatywnie większe straty niewidoczne..
3. Hipernatremia ze zwiększoną zawartością sodu w ustroju	
A. Pacjenci dializowani	Zbyt wysoka zawartość Na w płynie dializacyjnym.
B. Hiperaldosteronizm pierwotny	Nadmierna reabsorbcja Na w kanaliku dalszym z równoczesną utratą K^+ i H^+ . Izoosmotyczna retencja wody prowadzi do hiperwolemii, która może przejść w postać hipernatremiczną
C. Jatrogenna	Podawanie hipertonicznych roztworów sodu lub izotonicznego NaCl jako jedynego płynu uzupełniającego.

6.5. Znaczenie diagnostyczne oznaczania jonów chlorkowych w surowicy

Stężenie Cl w sposób pasywny zmienia się za zmianami stężenia Na w przestrzeniach wodnych ustroju. Może być jednak modyfikowane przez zmiany stężenia innych anionów w surowicy takich jak aniony wodorowęglanowe, białczanowe, czy też inne z grupy anionów zalegających. Stanowią one istotny, choć często nie doceniany przez klinicystów, element oceny stanu gospodarki wodno-elektrolitowej i kwasowo zasadowej (tom I, rozdz. 5 i 6). Są niezbędne do obliczenia luki anionowej (tabela 6.2).

Tabela 6.7. Choroby i stany patologiczne związane z hipochloremią

Warunki/ choroba/zespół	Mechanizm(y)
Jelitowa utrata HCl Wymioty, drenaż, wrodzona utrata z kałem	Sok żołądkowy zawiera: [Na]= 120-130 mmol/L i [Cl]= 200-300 mmol/L. Dlatego przy dużej utracie soku pojawiają się: hipochloremia, hipokalemia, zasadowica metaboliczna; w moczu [K]>40 mmol/L, [Cl]<10 mmol/L
Diuretyki np. furosemid, kw. etakrynowy	Powodują spadek reabsorpcji Na i wtórnie Cl. W moczu [Cl]>50 mmol/L
Hiperaldosteronizm, zespół i choroba Cushing'a	Hipochloremia towarzyszy zasadowicy metabolicznej (wzrost HCO_3^-) i hipokalemii. Nie daje się skorygować NaCl, dopóki nie wyrówna się niedoborów K.
Podaż środków alkalinizujących	Hipochloremia koreluje ze stopniem alkalozji
Przewlekła hiperkapnia w niewydolności oddechowej	Kompensacja kwasicy oddechowej przez nerki polega na wzroście wydalania jonów H^+ = retencja HCO_3^- w kanalikule dalszym i wzroście NZ we krwi. Retencji HCO_3^- towarzyszy wydalanie równoważnej ilości Cl ([Cl] w moczu >20 mmol/L)
Zespół Bartter'a	Zespół dziedziczny spowodowany zaburzeniem reabsorpcji Cl w nerce. Stanowi fenotypowy obraz mutacji w jednym z 5 genów kodujących białka różnych transporterów odpowiedzialnych za transport Cl^- , $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ lub K^+ w grubym wstępującym ramieniu pętli Henle'ego.
Kwasice metaboliczne ze wzrostem luki anionowej: – cukrzycowa/ketonowa – mleczanowa – mocznicowa zatrucia– etanol, salicylany, metanol, glikol etylenowy	Mechanizmy: patrz tom I, rozdz. 5, 6, 7

Tabela 6.8. Choroby i stany patologiczne związane z hiperchloremią

Warunki/ choroba/zespół	Mechanizm(y)
Kwasice kanalikowe typu I (dystalne)	<p>Nerki są niezdolne do zakwaszania moczu do $\text{pH} < 5.3$ pomimo kwasicy PPK, przy obciążeniu chlorkiem amonu. Prezentacja fenotypowa: osteomalacja, hipokalemia, mocz zasadowy, zwiększona aktywność fosfatazy zasadowej, kwasica metaboliczna z tendencją do pogłębiania z prawidłową luką anionową, kamica moczowa.</p> <p>Przyczyny: ch. autoimmunizacyjne, mutacje dziedziczne (gen pompy protonowej, anemia sierpowata), nefrotoksyny (ifosfamid, lit, amfoterycyna B), działanie niepożądane (dożylne podanie bisfosfonianów – ok. 10%)</p>
Kwasice kanalikowe typu II (proksymalne)	<p>Obniżenie progu reabsorpcji zwrotnej wodorowęglanów w kanaliku bliższym, przy stabilnej kwasicy metabolicznej i zachowaną zdolnością do zakwaszania moczu. Prezentacja fenotypowa: hiperchloremiczna kwasica metaboliczna, hipokalemia, obciążenie chlorkiem amonu obniża pH moczu < 5.3, prawidłowa luka anionowa. Może stanowić element zespołu Fanconi'ego.</p> <p>Przyczyny: zaburzenia nabyte w przebiegu amyloidozy, szpiczaka mnogiego, nocnej napadowej hemoglobinurii, toksyczne (ifosfamid, ołów, kadm itp.)</p>
Przewlekła hiperwentylacja	Wysoka gorączka i różne patologie ośrodkowego układu nerwowego pobudzają ośrodek oddechowy. Badania laboratoryjne – jak w kwasicach kanalikowych.
Podaż chlorków	Zakwaszanie chlorkiem amonu powoduje kwasicę metaboliczną hiperchloremiczną z prawidłową luką anionową.
Zespolenie moczowodowo- esicze	Przy wysokiej zawartości chlorków w moczu są one w esicy wymieniane na wodorowęglany, co prowadzi do kwasicy metabolicznej hiperchloremicznej z prawidłową luką anionową.



Ryc. 6.1. Krzywica w mieszanej proksymalno-dystalnej kwasicy kanalikowej

Stany chorobowe związane ze zmianami stężeń Ca i fosforanów w surowicy oraz z różnymi zaburzeniami gospodarki kwasowo-zasadowej zostały opisane w tomie I, rozdział 5, 6, 7.

6.6. Obliczenia

Przykład 1:

Przelicz stężenia podane w jednostkach wagowych na molowe.

Dokonaj obliczeń pkt. A – E przed zajęciami.

- A. Jakie jest stężenie Na (w mol/L) w 0,9% NaCl? =
(m. at. Na = 23; Cl = 35,5)
- B. Ile jest K (w mol) w 1 g KCl? =
(m. at. K = 39; Cl = 35,5)
- C. Jakie jest stężenie K (w mol/L) w 0,3% KCl? =
- D. Jaka jest osmolalność 0,9% roztworu NaCl zawierającego 0,3% KCl? =

E. Ile jest N (w g) w 500 mmolach mocznika (CON_2H_4)? =

Przykład 2:

Oblicz wartości anionów zalegających (AZ) i osmolalności dla podanych niżej parametrów pomiarowych. Wszystkie wyniki z wyjątkiem pH są podane w mmol/L.

Lp.	Na	K	Cl	Mocz- nik	Glu- koza	pH	pCO ₂	HCO ₃	NZ	AZ	Osm całk.	Osm efekt.
1.	140	4,0	103	4,5	4,5	7,40	40	25	0			
2.	132	4,9	92	2,8	25,5	7,30	26	12	-12			
3.	138	5,1	98	50,2	5,3	7,27	23	10	-15			

Przedstawione zestawy wyników są typowe dla:

1.....

2.....

3.....

6.7. Przypadki kliniczne

Przypadek 6.1

56-letni mężczyzna, palący 40 – 50 papierosów dziennie, z suchym kaszlem, skarży się na postępujące zmęczenie i utratę ciężaru ciała (ok. 6 kg) w ciągu ostatnich 2 miesięcy. Przy przyjęciu uzyskano następujące wyniki:

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKA	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Na	107	mmol/L	135-145
K	3,2	mmol/L	3,5-5,0
Cl	72	mmol/L	95-110
Glukoza	5,0	mmol/L	4,16-5,83
Mocznik	3,8	mmol/L	3,3-7,5
Kreatynina	76	μmol/L	k: 62-113, m: 44-106
Osmolalność zmierzona	218	mOsm/kg H ₂ O	284-294

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKA	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Mocz			
Na/24 h	120	mmol/24 h	40-220
Diureza	638	mL	800-1800
Osmolalność zmierzona	970	mOsm/kg H ₂ O	50-1200

- Które z podanych wartości odbiegają od normy?
- Oblicz osmolalność osocza i porównaj z wartością zmierzoną.....

RTG klatki piersiowej ujawniło poszerzone zacielenia lewej wnęki. W treści z dolnych dróg oddechowych: **komórki raka drobnokomórkowego**.

- Zasugeruj wstępne rozpoznanie.
- Dlaczego wydalanie sodu jest wysokie?

Przez następne 4 dni ograniczono podaż wody do 1 L/24 godz. i uzyskano następujące wyniki:

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKA	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Na	131	mmol/L	135-145
K	3,4	mmol/L	3,5-5
Cl	90	mmol/L	95-110
Mocznik	9,0	mmol/L	3,3-7,5

- Określ kierunek zmian i wyjaśnij ich mechanizm.

Przypadek 6.2

Szczupły mężczyzna, waga 70 kg, do wypadku zdrowy, został przyjęty po 30 min. od doznania urazu czaszki. Nieprzytomny, bez drgawek, zmarł po 16 dniach. Pacjenta żywiono przez zgłębnik podając 160 g białek, 140 g węglowodanów, 60 g tłuszczów, 48 g NaCl, witaminy, składniki mineralne oraz 2500 ml H₂O/24 godz.

Po 5 dniach zmniejszono podawanie NaCl do 5 g/24 godz. z powodu hiperchloremii (120 mmol/L). W ciągu następnych 7 dni stopniowo malało ciśnienie krwi.

Pacjenta zacewnikowano i uzyskano następujące wyniki:

Dni po przyjęciu	13	14	15	16
Diureza (mL/24 h)	2500	2100	2200	320
c. wł. moczu (ranna porcja)	1,012		1,018	

Rankiem po 16 dniach wystąpiła zapasć naczyniowa.

Uzyskano:

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKI	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Na	175	mmol/L	135-145
K	3,7	mmol/L	3,5-5
Cl	134	mmol/L	95-110
Mocznik	17,0	mmol/L	3,3-7,5
Albumina	70	g/L	35-50
Osmolalność zmierzona	340	mOsm/kg H ₂ O	284-294
Glukoza (osocze)	7,5	mmol/L	4,16-5,56
Krew			
pH	7,40		7,35-7,45
pCO ₂	30	mmHg	35-45
HCO ₃	18	mmol/L	20,5-27,5
NZ	-5	mmol/L	(-2,5)-(+2,5)
Mocz			
Glukoza	(-)		(-)

- a. Oceń dietę (kcal, skład).
- b. Sporządź kartę bilansu wodnego w dniach 13 – 15.

KARTA BILANSU WODNEGO

Podaż płynów (mL)	Dzień 13	Dzień 14	Dzień 15
Doustnie/dojelitowo			
Infuzje dożylnie			
Woda oksydacyjna			
Razem:			

Straty wody (mL)	Dzień 13	Dzień 14	Dzień 15
Mocz			
Oddech + skóra			
Kał			
Razem:			
Bilans wody ± (mL)			

Bilans wody 13-15 dzień.....

- c. Ile mocznika wydalaby pacjent, gdyby całe przyjmowane białko uległo przemianie do mocznika?
- d. Oceń stan RKZ i W – E. w dniu 16.

- e. Podaj przybliżony niedobór lub nadmiar wody.

Przypadek 6.3

Przyjęto pacjentkę, lat 52, z trwającymi przez 2 lata bólami brzucha, wielomoczem i polidypsją. Skarżyła się na wymioty i osłabienie. Pacjentka wychudzona, z objawami odwodnienia.

Radiologicznie – nadżerki kości czaszki.

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKI	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Ca	3,27	mmol/L	2,2-2,6
PO ₄	0,51	mmol/L	1,16-1,45
Albumina	40	g/L	35-50
Fosfataza alkaliczna	420	jm/L	39-117
Mocz			
Ca/kreatynina	0,7	mmol/L	0,08-0,75
Tm PO ₄ /FK	0,28		0,70-1,35

- a. Które z podanych wartości odbiegają od wartości referencyjnych?
-

- b. Określ wstępne rozpoznanie.

- c. Jakie badania dodatkowe należałoby wykonać dla potwierdzenia rozpoznania?

- d. Jakie mechanizmy leżą u podstaw opisanych objawów?.....

- e. Jakie inne przyczyny mogą prowadzić do takiego obrazu?

Przypadek 6.4

45-letnią kobietę, z utrzymującą się umiarkowanego stopnia niewydolnością nerek, przyjęto w celu oceny zmian kostnych. Nie stwierdzono klinicznych objawów zmian w kościach.

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKI	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Na	141	mmol/L	135-145
K	4,4	mmol/L	3,5-5
Ca	2,05	mmol/L	2,2-2,6
Albumina	39	g/L	35-50
PO ₄	1,63	mmol/L	1,16-1,45
Krew			
pH	7,36		7,35-7,45
pCO ₂	32	mmHg	35-45
HCO ₃	18	mmol/L	20,5-27,5
NZ	-6	mmol/L	(-2,5)-(+2,5)
Mocz			
cAMP nefrogenny	72	%	8-44

- a. Które z podanych wartości odbiegają od referencyjnych?.....

b. Opisz stan gospodarki Ca-Pi.

.....

c. Określ mechanizm prowadzący do obserwowanych zmian.

.....

.....

d. Jakie postępowanie należy wdrożyć, by je skorygować ?

.....

Przypadek 6.5

58-letni pacjent, od wielu lat odkrztusza płynną treść. Leczony diuretykami. Przy przyjęciu – sinica, płytki oddech i uogólnione obrzęki. Przed podaniem tlenu uzyskano następujące wyniki:

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKA	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Na	120	mmol/L	135-145
K	3,0	mmol/L	3,5-5,0
Cl	66	mmol/L	95-110
Mocznik	10,2	mmol/L	3,3-7,5
Kreatynina	170	μmol/L	k: 62-113, m: 44-106
Krew			
pH	7,36		7,35-7,45
pCO ₂	70	mmHg	35-45
pO ₂	30	mmHg	65-95
HCO ₃	39	mmol/L	20,5-27,5
NZ	+10	mmol/L	(-2,5)-(+2,5)

a. Opisz typ zaburzenia gospodarki kwasowo - zasadowej.

.....

b. Jaka jest przypuszczalna przyczyna tych zaburzeń?

.....

.....

c. Opisz zmiany w składzie elektrolitowym – wyjaśnij przyczyny.

.....

d. Podaj prawdopodobne rozpoznanie.....

Przypadek 6.6

Przyjęto 31-letniego mężczyznę, epileptyka tuż po napadzie *grand mal*.

Uzyskano następujące wyniki:

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKI	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Na	140	mmol/L	135-145
K	4,0	mmol/L	3,5-5,0
Cl	98	mmol/L	95-110
Krew			
pH	7,14		7,35-7,45
pCO ₂	46	mmHg	35-45
HCO ₃	17	mmol/L	20,5-27,5
NZ	-14	mmol/L	(-2,5)-(+2,5)
AZ	25	mmol/L	8-16

a. Określ rodzaj zaburzenia gospodarki kwasowo - zasadowej.....

.....

b. Czy pacjentowi należy podać NaHCO₃?

.....

c. Jak zmieni się poziom potasu po wyrównaniu kwasicy?

.....

.....

Przypadek 6.7

U 58-letniego mężczyzny z przewlekłym zapaleniem oskrzeli doszło do ciężkiej biegunki. Straty treści biegunkowej oceniono na 1 L/godz. Po przyjęciu uzyskano następujące wyniki:

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKI	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Na	138	mmol/L	135-145
K	3,8	mmol/L	3,5-5,0
Cl	115	mmol/L	95-110
Krew			
pH	6,97		
pCO ₂	40	mmHg	7,35-7,45
HCO ₃	9	mmol/L	35-45
NZ	-23	mmol/L	20,5-27,5
AZ	?		(-2,5)-(+2,5)

a. Określ rodzaj zaburzenia gospodarki kwasowo-zasadowej.

.....

b. Po podaniu tej ilości NaHCO₃ w ciągu 4 godz. HCO₃⁻ w osoczu wynosi nadal 9 mmol/L.

Co powoduje niemożność skorygowania kwasicy?.....

.....

c. Ile NaHCO₃ należy podać, aby zmniejszyć NZ do -10 mmol/L? (pacjent ważył przed biegunką 80 kg)

Częściowy niedobór zasad (do NZ – 10).....

Częściowy niedobór zasad(od -10 do 0).....

Całkowity niedobór zasad =

d. Na ile oceniasz zasoby potasu tego pacjenta?

.....

Przypadek 6. 8.

Pacjent, lat 23, rasa żółta, robotnik zagraniczny, przyjęty na KOR z obrzękami obu kończyn dolnych, obniżoną reakcją na bodźce czuciowe i uporczywymi wymiotami. Bez wywiadu obciążającego. Wypisany z rozpoznaniem ostrego zapalenia żołądka i jelit, bez badań laboratoryjnych. Po czterech dniach pacjent ponownie został przywieziony na KOR z powodu nasilającej się duszności; stracił przytomność w czasie badania. RR 60/40 mmHg, ciepłota ciała 33°C, migotanie przedsionków, znaczne obrzęki nóg, RTG klatki piersiowej bez zmian.

Wyniki badań laboratoryjnych:

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKI	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Krew			
pH	6,90		7,35-7,45
pCO ₂	19,0	mmHg	35-45
pO ₂	100	mmHg	65-95
HCO ₃	2,0	mmol/L	20,5-27,5
NZ	-25	mmol/L	(-2,5)-(+2,5)
AZ	30	mmol/L	8-16

a. Co może być przyczyną takiego obrazu klinicznego?.....

.....
 Pacjenta przeniesiono na OIOM. TK brzucha bez zmian – ślad płynu, lekki obrzęk trzustki, nadal nieprzytomny, wzrost ciśnienia w jamie brzusznej (wzdęcie, 50 mmHg). Laparotomia nie wykazała przyczyny choroby.

We krwi: salicylany (-), etanol (-), metanol (-), aceton (-), mleczan 20 mmol/L, anuria.

Pacjent zmarł 12 godzin po przyjęciu bez rozpoznania.

b. Jakiego rodzaju kwasicę miał pacjent?.....

c. Jakie mogły być jej przyczyny?.....

d. Jakie badania należałoby wykonać w celu wyjaśnienia przyczyny choroby?

.....

7. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ METABOLIZMU LIPOPROTEIN OSOCZA

Małgorzata Wróblewska

7.1. Lipidowe czynniki ryzyka w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego

W rozdziale 4 tomu I skryptu Diagnostyka Laboratoryjna przedstawiono podstawowe informacje na temat metabolizmu lipoprotein osocza i jego zaburzeń. Z uwagi na udowodniony związek pomiędzy poziomem cholesterolu (CH) we krwi i rozwojem chorób sercowo naczyniowych, badania laboratoryjne stężeń lipidów i lipoprotein służą do oceny ryzyka tych chorób, a także stanowią podstawę dla podejmowania decyzji o leczeniu mającym na celu redukcję lipidowych czynników ryzyka. Pomocne w praktyce lekarskiej wytyczne postępowania są formułowane przez ekspertów, w oparciu o wyniki badań klinicznych. Należy mieć świadomość, że zalecenia opracowywane przez poszczególne grupy ekspertów mogą się nieco różnić. W niniejszym skrypcie, jak również w Tomie I, przedstawiono wytyczne zawarte w III Raporcie Zespołu Ekspertów ds. Wykrywania, Oceny i Leczenia Hipercholesterolemii u Dorosłych (*Adult Treatment Panel III, ATP III*), opracowane przez ekspertów amerykańskiego Narodowego Programu Edukacji Cholesterolowej (NCEP). Trwają prace nad IV raportem, który zostanie zaprezentowany w 2012 roku i można oczekiwać, że niektóre z zaleceń ATP III zostaną zaktualizowane i uzupełnione. Z kolei z wytycznymi europejskimi dotyczącymi zapobiegania miażdżycowym chorobom sercowo-naczyniowym można zapoznać się w artykule opublikowanym w *European Heart Journal*, 2011; 32: 1769-1818. Opinie polskich ekspertów zamieszczane są np. na stronie internetowej Polskiego Forum Profilaktyki Układu Krążenia www.pfp.edu.pl.

Definicja choroby wieńcowej (ChW) wg ekspertów NCEP:

Objawowa choroba niedokrwienności serca, obejmująca zawał serca, stabilną i niestabilną dławicę piersiową, niedokrwienie mięśnia sercowego udokumentowane za pomocą badań nieinwazyjnych oraz przebiecie zabiegu rewaskularyzacji wieńcowej.

Badania kliniczne potwierdzają, że zmniejszenie ryzyka ChW można uzyskać zarówno w prewencji pierwotnej jak i wtórnej (tab. 7.1).

Tabela 7.1. Strategie zapobiegania ChW

	Prewencja pierwotna	Prewencja wtórna:
	Dotyczy osób bez rozwiniętej ChW	Dotyczy osób z ChW lub z równoważnikami ChW*
Cel	Zmniejszenie obciążeń związanych z miażdżycą tętnic wieńcowych w całym społeczeństwie	Redukcja całkowitej śmiertelności, śmiertelności z powodu NChS, incydentów wieńcowych, udarów
Strategia populacyjna	Utrzymanie stężenia LDL-CH możliwie najbliższej poziomowi optymalnego, bez konieczności badania lekarskiego poszczególnych osób. <ul style="list-style-type: none"> • Redukcja spożycia tłuszczu nasyconych i cholesterolu • Zwiększenie aktywności fizycznej • Kontrola wagi 	
Strategia kliniczna – na poziomie indywidualnego pacjenta	Dotyczy osób z podwyższonym stężeniem LDL-CH <ul style="list-style-type: none"> • Prewencja długoterminowa (przez całe życie) • Prewencja krótkoterminowa (≤10 lat) 	Intensywne leczenie zmniejszające stężenie LDL-CH (<100 mg/dL lub opcjonalnie <70 mg/dL u osób z niskim wyjściowym stężeniem LDL-CH)

*patrz tom I, rozdział 4

Wytyczne ekspertów NCEP przedstawione w raporcie ATP III skupione są przede wszystkim na postępowaniu w zakresie strategii klinicznej. Głównym celem leczenia obniżającego stężenie cholesterolu w osoczu jest frakcja lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Intensywność terapii obniżającej stężenie LDL-CH powinna być zintegrowana z całkowitym ryzykiem ChW u danej osoby.

W celu oceny lipidowego czynnika ryzyka eksperci NCEP zalecają badania od razu **całego profilu lipidowego** (CH, HDL-CH, LDL-CH, stężenie triacylogliceroli – TG), które powinny być wykonywane w surowicy krwi pobranej w warunkach standardowych, na czczo, ponieważ z reguły stężenie LDL-CH wyliczane jest na podstawie tzw. wzoru Friedewalda. Dla celów prewencji pierwotnej badanie powinno być wykonywane u wszystkich osób w wieku ≥ 20 lat, przynajmniej raz na 5 lat. Klasyfikację stężeń lipidów i lipoprotein wg ATP III przedstawiono w rozdziale 4 tomu I. U osób przyjmowanych do szpitala z powodu ostrych zespołów wieńcowych pomiar lipidów powinien być wykonany przy przyjęciu lub w ciągu 24 godzin. Jeżeli pomiar jest wykonywany przy przyjęciu, badania LDL-CH powinno być wykonywane za pomocą tzw. metod bezpośrednich (eliminuje to ewentualny wpływ obecności chylomikronów na wynik).

Raport ATP III wyróżnia trzy grupy czynników ryzyka ChW (tab.7.2).

Tabela 7.2. Grupy czynników ryzyka ChW

Główne czynniki ryzyka (inne niż LDL-CH)	Czynniki ryzyka związane ze stylem życia	Inne „nowe” czynniki ryzyka
Modyfikują docelowy poziom LDL-CH:	Bezpośrednie cele interwencji klinicznej ale nie wpływają na obniżenie docelowego poziomu LDL-CH:	Wpływają na rozwój CHW w różnym stopniu, u niektórych osób mogą wpływać na intensywność terapii obniżającej ryzyko:
<ul style="list-style-type: none"> • palenie papierosów • nadciśnienie (BP $\geq 140/90$ mmHg lub przyjmowanie leków obniżających ciśnienie) • niski HDL-CH (< 40 mg/dL) • obciążenie rodzinne • ChW u krewnych linii męskiej < 55 rokiem życia • ChW u krewnych linii żeńskiej < 65 rokiem życia • wiek (mężczyźni ≥ 45 lat; kobiety ≥ 55 lat) 	<ul style="list-style-type: none"> • otyłość (BMI ≥ 30) • niska aktywność fizyczna • dieta aterogenna 	<ul style="list-style-type: none"> • lipoproteina (a) • homocysteina • stan prozakrzepowy • czynniki prozapalne • upośledzona tolerancja glukozy

U osób, u których występują ≥ 2 czynniki ryzyka, należy ocenić całkowite ryzyko ChW. W raporcie ATP III przedstawiono prosty system oceny ryzyka ChW, oparty na sumowaniu głównych czynników ryzyka (ryc. 7.1).

Kategorie ryzyka ChW wyznaczające docelowe stężenia LDL-CH przedstawia tabela 7.3.

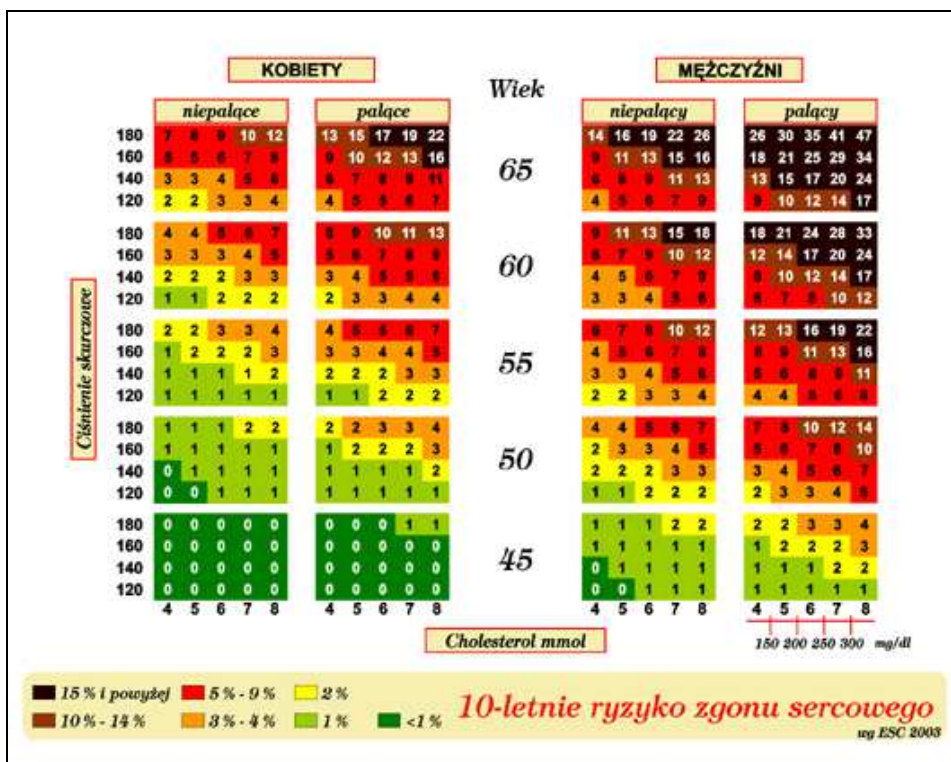
Tabela 7.3. Kategorie ryzyka wg ATP III

Kategoria ryzyka ChW	Prawdopodobieństwo wystąpienia ChW w ciągu najbliższych 10 lat
Ryzyko wysokie	$> 20\%$
Ryzyko umiarkowanie wysokie	$10-20\%$
Ryzyko umiarkowane	$< 10\%$

Mężczyźni						Kobiety					
Czynniki ryzyka	Ocena ryzyka, punkty					Czynniki ryzyka	Ocena ryzyka, punkty				
Grupy wiekowe, lata						Grupy wiekowe, lata					
20-34			-9			20-34			-7		
35-39			-4			35-39			-3		
40-44			0			40-44			0		
45-49			3			45-49			3		
50-54			6			50-54			6		
55-59			8			55-59			8		
60-64			10			60-64			10		
65-69			11			65-69			12		
70-74			12			70-74			14		
75-79			13			75-79			16		
Grupy wiekowe, lata						Grupy wiekowe, lata					
Całkowity cholesterol						Całkowity cholesterol					
mg/dL	20-39	40-49	50-59	60-69	70-79	mg/dL	20-39	40-49	50-59	60-69	70-79
< 161	0	0	0	0	0	< 161	0	0	0	0	0
161 - 200	4	3	2	1	0	161 - 200	4	3	2	1	1
201 - 240	7	5	3	1	0	201 - 240	8	6	4	2	1
241 - 280	9	6	4	2	1	241 - 280	11	8	5	3	2
> 280	11	8	5	3	1	> 280	13	10	7	4	2
Palenie papierosów						Palenie papierosów					
Nie	0	0	0	0	0	Nie	0	0	0	0	0
Tak	8	5	3	1	1	Tak	9	7	4	2	1
Cholesterol HDL						Cholesterol HDL					
mg/dL						mg/dL					
≥ 60			-1			≥ 60			-1		
50 - 59			0			50 - 59			0		
40 - 58			1			40 - 58			1		
< 40			2			< 40			2		
Ciśnienie krwi						Ciśnienie krwi					
skurczowe, mm Hg	nie leczone		leczone			skurczowe, mm Hg	nie leczone		leczone		
< 120	0		0			< 120	0		0		
120 - 129	0		1			120 - 129	1		3		
130 - 139	1		2			130 - 139	2		4		
140 - 159	1		2			140 - 159	3		5		
> 159	2		3			> 159	4		6		
Całkowita liczba punktów	10-letnie ryzyko, %					Całkowita liczba punktów	10-letnie ryzyko, %				
< 0	< 1					< 9	< 1				
0 - 4	1					9 - 12	1				
5 - 6	2					13 - 14	2				
7	3					15	3				
8	4					16	4				
9	5					17	5				
10	6					18	6				
11	8					19	8				
12	10					20	11				
13	12					21	14				
14	16		10-letnie ryzyko			22	17		10-letnie ryzyko		
15	20					23	22				
16	25		%			24	27		%		
> 16	> 29					> 24	> 29				

Ryc. 7.1. Model oceny ryzyka ChW w skali dziesięcioletniej w oparciu o dane Framingham Study (nie dotyczy pacjentów z ChW lub jej równoważnikami)

Docelowe stężenia LDL-CH w różnych grupach ryzyka przedstawiono w rozdziale 4 tom I (tab. 4.5).



Ryc.7.2. Karta ryzyka Score (nie dotyczy pacjentów z ChW lub jej równoważnikami)

Dla porównania przedstawiono też kartę Score (ryc. 7.2), która jest często używana do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego w populacji europejskiej, w tym także polskiej. Karta Score oparta jest na wynikach badań prospektywnych prowadzonych w Europie. Za próg wysokiego ryzyka przyjęto tu wartość $\geq 5\%$. Karta Score odnosi się tylko do grupy wiekowej 40-65 lat. Karta Score nie uwzględnia stężenia HDL-CH.

Eksperti NCEP w zaleceniach ATP III przedstawiają też zalecenia dotyczące wieloczynnikowej, leczniczej zmiany stylu życia, mającej na celu obniżenie stężenia LDL-CH (tab. 7.4).

Zalecane jest uwzględnienie w planie codziennych czynności aktywności fizycznej, pozwalającej na zużycie >200 kcal dziennie. W przypadku konieczności redukcji masy ciała, spadek wagi o 5 kg może spowodować obniżenie stężenia LDL-CH o 5-8%.

Tabela 7.4. Podstawowe składowe leczniczych zmian stylu życia

Składowa	Zalecenie	Przewidywane obniżenie LDL-CH
Redukcja spożycia cholesterolu	<200 mg/dzień	3-5%
Redukcja spożycia tłuszczu nasyconych	<7% całkowitej ilości kalorii	8-10%
Spożycie steroli roślinnych	2 g/dzień	6-15%
Spożycie błonnika rozpuszczalnego	10-25 g/dzień	3-5%

Przypadek 7. 1

U Andrzeja W., wiek 35 lat, pracującego jako projektant programów komputerowych, przypadkowe badanie wykazało stężenie cholesterolu w surowicy: 350 mg/dL.

1. Jak ocenisz uzyskany wynik stężenia CH w surowicy?
2. Czy wynik uzyskany w badaniu wykonanym bez zachowania standardowych warunków pobierania krwi ma znaczenie diagnostyczne?
3. Czy uzyskany wynik jest podstawą do zlecenia dodatkowych badań? Jakich? Jakie warunki powinny być zachowane podczas pobierania krwi?

Dwa kolejne badania profili lipidowego wykonane w odstępie miesiąca wykazały:

- stężenie CH: 350 i 360 mg/dL
- stężenie triacylogliceroli: 140 i 160 mg/dL
- stężenie HDL-CH: 40 i 45 mg/dL.

Zbadano też poziom glukozy na czczo: 95 mg/dL.

Wywiad: Pacjent przy wzroście 178 cm ważył 110 kg. Nie przyjmował żadnych leków. Palił około 15 papierosów dziennie. Pracował średnio około 9-10 godzin dziennie. Jego ciśnienie krwi wynosiło 170/100.

Brat Andrzeja, Piotr mający 30 lat, ma stężenie cholesterolu w granicach 300 mg/dL. Ojciec, obecnie w wieku 60 lat, przeszedł zawał mięśnia sercowego w wieku 52 lat i od tej pory znajduje się pod kontrolą kardiologa.

1. Zidentyfikuj czynniki ryzyka ChW u pacjenta.
2. Oceń ryzyko ChW pacjenta posługując się modelem oceny ryzyka wg badań Framingham.
3. Dlaczego wyliczone ryzyko może być niedoszacowane?

Przypadek 7.2

U Waldemara B., wiek 55 lat, pracującego w zakładach cukierniczych „Bałtyk” przypadkowe badanie wykazało we krwi stężenie TG 800 mg/dL i stężenie CH 280 mg/dL. Pacjent miał wagę 125 kg przy wzroście 183 cm.

1. Jak ocenisz uzyskane wyniki stężeń lipidów w surowicy?
2. Czy oba wyniki uzyskane w badaniach wykonanych bez zachowania standardowych warunków pobierania krwi mają znaczenie diagnostyczne?
3. Jakie dodatkowe badania zaproponujesz?

Kolejne badanie wykazało:

- stężenie CH: 270 mg/dL
- stężenie triacylogliceroli: 550 mg/dL
- stężenie HDL-CH: 23 mg/dL.

Stężenie glukozy na czczo: 145 mg/dL.

1. Jaką wstępną diagnozę zaproponujesz?
2. Jak ocenisz wyniki profilu lipidowego?
3. Czy poziom glukozy może mieć związek z występującą u pacjenta hiperlipidemią?
4. Jaki dodatkowy parametr z zakresu profilu lipidowego może być w tym przypadku pomocny w ocenie lipidowego czynnika ryzyka i monitorowaniu leczenia?

7.2. Zaburzenia metabolizmu lipoprotein nie ujęte w raporcie ATP III – opis przypadku nasilonej hipertriglicerydemii

Zalecenia ekspertów NCEP przedstawione w raporcie ATP III ukierunkowane są na działania mające na celu redukcję ryzyka ChW i nie obejmują wszystkich nieprawidłowości, jakie spotykamy w obrazie lipoprotein. Do najcięższych hiperlipidemii (HLP) należą zaburzenia przebiegające z bardzo wysokim stężeniem TG, któremu towarzyszą też wysokie stężenia CH. W takich wypadkach jest on jednak transportowany nie we frakcji LDL, lecz w lipoproteinach zawierających apo B (chylomikronach i lipoproteinach o bardzo niskiej gęstości – VLDL). Istotnym problemem klinicznym są bardzo wysokie poziomy TG (>1000 mg/dL), które często występują w przebiegu ostrego zapalenia trzustki (OZT). Warto zaznaczyć, że pierwotne hipertriglicerydemie mogą też stanowić bezpośrednią przyczynę rozwoju OZT.

Przypadek 7. 3.

Na KOR przywieziono mężczyznę, lat 41, skarżącego się na bóle brzucha (silne tępe bóle opasujące w nadbrzuszu, promieniujące do pleców i klatki piersiowej) i nudności. Ciepłota ciała 38,5°C, oddech płytki, przyspieszony, tętno 100/min, ciśnienie tętnicze 120/80 mm Hg.

W badaniach laboratoryjnych:

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Cholesterol (CH)	1539	mg/dL	120-200
Triglicerydy (TG)	13759	mg/dL	<150
HDL-cholesterol (HDL-CH)	–	mg/dL	>40
Sód	113	mEq/L	135-145
Potas	3,1	mEq/L	3,5-5,0
Aminotransferaza asparaginianowa	69	jm/L	5-43
Aminotransferaza alaninowa	76	jm/L	0-55
Amylaza	127	jm/L	25-125
Amylaza w moczu	3821	jm/L	<270
Białko C-reaktywne	39	mg/L	<5
Bilirubina całkowita	1,1	mg/dL	0,2-1,2
Kreatynina	0,76	mg/dL	0,7-1,3
Wskaźnik filtracji kłębuszkowej	>60	mL/min/1,73 m ²	>60
Krwinki białe	15,4	G/L	4,5-11,0

1. Jak zdefiniujesz zaburzenia lipidowe? Czy możesz wskazać fenotyp HLP? Dlaczego nie podano wyniku HDL-cholesterolu?
2. Jak ocenisz stężenia sodu i potasu? Czy mogą mieć one związek ze stężeniami lipidów? Co należy wziąć pod uwagę oceniając stężenie sodu?
3. Jak skomentujesz wyniki pomiarów amylazy w moczu i w surowicy? Jaką wstępną diagnozę proponujesz?
4. Czy wykonane badania laboratoryjne wskazują/wykluczają którąś ze znanych przyczyn przypuszczalnej choroby? Jakie inne badania można wykonać?
5. Czy istnieje związek pomiędzy wstępnym rozpoznaniem i HLP?

Ad. 1. Bardzo ciężka, mieszana HLP. Stosunek CH/TG $\leq 0,1$ jest patognomoniczny dla Ten typ zaburzeń metabolizmu lipoprotein ma niemal wyłącznie charakter pierwotny i jest spowodowany brakiem aktywnej lipazy lipoproteinowej (LPL) (deficyt enzymu lub jego aktywatora – apo C-II). Przy tak wysokim stężeniu TG nie ma technicznych możliwości, żeby zmierzyć dokładnie stężenie HDL-CH. Z reguły w HLP typu I stężenia HDL-CH są bardzo niskie.

Ad 2. W tym konkretnym laboratorium pomiar sodu jest dokonywany rutynowo za pomocą elektrod jonoselektywnych. Trzeba jednak pamiętać, że tylko w części stosowanych w laboratoriach autoanalyzerów pomiar następuje bezpośrednio w próbce surowicy – jest on wówczas najdokładniejszy i nie wpływa na niego ilość lipidów/białek obecnych w osoczu. W wielu autoanalyzerach pomiar stężenia elektrolitów dokonywany jest w próbce surowicy rozcieńczonej uprzednio buforem (tzw. metoda niebezpośrednia). Wówczas większy niż normalnie poziom lipidów/białek sprawia, że pojawia się efekt tzw. pozornej hiponatremii (w próbce surowicy pobranej do rozcieńczenia istotną objętość zajmują lipidy/białka, natomiast nie jest to uwzględnione podczas przeliczania ilości jonów sodowych na jednostkę objętości osocza). Dlatego w sytuacji nasilonej lipemii/hiperproteinemii przy ocenie stężenia sodu należy wziąć pod uwagę metodę pomiaru jonów sodowych.

Po zleceniu wykonania badania elektrolitów metodą bezpośrednią uzyskano wyniki:

Sód 140 mEq/L

Potas 4,1 mEq/L.

Ad. 3. Wyniki pomiarów aktywności amylazy wskazują na..... Amylaza jest enzymem o m cz. ~ 60 kD i jest to jedyny enzym osoczowy jaki ulega w kłębuszkach nerkowych i normalnie występuje w Wysoka aktywność amylazy w odzwierciedla wzrost jej poziomu w

Ad. 4. Jedną z najczęstszych przyczyn zapalenia trzustki jest kamica dróg żółciowych. Jednak poziom i aktywnośćnie wskazują na żółciopochodne zapalenie trzustki. Drugą najczęstszą przyczyną OZT jest, ale na podstawie wykonanych wstępnie badań laboratoryjnych nie można tego stwierdzić.

Ad 5. Hipertriglicerydemia, o różnym stopniu nasilenia; jest szczególnie częsta w poalkoholowym OZT. Najczęściej występuje wówczas hiperlipidemia typu IV lub V. HLP typu V powinna być różnicowana z HLP typu I (ryc. 7.3). W HLP typu V pierwotnym zaburzeniem jest wątrobowa nadprodukcja VLDL, które konkurują z chylomikronami o dostęp do LPL, co w konsekwencji skutkuje także kumulacją chylomikronów. W tym konkretnym wypadku należy wziąć pod uwagę, że hiperlipidemia mogła być bezpośrednią przyczyną OZT. Ocenia się, że taka sytuacja ma miejsce w 1,3–3,8% przypadków OZT. Nawracające zapalenia trzustki, wywołane przez....., są najgroźniejszym powikłaniem HLP typu I. Czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia bardzo wysokiej chylomikronemii o osób z deficytem LPL, a także u osób z innymi postaciami hipertiglicerydemii, są duża ilość tłuszczu w diecie i nadmierne spożywanie alkoholu.

HLP typ IChylomikronemia na czczo

Tg ↑↑↑ (> 10.000 mg/dl),
Ch ↑
brak LPL/deficyt apo C-II.

- ksantomatozy,
- *lipemia retinalis*,
- hepatosplenomegalia.

ChC/Tg ≤ 0,1

HLP typ VChylomikronemia i VLDL↑

TG ↑↑↑ (do 7000 mg/dl),
Ch↑↑ (do 1500 mg/dl)

- *ksantomatozy*,
- *lipemia retinalis*,
- *hepatosplenomegalia*

Ryc. 7.3. Fenotypy hiperlipidemii z bardzo wysokimi poziomami TG

Badanie USG wykazało obrzęk trzustki. Pacjent został przyjęty do Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii. Badania laboratoryjne w kolejnym dniu wykazały:

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Glukoza	119	mg/dL	60-99
Cholesterol	980	mg/dL	120-200
Triglicerydy	5500	mg/dL	<150
HDL-cholesterol	8	mg/dL	>40
Sód	135	mEq/L	135-145
Potas	3,6	mEq/L	3,5-5,0
Aminotransferaza asparaginianowa	44	jm/L	5-43
Aminotransferaza alaninowa	48	jm/L	0-55
Amylaza	234	jm/L	25-125
Lipaza trzustkowa	640	jm/L	8-78
Białko C-reaktywne	235,9	mg/L	<5
Bilirubina całkowita	1,2	mg/dL	0,2-1,2
Kreatynina	1,03	mg/dL	0,7-1,3
Wskaźnik filtracji kłębuszkowej	>60	mL/min/1,73 m ²	>60
Białko całkowite	60	g/dL	64-83
Albumina	34	g/dL	35-50
Gamma-glutamylotranspeptydaza	329	jm/L	8-61
Glukoza	109	mg/dL	60-99

Następnego dnia badania laboratoryjne wykazały:

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Cholesterol	636	mg/dL	120-200
Triglicerydy	2028	mg/dL	<150
Aminotransferaza asparaginianowa	49	jm/L	5-43
Aminotransferaza alaninowa	48	jm/L	0-55
Amylaza w surowicy	72	jm/L	25-125
Amylaza w moczu	1775	jm/L	<270
Lipaza trzustkowa	240	jm/L	8-78

1. Skomentuj gwałtowny spadek stężenia TG.
2. Skomentuj wynik aktywności lipazy trzustkowej?
3. Na co może wskazywać wynik GGTP?

Ad. 1. Gwałtowny spadek stężenia TG to efekt..... – brak dostawy chylomikronów, co wpływa też na spadek syntezy w wątrobie.

Ad. 2. Przy czułości amylazy w stosunku do OZT od 70 do 100%, jej swoistość ocenia się na 20 do 60% (w zależności od rodzaju populacji). Aktywność lipazy trzustkowej cechuje się większą swoistością (80 – 100%). Aktywność lipazy może pozostać podwyższona nawet po.....dniami od incydentu OZT.

Ad. 3. Wysoka aktywność GGTP, przy prawidłowym poziomie bilirubiny, wskazuje na prawdopodobne.....przez pacjenta.

Po 7 dniach pobytu na oddziale wyniki badań laboratoryjnych wykazały:

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Cholesterol	267	mg/dL	120-200
Triglicerydy	569	mg/dL	<150
Sód	138	mEq/L	135-145
Potas	4,3	mEq/L	3,5-5,0
Białko C-reaktywne	238	mg/l	<5
Bilirubina całkowita	0,6	mg/dL	0,2-1,2
Kreatynina	0,74	mg/dL	0,7-1,3
Wskaźnik filtracji kłębuszkowej	>60	mL/min/1,73 m ²	>60
Aminotransferaza asparaginianowa	26	jm/L	5-43
Aminotransferaza alaninowa	22	jm/L	0-55
Amylaza w surowicy	57	jm/L	25-125
Amylaza w moczu	1324	jm/L	<270
Gamma-glutamylotranspeptydaza	124	jm/L	8-61

Po kolejnych 5 dniach pobytu na oddziale wyniki badań laboratoryjnych wykazały dalszą normalizację stanu pacjenta:

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Glukoza	94	mg/dL	60-99
Cholesterol	227	mg/dL	120-200
Triglicerydy	529	mg/dL	<150
Sód	138	mEq/L	135-145
Potas	4,0	mEq/L	3,5-5,0
Białko C-reaktywne	84,2	mg/L	<5
Bilirubina całkowita	0,3	mg/dL	0,2-1,2
Kreatynina	0,81	mg/dL	0,7-1,3
Wskaźnik filtracji kłębuszkowej	>60	mL/min/1,73 m ²	>60
Aminotransferaza asparaginianowa	20	jm/L	5-43
Aminotransferaza alaninowa	16	jm/L	0-55
Amylaza w surowicy	64	jm/L	25-125
Amylaza w moczu	859	jm/L	<270
Lipaza trzustkowa	97	jm/L	8-78
Gamma-glutamylotranspeptydaza	73	jm/L	8-61

Jak skomentujesz utrzymywanie się podwyższonego poziomu stężeń CH i TG u chorego?

7.3. Homozygotyczna postać rodzinnej hipercholesterolemii

Przypadek 7. 4.

Badania laboratoryjne w zakresie profilu lipidowego wykonane we krwi pobranej od pięcioletniego chłopca z rozsianymi kępkami żółtymi (ryc. 7.4) wykazały:



Ryc.7.4. Wyprzeniowate kęпки żółte w obrębie nóg i guzowate kęпки żółte w okolicy pośladków

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Cholesterol	742	mg/dL	120-200
Triglicerydy	155	mg/dL	<150
HDL-cholesterol	31	mg/dL	>40
LDL-cholesterol	680	mg/dL	<100
Apo B	443	mg/dL	56-162

Wyniki badań poziomu glukozy, TSH, FT4, kwasu moczowego a także badania wchodzące w zakres profilu wątrobowego i nerkowego były prawidłowe.

1. Na co wskazują wyniki badań laboratoryjnych oraz zmiany skórne?
2. Jaką wartość ma pomiar stężenia apolipoproteiny B?
3. Jakie badania laboratoryjne należy przeprowadzić w celu potwierdzenia przypuszczalnego rozpoznania?

Ad. 1. Zarówno wyniki badań laboratoryjnych (CH>600) jaki i zmiany skórne, sugerują możliwość postaci, rodzinnej..... (HFHC). Praktycznie nie spotyka się wtórnej, izolowanej hipercholesterolemii z tak wysokimi poziomami CH. Pomiar apo B nie jest warunkiem rozpoznania HFHC; ale może być wykonany jako niezależne badanie, potwierdzające występowanie.....

Ad. 2. Najprostszym sposobem potwierdzenia HFHC są wyniki badań z zakresu profilu lipidowego u rodziców i rodzeństwa.

Wyniki badań wykonane we krwi pobranej od rodziców:

Matka

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Cholesterol	308	mg/dL	120-200
Triglicerydy	122	mg/dL	<150
HDL-cholesterol	61	mg/dL	>40
LDL-cholesterol	222	mg/dL	<100

Ojciec

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Cholesterol	281	mg/dL	120-200
Triglicerydy	131	mg/dL	<150
HDL-cholesterol	45	mg/dL	>40
LDL-cholesterol	210	mg/dL	<100

Siostra (wiek 2 miesiące)

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Cholesterol	161	mg/dL	120-200
Triglicerydy	40	mg/dL	<150
HDL-cholesterol	56	mg/dL	>40
LDL-cholesterol	97	mg/dL	<100

Jak należy ocenić parametry lipidowe u rodziców i siostry chłopca?

Postać homozygotyczna rodzinnej hipercholesterolemii występuje z częstością ~1:1.000.000, natomiast postać heterozygotyczna z częstością ~ 1:500 (w populacji kaukaskiej). U rdzennych mieszkańców Afryki Płd. częstość postaci heterozygotycznej wynosi 1:80.

Główną przyczyną rodzinnej hipercholesterolemii (85% przypadków) są mutacje, których dotychczas opisano ponad 1000. Drugą przyczyną (około 10% przypadków) są mutacje w genie apo B (ligand receptora LDL). Hipercholesterolemia związana z defektami apo B jest mniej nasilona, niż w przypadku mutacji receptora LDL. Trzecią przyczyną rodzinnej hipercholesterolemii są mutacje w genie konwertazy białkowej (PCSK9) zaangażowanej w procesy degradacji receptora LDL.

U obojga rodziców chłopca występuje, co potwierdza możliwość wystąpienia postaci u dziecka. Stężenia lipidów i lipoprotein u siostry chłopca są w tym momencie W HFHC poziomy CH są bardzo wysokie od pierwszych dni życia, co pozwala na z dużym prawdopodobieństwem HFHC u siostry chłopca.

Dostępne obecnie leczenie farmakologiczne stosowane w celu obniżenia LDL-CH jest mało skuteczne w HFHC, natomiast ryzyko miażdżycy naczyń wieńcowych i śmierci z powodu zawału serca przed 30 rokiem życia jest bardzo wysokie. Najlepsze efekty daje ortotropowe przeszczepienie wątroby, ale jest to jednocześnie najbardziej inwazyjna forma terapii.

Poniżej przedstawiono przykład normalizacji poziomu cholesterolu u 11-letniego chłopca z rozpoznaniem postaci homozygotycznej hipercholesterolemii po ortotropowym przeszczepie wątroby (dawcą lewego płatu wątroby była siostra matki chłopca)

Wyniki badań laboratoryjnych przed i po zabiegu:

Badanie	Dzień						Jednostki	Wartości referencyjne
	-6	0	1	2	4	5		
CH	895	-	436	138	165	145	mg/dL	120-200
TG	195	-	43	41	62	77	mg/dL	<150
Glukoza	105	185	174	159	102	164	mg/dL	60-99
Kreatynina	1,6	0,8	0,8	0,8	1,0	1,6	mg/dL	0,7-1,3
Hemoglobina	12,6	12,2	13,2	11,5	10,4	9,7	g/dL	10,2-14,8
AST	27	3925	2265	810	263	182	jm/L	5-43
ALT	20	5395	4205	2585	1074	170	jm/L	0-55

1. Jak skomentujesz zmiany stężenia LDL-CH we krwi chłopca? Czym są one spowodowane?

Ad. 1. Decydujący wpływ na stężenie LDL-CH we krwi ma
Gwałtowny spadek stężenia LDL-CH świadczy o przez przeszczepiony płuć wątroby.

8. BIOCHEMICZNE MARKERY ZAWAŁU SERCA

Małgorzata Wróblewska

8.1. Uniwersalna definicja zawału

Biomarkery stosowane w diagnostyce zawału mięśnia sercowego przedstawiono w rozdziale 3 tomu I skryptu Diagnostyka Laboratoryjna. Niniejszy rozdział skupia się głównie na praktycznych aspektach oznaczania troponin sercowych (cTn) jako preferowanych obecnie biomarkerów zawału serca.

W 2007 roku eksperci European Society of Cardiology, American College of Cardiology, American Heart Association i World Heart Federation uzgodnili uniwersalną definicję zawału serca:

Zawał serca to martwica mięśnia sercowego w sytuacji klinicznej odpowiadającej niedokrwieniu

Zawał mięśnia sercowego można rozpoznać w każdej z następujących sytuacji:

- ✓ Wzrost stężenia biomarkera sercowego (najlepiej troponiny) z przynajmniej jedną wartością przekraczającą 99. centyl zakresu referencyjnego + co najmniej jeden z poniższych dowodów niedokrwienia mięśnia sercowego:
 - objawy podmiotowe niedokrwienia mięśnia sercowego,
 - zmiany w EKG (nowe zmiany ST-T, nowy LBBB, rozwój patologicznych załamków Q),
 - dowody w badaniach obrazowych, np. nowy ubytek żywego mięśnia sercowego.
 - ✓ Nagły zgon sercowy z objawami sugerującymi niedokrwienie mięśnia sercowego.
 - ✓ Podczas przeszłonnych interwencji w układzie tętnic wieńcowych – kiedy stężenie biomarkera przekracza 3-krotnie wartość 99. centyla zakresu ref., u chorych z prawidłowymi stężeniami wyjściowymi troponin.
 - ✓ W przypadku pomostowania tętnic wieńcowych – kiedy stężenie biomarkera przekracza 5-krotnie wartość 99. centyla zakresu ref.+ inne dowody niedokrwienia, u chorych z prawidłowymi stężeniami wyjściowymi troponin.
 - ✓ Stwierdzenie świeżego zawału serca w badaniu sekcyjnym.
- Preferowanym markerem biochemicznym zawału serca są troponiny sercowe (cTnI lub cTnT). Cechuje je niemal absolutna (blisko 100%) swoistość dla uszkodzenia mięśnia sercowego, co jednak nie oznacza 100% swoistości dla zawału. Inne możliwe przyczyny wzrostu stężenia troponin, to np.:
- leki kardiotoksyczne
 - ostra i ciężka zastoinowa niewydolność serca

- zatorowość płucna –przeciążenie prawej komory
- kardiomiopatia przerostowa
- zapalenie osierdzia
- zapalenie mięśnia sercowego
- posocznica i (lub) wstrząs
- urazy serca, m.in. podczas zabiegów kardiochirurgicznych, angioplastyki wieńcowej, ablacji, kardiowersji
- przewlekła niewydolność nerek

Należy podkreślić, że dla rozpoznania świeżego zawału serca konieczne jest wykrycie narastania lub opadania stężenia troponiny. Nie jest to bezwzględny warunkiem, kiedy pacjent trafia do szpitala po 24 godz. od wystąpienia objawów podmiotowych. O ile swoistość biomarkerów sercowych nie zależy od czasu wykonywania badania, to ich czułość diagnostyczna wzrasta wraz z upływem czasu od chwili dokonania zawału. Pełną czułość (90-100%) pomiary troponin osiągają dopiero pomiędzy 6 a 12 godz. od chwili dokonania zawału. Dlatego, o ile można potwierdzić zawał serca na podstawie pojedynczego oznaczenia stężenia troponin (przekraczającego przyjętą dla danego testu diagnostycznego wartość decyzyjną), to wykluczenie zawału wymaga kilkukrotnego pomiaru stężenia troponin. Próbkę krwi do oznaczenia troponin należy pobrać wyjściowo i po upływie 6-9 godz. W przypadku, kiedy podejrzenie zawału jest duże, a wyniki oznaczeń są prawidłowe, należy wykonać dodatkowe badania pomiędzy 12 a 24 godz.

Badaniem alternatywnym dla troponin jest pomiar ilości CK-MB (wyrażanej w jednostkach masy białka enzymatycznego – tzw. CKMB masa). Za zwiększone stężenie CKMB masy przyjmuje się wartości przekraczające 99. centyl zakresu referencyjnego u zdrowych. Wzrost CK-MB masy powinien przekraczać poziom decyzyjny dla zawału w dwóch kolejnych próbkach (z uwagi na dużą zmienność) lub osiągnąć 2-krotną wartość poziomu decyzyjnego, w ciągu pierwszych godzin od wystąpienia bólu zawałowego. Poziom CK-MB musi najpierw wzrosnąć, a potem obniżyć się. Utrzymujące się bez zmian zwiększone wartości CK-MB prawie nigdy nie są wynikiem zawału serca.

8.2. Biomarkery w wykrywaniu dorzutu zawału

Tradycyjnym biomarkerem dorzutu zawału jest CKMB masa. Wynika to ze stosunkowo szybkiego obniżania się poziomu CKMB masy po wystąpieniu zawału (powrót do wartości prawidłowych następuje po 72 do 96 godzin). Ponowny wzrost stężenia CKMB masy po tym czasie może świadczyć o dorzucie zawału. Wykazano jednakże, że przydatność troponin do wykrywania dorzutu zawału jest podobna. U chorych z podejrzeniem dorzutu należy natychmiast zmierzyć stężenie troponiny i wykonać kolejne badanie po upływie 3-6 godzin. Wzrost stężenia troponiny o >20% w tym przedziale czasowym

świadczy o dorzucie zawału (stężenie troponiny musi być także >99. centyla zakresu referencyjnego).

8.3. Problemy analityczne pomiarów cTn

Tabela 8.1. Niektóre czynniki przedanalityczne i analityczne wpływające na pomiary cTn

	Troponina T	Troponina I
występowanie	- mięsień sercowy - mięśnie szkieletowe płodu	- mięsień sercowy (we krwi około 50% cTnI występuje w postaci kompleksu z troponiną C)
zależność od wieku i płci	tak	tak
wzrost stężenia niezwiązany z uszkodzeniem mięśnia sercowego	- u osób z mięśniami szkieletowymi w fazie regeneracji - u osób z PNN*	- u chorych z PNN
EDTA	wpływa na tworzenie kompleksów troponin z przeciwciałami	
hemoliza	stężenie ↓	stężenie ↑
standaryzacja oznaczeń	tak (wszystkie testy pochodzą od jednego producenta)	nie (wielu producentów testów)

*PNN – przewlekła niewydolność nerek. U chorych z PNN wzrost stężenia cTnT utrzymuje się przewlekłe. U chorych ze schyłkową PNN wzrost cTnT koreluje z ryzykiem zgonu.

Troponiny sercowe można oznaczać zarówno w surowicy, jak i w osoczu, a nawet we krwi pełnej (w tym ostatnim wypadku są to testy półilościowe). Współczynnik zmienności (CV) powinien być <10% na poziomie 99. centyla zakresu referencyjnego. Obie troponiny cTnT i cTnI cechują się podobną przydatnością w diagnostyce zawału.

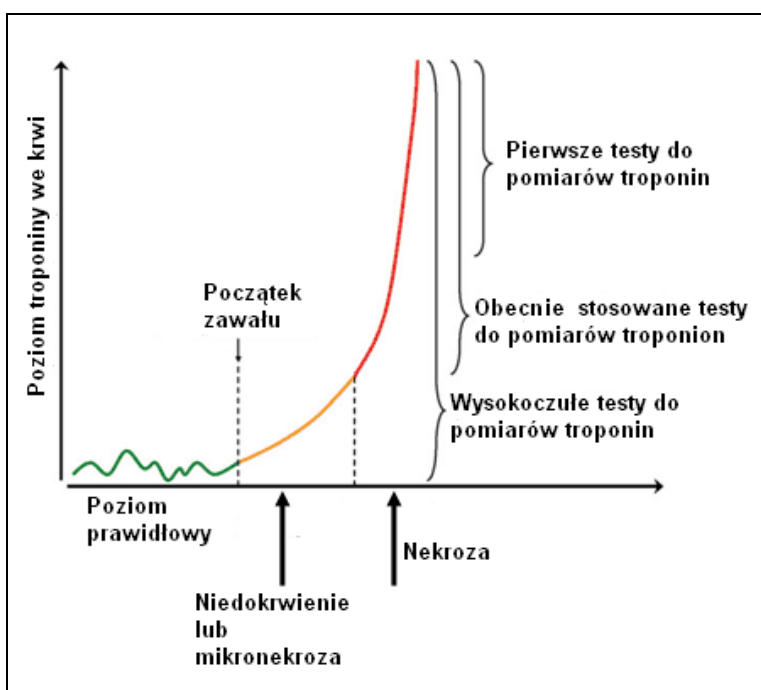
Jak pokazuje tabela 8.1 na wyniki oznaczeń troponin może wpływać wiele czynników. Pomiary stężeń troponin sercowych wykonywane są przy użyciu metod immunochemicznych, z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych. To zapewnia bardzo wysoką swoistość analityczną, ale różnorodność stosowanych przeciwciał generuje poważny problem, jakim jest brak standaryzacji oznaczeń troponin. Nie tylko nie należy porównywać ze sobą wyników stężeń obu troponin (cTnT i cTnI), ale także wyniki troponiny I nie są porównywalne, jeżeli nie zostały uzyskane za pomocą tych samych metod analitycznych. Wyniki pomiarów troponiny T mogą być porównywalne, ale tylko jeżeli zostały wykonane za pomocą testów tej samej generacji. Wyniki badań należy zawsze oceniać w kontekście klinicznym, odnosząc je do podanego przez laboratorium

zakresu referencyjnego i punktu odcięcia dla zawału. Tabela 8.2 przedstawia charakterystykę analityczną niektórych metod oznaczania troponin.

Tabela 8.2. Charakterystyka analityczna niektórych metod oznaczania troponin

Test	cTn	Próg detekcji* [µg/L]	99 centyl [µg/L]	CV na poziomie 99 centyla [%]
Abbott Architect	cTnI	<0,01	0,028	15,0
Abbott AxSYM ADV	cTnI	0,02	0,04	15,0
Rdiometer AQT90	cTnI	0,0095	0,023	17,7
Siemens Centaur Ultra	cTnI	0,006	0,04	10,0
Roche E170	cTnT	0,01	<0,01	18,0
Roche Cardiac Reader	cTnT	<0,05	<0,05	brak danych

*Najmniejsza ilość, jaka może zostać zmierzona przy całkowitym błędzie akceptowalnym z klinicznego punktu widzenia

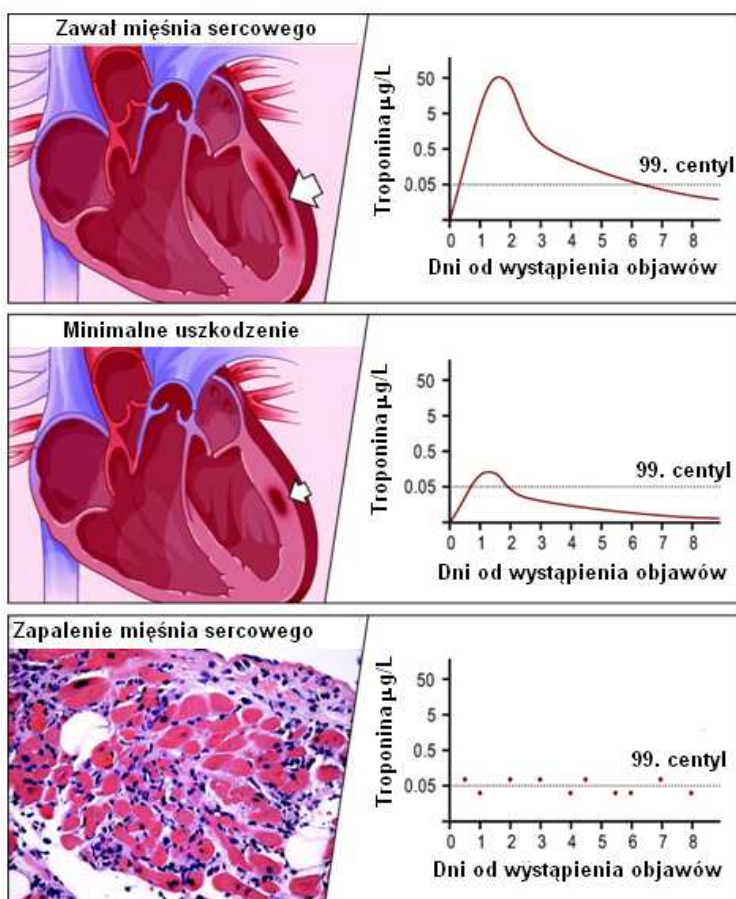


Ryc. 8.1. Różnicowanie ostrego i przewlekłego uszkodzenia mięśnia sercowego

Obecnie nie rekomenduje się pomiarów stężenia troponiny u chorych bez objawów ostrego zespołu wieńcowego. Należy jednak zaznaczyć, że w ostatnich latach (od 2009 r.) do badań troponin wprowadzono nowe generacje wysokoczulłych testów (ryc. 8.1), pozwalających na pomiary, których wyniki

wyrażane są w ng/L. Stosowanie tej generacji testów zwiększa czułość diagnostyczną zawału w momencie prezentacji pacjenta w szpitalu z ~ 70 do ~ 90%, ale jednocześnie obniża swoistość kliniczną dla zawału z 97 do 90%. Najnowsze badania kliniczne wykazują, że wprowadzenie testów wysokoczulych może w najbliższych latach rozszerzyć przydatność pomiarów troponin do celów oceny ryzyka zawału/zgonu sercowo-naczyniowego u osób z grupy wysokiego ryzyka.

Już bardzo niewielkie uszkodzenie mięśnia sercowego prowadzi do pojawienia się troponin we krwi. Pomiaru cTn za pomocą testów o wysokiej czułości rodzi konieczność różnicowania pomiędzy ostrym i przewlekłym uszkodzeniem mięśnia sercowego.



Ryc. 8.2. Uwalnianie troponin po uszkodzeniu mięśnia sercowego

Jak ilustruje ryc. 8.2 w wyniku zawału serca poziom troponiny znacznie przewyższa poziom 99. centyla zakresu referencyjnego, a jego spadek następuje w ciągu wielu dni. W przypadku minimalnego uszkodzenia (tzw.

„mikrozawału”) poziom troponiny może przekroczyć poziom 99. centyla zakresu referencyjnego, ale jego spadek następuje po krótkim okresie czasu (1-2 doby). W stanach zapalnych stężenie troponiny może utrzymywać się bez zmian na poziomie nieco powyżej 99. centyla zakresu referencyjnego przez wiele dni.

Każde laboratorium powinno ustanowić swoją własną wartość diagnostyczną punktu odcięcia (*cut off*), która będzie reprezentatywna dla danej grupy pacjentów oraz będzie odzwierciedlać obowiązującą praktykę lekarską jak i kryteria rozpoznawania świeżego zawału mięśnia sercowego stosowane w danym ośrodku.

8.4. Omówienie przypadków

Przypadek 8.1

Mężczyzna, lat 55, BMI>30, zgłosił się na KOR skarżąc się na ostry ból w klatce piersiowej. Powłoki blade, twarz spocona. W wywiadzie choroba refluksowa żołądkowo-przełykowa. EKG: tachykardia zatokowa.

Pomiary poziomu troponiny:

- przy przyjęciu: 0,09 µg/L,
- po 6 godzinach: 4,41 µg/L,
- po 12 godzinach: 19,62 µg/L,
- po 48 godzinach: 16,3 µg/L.

99. centyl zakresu referencyjnego, dla zastosowanej metody pomiaru: 0,04 µg/L.

Zmiany stężenia troponiny są Można to stwierdzić na podstawie badania wykonanego....., ponieważ stężenie troponiny przekraczai występują także..... Badanie wykonane po 48 godz. wykazujespadek stężenia troponin u chorego po

Przypadek 8.2

Kobieta, lat 80, zgłosiła się na KOR, uskarżając się na dyskomfort w klatce piersiowej. W wywiadzie przebyty rak piersi. EKG: prawidłowy rytm zatokowy.

Pomiary poziomu troponiny:

- przy przyjęciu: 0,07 µg/L,
- po 9 godzinach: 0,06 µg/L,
- po 20 godzinach: 0,09 µg/L.

99. centyl zakresu referencyjnego, dla zastosowanej metody pomiaru: 0,04 µg/L.

Poziom troponiny jest, co wskazuje na Dynamika zmian stężenia troponiny w czasie, przy braku wskazuje, że u chorej....., natomiast należy wziąć pod uwagę przyczynę uszkodzenia serca, np.

Przypadek 8.3

Mężczyzna, lat 79, z cukrzycą typu I, osłabiony, z zaburzeniami świadomości, został przywieziony na KOR. Stwierdzono poziom glukozy we krwi: 25 mg/dL. Zdiagnozowano reakcję insulinową, pacjent został zwolniony do domu.

Następnego dnia, pacjent ponownie został przywieziony na KOR, z podobnymi objawami. Tętno 100/min, częstość oddechów 12/min, ciśnienie krwi 110/80. EKG: migotanie przedsionków, cechy przebytego zawału przegrody międzykomorowej.

Badania poziomu troponiny:

- przy przyjęciu (godz. 22.00): 7,2 µg/L,
- po 9 godzinach: 5,6 µg/L,
- po 36 godzinach: 2,4 µg/L,
- po 72 godzinach: 1,9 µg/L.

99. centyl zakresu referencyjnego, dla zastosowanej metody pomiaru: 0,5 µg/L.

Badanie poziomu troponiny potwierdza Dynamika zmian poziomu troponiny we krwi wskazuje na fazęstężenia troponiny, co pozwala na przypuszczenie, żeokoło wcześniej. Podwyższone stężenie troponiny po zawale utrzymuje się

Przypadek 8.4

79-letni mężczyzna, z cukrzycą typu I został przywieziony na KOR, po tym jak upadł i doznał złamania szyjki kości udowej. Badania EKG wykazały przebyty zawał serca i zmiany niedokrwienne przedniej ściany serca. Pacjent został przyjęty na oddział chirurgiczny, gdzie przeszedł operację zespolenia kości. Hospitalizacja trwała w sumie 46 dni. Po zabiegu wystąpiły u chorego zaburzenia rytmu serca (bradykardia). Wykonywane regularnie pomiary troponin wykazały:

Dzień	Godzina badania	Stężenie troponiny [$\mu\text{g/L}$]
1	21.32	<0,5
2	05.40	<0,5
	14.00	<0,5
4	10.25	1,5
	15.43	1,6
5	06.00	1,2
6	05.18	0,7
	12.25	9,5
	15.54	13,0
	23.00	16,4
7	05.00	10,3
	16.11	10,3

99. centyl zakresu referencyjnego, dla zastosowanej metody pomiaru: 0,5 $\mu\text{g/L}$.

Poziomy troponiny mierzono, ponieważ wywiad
a ponadto występowały Dynamika wzrostu stężenia
troponiny w 4. dniu pokazuje..... ale nie potwierdza
..... Nagły wzrost stężenia troponiny w 6. dniu wskazuje na
.....

9. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA WYBRANYCH ZESPOŁÓW ENDOKRYNOLOGICZNYCH

Andrzej Szutowicz, Agnieszka Jankowska-Kulawy, Dorota Bizon-Zygmańska

Uwaga: Prosimy o wydrukowanie podrozdziału 9.2 oraz przyniesienie na zajęcia kalkulatorów.

9.1. Epidemiologia zaburzeń endokrynologicznych

Hormony są związkami sygnałowymi przenoszonymi drogą krwi, które utrzymują homeostazę wewnętrznego środowiska organizmu poprzez specyficzne receptory błonowe lub jądrowe dostosowując je do zmian środowiska zewnętrznego (temperatura zewnętrzna, dostępność pożywienia, prężność O₂ w atmosferze) i wewnętrznego (rozwój ontogenetyczny, ciąża/karmienie, spadek ciśnienia, sen, różnorodnie zmiany patologiczne). Stąd częstość występowania pierwotnych chorób układu endokrynnego, jak również wtórnych zaburzeń endokrynologicznych jest duża, a ich obraz kliniczny różnorodny (tabela 9.1).

Tabela 9.1. Częstość występowania różnych zespołów endokrynologicznych

Choroba/zespół	Częstość występowania	Zachorowalność
Cukrzyca typu 2	wiek>20 lat – 6,5% wiek>70 lat – 24,2%	wiek 40-55 lat, m 5,8%, k 3,7%/8 lat (Framingham)
Cukrzyca typu 1	dzieci; m 0,09%; k 0,04%	-
Hipotyreoidyzm	wiek>12 lat – 4,6%	-
Autoimmunologiczne zapalenie tarczycy	5,13%	46/1000/rok
Hipertyreoidyzm	wiek>12 lat – 1,4%	4,6/1000 kobiet/rok, tym z oftalmopatią Graves-Basedow 0,16/1000/rok
Zapalenie limfocytarne tarczycy (poporodowe)	11,3% do 1,5 miesiąca po porodzie	-
Niedobór hormonu wzrostu	kobiety – 2% mężczyźni – 3%	-
Zespół wielotorbielowatych jajników	4,8%	-
Zaburzenia erekcji	ogólna –18,5%; wzrost z wiekiem	2590/100.000/rok
Guzy przysadki	wiek>65 lat – 0,16%	0,9/100.000/rok
Prolactinoma	1/10.000	14/100.000/rok
Zespół Cushinga	-	0,9 -2,4/1.000.000/rok (częste zespół jatrogenne)

Choroba/zespół	Częstość występowania	Zachorowalność
Pierwotny hiperparatyreoidyzm	-	21,6/100.000/rok; 2x częstszy u kobiet, wzrost z wiekiem
Guz chromochłonny nadnerczy	-	0,8/100.000/rok

Wg Golden i wsp. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2009, 94 (6), 1853-78

Badania laboratoryjne i testy czynnościowe stosowane w diagnostyce zaburzeń endokrynologicznych zostały opisane w tomie I, rozdz. 10 i 11.

Na ćwiczeniach mogą być omawiane inne od opisanych niżej, podobne przypadki.

9.2. Wybrane przypadki kliniczne

Przypadek 9.1

Pacjentka, rasa żółta, lat 48, szczupła BMI=18,1, przyjęta na oddział z powodu narastającego od 4 dni uczucia zmęczenia, osłabienia, sennieści, wzmożonego pragnienia połączonego z częstym oddawaniem moczu i bólów brzucha. W czasie wywiadu zwrócił uwagę oddech ketonemiczny. Badanie fizykalne nie wykazało innych odchyłeń od normy.

Badania laboratoryjne wykazały:

PARAMETR	WYNIK	JEDNOSTKI	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Surowica			
Na	130	mmol/L	135-145
K	5,2	mmol/L	3,5-5
Cl	94	mmol/L	95-110
Osocze			
Glukoza	32,8	mmol/L	4,16-5,56
Krew			
pH	7,29		
pCO ₂	33	mmHg	35-45
HCO ₃	15	mmol/L	20,5-27,5
NZ	-9	mmol/L	(-2,5)-(+2,5)
Mocz			
pH	5,0		7,35-7,45
C. właściwy	1,030	kg/L	1,005-1,025
Glukoza	(+++)		(-)
Ketokwasy	(++)		(-)
Białko	(-)		(-)

a. Jakie jest rozpoznanie? Zinterpretuj wyniki badań laboratoryjnych

.....

b. Oblicz osmolalność efektywną.....

c. Jakie dodatkowe badania należałoby wykonać?

Badanie	Wynik	Jednostki/metoda	Wartości referencyjne
Krew	5,3	(%)	4-6
Mocz	2,1	µg/dobę	2,5-250
..... Surowica			
p-ciała przeciw-	(-)	jedn. umowne immunofluorescencja	(-)
p-ciała przeciw-	(-)		(-)
p-ciała przeciw-	(-)		(-)
p-ciała przeciw –	(-)		(-)

d. Z jaką odmianą choroby zasadniczej mamy do czynienia ?

.....

Przypadek 9.2

Dziecko lat 4 zgłosiło się do lekarza z powodu nadmiernej potliwości.
Wykonano następujące badania:

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
TSH	7,9	mjm/L	0,3-5,0
FT4	12,1	pmol/L	9,0-24,0
FT3	2,60	pmol/L	2,2-5,3
Anty- Tg	23,9	jm/mL	<115
Anty -TPO	5,5	jm/mL	<34

Zlecono USG tarczycy : płat lewy tarczycy 26 x 10 x 12 , objętość 1,63 mL
 płat prawy 29 x 12 x 13 , objętość 2,37 mL

Echogenność tarczycy, struktura i unaczynienie mięszone w normie, bez zmian ogniskowych. Węzły chłonne około tarczycowe nie powiększone.

- a. Jakie jest rozpoznanie i proponowane leczenie?

- b. Przeprowadzono leczenie i po 4 miesiącach wykonano badania kontrolne:

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
TSH	2,55	mj/L	0,3 - 5,0
FT4	20,30	pmol/L	9,0 - 24,0
FT3	4,32	pmol/L	2,2 - 5,3

- c. Jaka jest ocena leczenia i dalsze zalecenia?

Przypadek 9.3

33-letnia kobieta została skierowana do przychodni chorób tarczycy przez lekarza domowego. Od 6. miesięcy skarży się na uczucie lęku, zmęczenie, nadwrażliwość na ciepło, utratę ciężaru ciała towarzyszącą prawidłowemu łaknieniu, kołatanie serca i zwiększoną potliwość. W badaniu klinicznym stwierdzono tętno 130/min, ciepłe i wilgotne dłonie, drżenie powiek i kończyn, obrzęk okolic oczodołów, miękką, powiększoną tarczycę.

Wyniki: fT₄ 40 pmol/L, TSH < 0,1 mj/L.

- a. Jaka jest twoja diagnoza?
- Pacjentkę leczono karbimazolem i propranololem (45 mg/dobę, potem 30 mg/dobę)

Wyniki po włączonym leczeniu:

Tydzień leczenia	fT ₄ pmol/L	TSH mj/L
3	21	<0,1
6	15	<0,1
8	6	<0,1

- b. Jakie kontrolne badanie laboratoryjne należy wykonywać podczas leczenia?.....
- c. Zinterpretuj wyniki po 8. tygodniach leczenia.....
- d. Jakie należy wprowadzić zmiany w leczeniu?

.....
 Po 12. miesiącach przerwano leczenie.

Uzyskano wyniki: fT_4 35 pmol/L, TSH 2,9 mj/L

- e. Jaka jest twoja diagnoza?
- f. Jakie inne testy należałoby przeprowadzić?
-

Przypadek 9.4

37-letnia gospodyni domowa przyjęta na oddział z powodu zatrzymania miesiączki (2 lata) i mlekotoku (1,5 roku) i uporczywych bólów głowy, stanów depresyjnych. Od 8 lat bezskutecznie usiłowała zajść w ciążę. Badanie fizykalne: pogrubienie rysów twarzy, skóra sucha chłodna, osłabienie odruchów ścięgniastych, RR 105/70 mmHg, tętno 55/min. Badanie TK czaszki wykazało równomierne powiększenie przysadki mózgowej. Wyniki badań laboratoryjnych:

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
TSH	20,5	mj/L	0,3 - 5,0
FT4	6,2	pmol/L	9,0 - 24,0
FT3	2,4	pmol/L	2,2 - 5,3
Prolaktyna	2500	mj/L	<400 mj/L

- a. Wyjaśnij powyższe wyniki. Podaj rozpoznanie:.....

- b. Jakich wartości dla LH i FSH można spodziewać się?
- c. Zasugeruj leczenie.....

Po 4 miesiącach leczenia wykonano badania kontrolne.

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
TSH	3,5	mj/L	0,3 - 5,0
FT4	14,0	pmol/L	9,0 - 24,0
FT3	3,5	pmol/L	2,2 - 5,3
Prolaktyna	280	mj/L	<400

- d. Zinterpretuj wyniki:
-

Leczenie kontynuowano po 6 miesiącach TK wykazało prawidłową wielkość przysadki, wróciły miesiączki, po 12 miesiącach kobieta zaszła w ciążę.

Pacjent 9.5

Pacjent lat 10, wysokość ciała 124 cm, waga 27 kg zgłosił się wraz z rodzicami do lekarza. Masa ciała przy urodzeniu 2850 g, długość ciała 54 cm, obwód głowy 33 cm. Czas trwania ciąży prawidłowy, poród siłami natury.

Rodzice wysokość ciała: ojciec 178 cm, masa ciała 75 kg, matka 168 cm, waga 58 kg. Stan ogólny dobry, RR 95/ 65, tętno 78/min, prawidłowy rozwój psychomotoryczny oraz kontakt słowno-logiczny. Budowa ciała proporcjonalna, zwraca uwagę niedobór wzrostu.

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
Sód	139	mmol/L	135 - 145
Potas	4,2	mmol/L	3,5 - 5,0
AspAT	29	jm/L	5 - 35
ALAT	17	jm/L	0 - 55
BUN	8,8	mg/dL	8 - 21
Kreatynina	0,62	mg/dL	0,5 - 1,0
Glukoza	4,95	mmol/L	4,16 - 5,56

Morfologia krwi obwodowej – bez zmian, badanie ogólne moczu – bez zmian, osad moczu – bez zmian, przeciwciała **przeciwno endomysium ujemne** (IgA i IgG). Kariotyp 46 XY.

a. Podaj wstępne rozpoznanie.....

.....

b. Jakie dodatkowe badania należałoby wykonać?

.....

c. Test nocnego wyrzutu, po zaśnięciu, co najmniej pomiarów

Hormon	0'	30'	60'	90'	120'	Jednostki	Norma
.....	0,35	3,42	12,9	9,78	4,71	mj/L	wzrost>20

d. Jakie inne próby czynnościowe stymulujące sekrecję można wykonać (konieczne co najmniej 2 testy)*

***Uwaga.** poszczególne jednostki mogą stosować różne kombinacje testów stymulacji: próbą wysiłkową, L-DOPA/propranololem, klonidyną, argininą,

insuliną, GHRH. Oprócz tego wykonuje się test stymulacji hormonem wzrostu w celu sprawdzenia, czy wątroba jest zdolna do wydzielania odpowiednich ilości IGF-1 (pomiaru dokonuje się w czasie 0, 12 i 24 godz. po podaniu GH)

Wykonano:

Test stymulacji..... (0,1 jedn./kg mc.)

Uzyskane wartości i.....

Parametr	0'	15'	30'	45'	60'	90'	Jednostki	Norma
.....	0,29	0,15	1,42	5,82	6,21	2,15	mj/L	Wzrost>20
.....	81	33	37	64	75	72	mg/dL	Spadek<40

Test stymulacji.....(agonista α_2 -adrenergiczny) (0,1 mg/m² powierzchni ciała, doustnie)

Uzyskane wartości w surowicy:

Hormon	0'	30'	60'	90'	120'	Jednostki	Wartości referencyjne
.....	0,22	0,34	11	15	4,59	mj/L	Wzrost>20 od 60-120 min

e. Zinterpretuj wyniki testów.....

f. Rozpoznanie/przyczyna:

g. Jakie inne badania wykonałbyś w celu uściślenia diagnozy?.....

Badanie	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
TSH	3,2	mj/L	0,3-5,0
	17,5	pmol/L	9,0-24,0
	5,6	pmol/L	2,2-5,3
Prolaktyna	181	mj/L	<400
	320	nmol/L	150-700
	60	ng/L	<100
IGF-1	153	μg/L	180-800

h. Jakie jest rozpoznanie?

.....

i. Jakie mogą być przyczyny?.....

.....

Pacjent 9.6

Pacjenta lat 50 przyjęto do kliniki z powodu nadciśnienia tętniczego, bólów stawowych, obrzęków, pogrubienia rysów twarzy i dystalnych części kończyn, nadmiernej potliwości, okresowych stanów depresyjnych, spadku libido. Wzrost 190 cm, ciężar ciała 135 kg. Przy przyjęciu: RR 190/130, tętno 76/min, glukoza 7,8 mmol/L.

Wykonano badania hormonalne w warunkach podstawowych (8 rano):

Parametr	Wynik	Jednostki	Wartości referencyjne
LH	1,5	jm/L	2-12
FSH	2,5	jm/L	1-8
testosteron	3,1	ng/dL	2-12
ACTH (rano)	25	ng/L	<100
kortyzol	130	nmol/L	150-700
TSH	2,2	mj/L	0,3-5,0
hormon wzrostu	23	μg/L	< 5
IGF-1	700	μg/L	80-410
prolaktyna	1100	mj/L	40-450

Próby czynnościowe:

- Hormon wzrostu po obciążeniu 75 g glukozy – wzrost 20%
- Hormon wzrostu po tyreoliberynie – wzrost 30%
- LH, FSH po LH-RH – rezerwa utrzymana

Jakie jest rozpoznanie?

Pacjent 9.7

15-letni uczeń przyjęty na oddział z powodu uporczywych bólów głowy oraz nóg (przy dłuższym chodzeniu) i zahamowania wzrostu od 4 lat. Wzrost 124 cm, znacznie niższy od wzrostu brata bliźniaka. Twarz okrągła zaczerwieniona, otyłość ograniczona do tułowia, czerwone rozstępy na skórze brzucha i bioder; ciśnienie tętnicze 150/110 mmHg, glikemia na czczo 5,2 mmol/L. Po obciążeniu doustnie 75 g glukozy, glikemia po 2 godz. 9,17 mmol/L. RTG kości: uogólnione objawy osteoporozy najbardziej wyraźne w obrębie kręgosłupa lędźwiowego i piersiowego, w kościach czaszki, w mniejszym stopniu w nasadach kości tworzących stawy kolanowe. Siodełko tureckie bez zmian. Wiek szkieletowy dziecka oceniany na 12-13 lat. Urografia: niższe położenie nerki lewej niż prawej, odma pozaotrzewnowa i powiększenie lewego nadnercza.

Badania laboratoryjne wykazały:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
Wolny kortyzol w moczu dobowym (3-krotne oznaczenie)	640	nmol/24 godz.	15-150
Kortyzol godz. 8.00 godz. 17.00	1028 1006	nmol/L	150-700 55-250
Stężenie ACTH godz. 8.00 godz. 17.00	11,2 3,4	ng/L	<100 <30
Test hamowania małą dawką deksametazonu	brak hamowania	nmol/L	spadek < 50% wartości podstawowej
Test hamowania dużą dawką deksametazonu	brak hamowania	nmol/L	spadek < 50% wartości podstawowej
Test z kortykoliberyna	brak odpowiedzi	ng/L	wzrost stężenia ACTH w 30 i 60 min o przynajmniej 50% oraz wzrost stężenia kortyzolu w zakresie wartości referencyjnych w 60 min przynajmniej o 50%

- a. Zinterpretuj wyniki badań laboratoryjnych:
-
- b. Podaj diagnozę:
- c. Jakich innych zmian w parametrach laboratoryjnych można się spodziewać u tego pacjenta ?

Dalsze postępowanie: usunięto operacyjnie lewe nadnercze, waga 6,3 g z licznymi drobnymi gruczolakami w warstwie korowej. Zabieg i przebieg pooperacyjny bez powikłań. Ciśnienie tętnicze nie obniżyło się i wynosiło około 170/130 mmHg, utrzymały się też uporczywe bóle głowy. Zawartość kortyzolu w moczu 340 nmol/24 godz.

Jaka może być przyczyna takiego przebiegu choroby?.....

Po upływie 6 tygodni po zabiegu rozpoczęto naświetlanie przysadki mózgowej promieniami RTG. Po 6 tygodniach naświetlań ciśnienie obniżyło się do 120/90 mmHg, zmniejszyły się bóle głowy, zaczęły ustępować okrągłość i zaczerwienienie twarzy, waga ciała obniżyła się o 3 kg. Poprawa stanu ogólnego pozwoliła na pojęcie nauki w szkole. Normalizacja ciśnienia była trwała.

- d. Ostateczne rozpoznanie.....
- e. Jakie zaburzenia mogą pozostać po takim leczeniu.....

Przypadek 9.8

26-letnia kobieta skierowana do poradni endokrynologicznej z powodu znacznego hirsutyzmu (twarz, klatka piersiowa, uda-wewnętrzne powierzchnie, owłosienie łonowe typu męskiego). Pierwsza miesiączka w wieku 11 lat, cykle były nieregularne. W badaniu fizykalnym stwierdzono otyłość (wzrost 170 cm, waga 90 kg), ciśnienie krwi w normie. Nie stwierdzono cech klinicznych hiperkortyzolizmu i hiperaldosteronizmu. Nie stwierdzono przerostu łechtaczki ani atrofii piersi. Kobieta nie przyjmowała sterydów (środków antykoncepcyjnych). W rodzinie nie występował hirsutyzm.

USG wykazało w każdym z jajników obecność kilku pęcherzyków 2-10 mm średnicy położonych obwodowo. TK wykazało równomierny przerost obu nadnerczy.

a. Obraz kliniczny wskazuje na:

Badania laboratoryjne i testy czynnościowe wykazały:

Parametr	Wynik	Jednostka	Wartości referencyjne
Testosteron	35,2		2-12
Supresja deksametazonem 3 dni x 2 mg	6,1	ng/dL	
Androstendion	12,9	ng/mL	0,3-3,5
17 α -hydroksyprogesteron	830	ng/dL	<100 faza przedowulacyjna
LH	5,0	jm/L	faza folikularna 2,39-6,0 faza środka cyklu 9,1-74,2 faza lutealna 0,9-9,3
FSH	12,2	jm/L	faza folikularna 3,3-21,6 faza środka cyklu 5,0-20,8 faza lutealna 1,1-14,0
Kortyzol w warunkach podstawowych	140		150-700 (godz. 8.00)
Kortyzol 60 min. po stymulacji Synactenem	200	nmol/L	2-3 krotny wzrost w stosunku do wartości podstawowej
Triglicerydy	205	mg/dL	<150
Cholesterol całkowity	180	mg/dL	<200
Cholesterol HDL	25	mg/dL	>40

Stężenia Na, K w surowicy, RKZ krwi w normie.

b. Jaka jest diagnoza ?

c. Jakiego stężenia dihydroepiandrosteronu (DHEA) można spodziewać się w tym przypadku?.....

d. Jakie objawy występują w postaci klasycznej?.....

.....

Tabela 9.2 Przyczyny hiperandrogenizmu i hirsutyzmu

Narząd	Choroba
Jajniki	Zespół wielotorbielowatych jajników Zespół oporności insulinowej Guzy wirylizujące jajnika (<i>arrhenoblastoma</i> , <i>Leydigoma</i> , <i>(ang.) hilus cell tumor</i>)
Nadnercza	Wrodzony przerost nadnerczy postać klasyczna Wrodzony przerost nadnerczy późno ujawniający się (niedobór 21-hydroksylazy (CYP21A2 (90%) rzadziej innych genów steroidogenezy) Guzy wirylizujące nadnerczy Zespół i choroba Cushinga Przerost otoczki nadnerczy (<i>thecum</i>)
Jatrogenne	Sterydy anaboliczne, metoklopramid, metyldopa, fenotiazyny, doustne środki antykoncepcyjne (o aktywności progestynowo-endrogennej), rezerpina
Inne	Hiperprolaktynemia pierwotna i wtórna Hirsutyzm samoistny/rodzinny

10. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA OSTRYCH ZATRUĆ. TERAPIA MONITOROWANA

Hanna Bielarczyk

Zatrucia substancjami chemicznymi, w tym także biologicznymi (naturalnymi) toksynami, zdarzają się współcześnie znacznie częściej niż w przeszłości choćby z tej prostej przyczyny, że liczba tych substancji - związków i preparatów chemicznych, różnorodnych produktów roślinnych i zwierzęcych (toksyn i jądów), współtworzących bezpośrednio i dalsze otoczenie człowieka - jest ogromna, wynosi bowiem kilkanaście milionów, a dostęp do bardzo wielu z nich jest łatwy, często niczym nieograniczony.

Zatrucie jest to proces chorobowy z klinicznymi objawami podmiotowymi i przedmiotowymi wywołanymi przez substancje chemiczne pochodzenia egzogenne lub endogenne.

Biorąc pod uwagę dynamikę, mechanizm oraz działanie trucizny na organizm zatrucia można podzielić na:

- zatrucia ostre: charakteryzują się one szybkim rozwojem szkodliwych zmian w organizmie, powstających w ciągu krótkiego czasu po wprowadzeniu jednorazowej dawki trucizny dożołądkowo, inhalacyjnie lub po naniesieniu na skórę. Na ogół objawy uszkodzenia lub śmierć występują po 24 h. Charakteryzują się zazwyczaj dużą dynamiką objawów klinicznych
- zatrucia podostre: szkodliwe zmiany w organizmie występują mniej gwałtownie po podaniu jednorazowej lub kilkakrotnej dawki. W zatruciach podostrych wykrycie powstałych zmian patologicznych jest często możliwe po zastosowaniu fizjologicznych badań czynnościowych narządów.
- zatrucia przewlekłe: powstają wskutek działania małych dawek trucizny podawanych przez dłuższy okres, na ogół pod wpływem kumulacji trucizny w organizmie. Zatrucia przewlekłe powstają zwykle w wyniku zatruc przypadkowych, np. przebieg zatruc zawodowych ma przeważnie charakter przewlekły. Substancje toksyczne, zanieczyszczające środowisko człowieka, występują przeważnie w tak małych stężeniach, że wywołują tylko działanie przewlekłe.

Ze względu na przesłanki, które prowadzą do zatruc, zatrucia dzielimy na zamierzone i przypadkowe. Wśród zatruc zamierzonych wyróżnia się zatrucia samobójcze i zatrucia zabójcze. Natomiast zatrucia przypadkowe to w większości przypadków zatrucia przemysłowe oraz zatrucia ostre u dzieci.

Charakter zatrucia oraz jego przebieg czyli: ostrość początku, szybkość ujawniania się pełnego obrazu klinicznego, dalsza progresja i ewentualne powikłania, szybkość ustępowania poszczególnych objawów, czas powrotu do pełnego zdrowia, utrwalanie się powikłań, zależy od bardzo wielu czynników a w szczególności od rodzaju trucizny, od dawki przyjętej, od jej siły negatywnego oddziaływania na ustrój, to znaczy jej wpływu zwłaszcza na podstawowy metabolizm organizmu i od jej oddziaływania na kluczowe

narządy, takie jak wątroba, nerki i płuca, które są odpowiedzialne za metabolizm i wydalanie trucizny zarówno w formie nie zmienionej jak też metabolitów powstałych w wyniku biotransformacji w wątrobie. Do innych czynników, które bez wątpienia mają wpływ na charakter i przebieg ostrego zatrucia, należą różnice międzysobnicze takie jak wiek osoby zatrutej, ogólny stan zdrowia przed zatruciem oraz wcześniejsze uzależnienia np. alkoholicy są bardziej podatni na oddziaływania toksyczne wielu związków.

Ostre zatrucia u ludzi najczęściej wywoływane są przez leki uspokajające i nasenne takie jak benzodiazepiny, trójcykliczne antydepresyjne oraz niesteroidowe leki przeciwzapalne. Rzadkie są zatrucia pochodnymi kwasu barbiturowego, które w latach 70. były bardzo popularne. Zatrucia alkoholem etylowym należą do częstych przyczyn hospitalizacji, natomiast zatrucia jego substytutami takimi jak alkohol metylowy czy glikol etylenowynie występują często.. Liczba zatruc gazami, przede wszystkim tlenkiem węgla, utrzymuje się na mniej więcej stałym poziomie mimo wprowadzenia do eksploatacji nowoczesnych, bardziej bezpiecznych urządzeń grzewczych. Podobnie liczba zatruc rozpuszczalnikami organicznymi nie ulega istotnym wahaniom. Zatrucia grzybami a szczególnie muchomorem sromotnikowym w dużej mierze są zależne od warunków pogodowych. Natomiast wzrasta liczba zatruc głównie wśród dzieci i młodzieży substancjami narkotycznymi i halucynogennymi.

Tabela 10.1. Substancje wywołujące zatrucia ostre u ludzi

Rodzaj trucizny	% ogółu zatruc
Leki	45-50
Alkohole	15-30
Gazy	4,5-6,5
Środki narkotyczne i halucynogenne	3,5-6,0
Rozpuszczalniki organiczne	1,5-4,5
Pestycydy	1,0-5,0
Grzyby	1,5-3,0
Glikole	0,5-1,0
Metale ciężkie	0,3-0,6

wg Panasiuk L. i wsp. Ostre zatrucia, PZWL 2010

10.1. Zatrucia lekami

10.1.1. Zatrucia lekami przeciwbólowymi i lekami przeciwzapalnymi

10.1.1.1. Zatrucia paracetamolem

Paracetamol został wprowadzony do lecznictwa, jako lek przeciwbólowy, przeciwgorączkowy. Zastąpił on fenacetynę, która wykazywała działanie neurotoksyczne.

10.1.1.1.1. Metabolizm leku

Paracetamol po podaniu doustnym dobrze i w całości wchłania się z przewodu pokarmowego w jelicie cienkim, osiągając maksymalne stężenie w surowicy krwi po 30-60 minutach od momentu podania. Biologiczny okres półtrwania wynosi 2-4 godzin i jest zależny od zmienności osobniczej oraz pory dnia, rano jest o ok. 15% dłuższy od okresu półtrwania oznaczonego po południu.. Pozorna objętość dystrybucji leku wynosi 0,8-1,0 L/kg, około 5-20% leku wiąże się z białkami. Lek ten jest metabolizowany w wątrobie. I tak około 90% leku ulega sprzęganiu z kwasem siarkowym i glukuronowym dając nietoksyczne estryl, 5% wydalana się w postaci niezmienionej Natomiast około 4-5% wchłoniętej dawki terapeutycznej jest metabolizowane z udziałem oksydazy zależnej od cytochromu-P450 (CYP2E1) do toksycznego metabolitu, jakim jest N-acetylo-p-benzochinoimina (NAPQI). Metabolit ten jest natychmiast sprzęgany z glutationem, dając nietoksyczny merkaptan. Zapas glutationu w wątrobie dorosłego człowieka wystarcza zwykle do unieczynnienia toksycznych metabolitów powstających po spożyciu ok. 10 g paracetamolu. Poniżej tej krytycznej dawki, która wykazuje jednak znaczne wahania osobnicze, paracetamol uważany jest za lek względnie bezpieczny. W przypadku ostrych zatruc tzn. po przyjęciu jednorazowo powyżej 10 g leku dochodzi do wyczerpania glutationu i ujawnieniu się toksycznego działania NABC. Metabolit ten wiąże się kowalencyjnie z białkami hepatocytów, prowadząc do martwicy wątroby.

10.1.1.1.2. Objawy ostrego zatrucia paracetamolem

W zatruciu paracetamolem wyróżnia się 4 fazy:

1 faza – do 24 godzin po zażyciu leku – bezobjawowa lub łagodne nieswoiste objawy takie jak: nudności, wymioty, nadmierne pocenie się, brak apetytu.

2 faza – między 24 a 72 godziną – ustąpienie objawów pierwszej fazy, pojawienie się objawów uszkodzenia wątroby. Obserwuje się wzrost aktywności transaminaz, bilirubiny oraz wydłużony czas protrombinowy.

3 faza – między 72 a 96 godziną – pojawiają się nudności, wymioty, ból brzucha, żółtaczka oraz objawy uszkodzenia wątroby, niewydolność nerek, koagulopatia. W ocenie histologicznej stwierdza się środkowo-zrazikową martwicę wątroby, możliwy zgon.

4 faza – od 4 dnia do 3 tygodni – stopniowe ustępowanie objawów i zmian narządowych.

10.1.1.1.3. Diagnostyka laboratoryjna

Oznaczenie ilościowe lub jakościowe paracetamolu w surowicy i moczu pozwala na właściwe rozpoznanie zatrucia. Ponadto stężenie paracetamolu w surowicy jest wskazówką do stosowania odtrutki jaką jest N-acetylocysteina. Ze względu na parametry farmakokinetyczne leku, wyniki najbardziej wiarygodne uzyskuje się po czterech godzinach od zażycia leku. Pacjenci zatruci paracetamolem powinni mieć wykonane następujące badania: aminotransferazy, INR, bilirubinę, morfologię, elektrolity, gazometrię oraz mocznik i kreatyninę. W przypadku utrzymujących się wymiotów diagnozujemy ewentualne zapalenie trzustki. W tym celu oznaczamy aktywność lipazy oraz amylazy trzustkowej. Markery uszkodzenia wątroby oznaczamy codziennie, natomiast pozostałe w zależności od stanu klinicznego pacjenta.

10.1.1.1.4. Leczenie

W zatruciach paracetamolem wskazana jest prowokacja wymiotów, płukanie żołądka (jeśli od przyjęcia nie upłynęło więcej niż 60 min), a następnie frakcjonowane podawanie węgla aktywowanego w dawce 1 g/kg m.c. Swoistą odtrutką w zatruciu paracetamolem jest N-acetylocysteina (NAC). Podawanie węgla aktywowanego nie zmniejsza efektywności działania odtrutki niezależnie od drogi jej podania. NAC działa jako prekursor glutationu, uzupełnia jego niedobory, ułatwia tworzenie siarczanów oraz poprawia zużycie tlenu. Odtrutka ta powinna być podana w czasie nie dłuższym niż 10 godz., jaki upłynął od przyjęcia toksycznej dawki. Tym nie mniej w przypadku objawów hepatotoksycznego uszkodzenia wątroby należy podać NAC niezależnie od czasu jaki upłynął od czasu zażycia paracetamolu. W przypadku koagulopatii konieczne bywa podanie świeżego osocza. W leczeniu niewydolności nerek kluczowe znaczenie ma utrzymanie właściwej objętości łożyska naczyniowego. W niektórych przypadkach niezbędna jest hemodializoterapia.

10.1.1.2. Zatrucia salicylanami

Najczęściej stosowanym lekiem z tej grupy jest kwas acetylosalicylowy (ASA). Lek ten wykazuje działanie przeciwgorączkowe, przeciwzapalne oraz przeciwbólowe. Występuje on także w preparatach złożonych, zawierających kodeinę, kofeinę, magnez, wapń oraz paracetamol.

Kwas acetylosalicylowy hamuje zarówno konstytutywną cyklooksygenazę 1 (COX1) jak i indukowaną procesem zapalnym, cyklooksygenazę 2 (COX2). ASA posiada właściwości antyagregacyjne, co jest wynikiem nieodwracalnej inhibicji COX1 w płytkach. Duże (toksyczne) dawki ASA hamują również syntezę czynników krzepnięcia zależnych od witaminy K.

10.1.1.2.1. Metabolizm leku

ASA wchłania się łatwo i prawie całkowicie z przewodu pokarmowego, głównie w jelicie cienkim. Proces wchłaniania rozpoczyna się już po 15 min od przyjęcia leku. Maksymalne stężenie leku we krwi dla dawek terapeutycznych występuje po 0,5-1 godz. po podaniu leku. Natomiast w zatruciach dużymi dawkami, proces wchłaniania może się wydłużyć do 24 godz. Okres biologicznego półtrwania dla dawek terapeutycznych wynosi 2-3 godz., a dla dawek powyżej 10 g wydłuża się do 20-36 godz. Wiązanie z białkami wynosi 40-90%. Po wysyceniu miejsc wiążących dla salicylanów wzrasta stężenie formy niejonizowanej, która może przenikać przez błony komórkowe. Dodatkowo obniżenie pH krwi zwiększa pulę salicylanów w formie niejonizowanej i tym samym potęguje przejście salicylanów do mózgu, wątroby i innych tkanek. W tych warunkach zwiększa się również pozorna objętość (V_d), która dla dawek leczniczych wynosi około 0,15 L/kg m.c., natomiast dla dawek toksycznych około 0,35 L/kg m.c. Kwas acetylosalicylowy wydala się przez nerki w postaci glukuronidów oraz w formie niezmiennionej.

10.1.1.2.2. Objawy zatrucia

Objawy zatrucia ASA występują już po 3-6 godz. po spożyciu leku. W wyniku ostrego zatrucia salicylanami dochodzi do zaburzeń ze strony:

- układu pokarmowego – nudności, wymioty (czasami z krwią), zawroty głowy, bóle brzucha
- układu nerwowego – zaburzenia orientacji, pobudzenie, halucynacje oraz w przypadku najcięższych zatruc mogą pojawić się drgawki, śpiączka, depresja ośrodka oddechowego i obrzęk mózgu.
- układu sercowo-naczyniowego – spadek ciśnienia z objawami niewydolności serca
- układu oddechowego – przyspieszony oddech

Gorączka i szum w uszach występują we wczesnej fazie zatrucia ostrego oraz przewlekłego. Zatrucia ostre salicylanami prowadzą do wielu zaburzeń metabolicznych. Po dawkach toksycznych dochodzi do pobudzenia ośrodkowego układu nerwowego, czego wynikiem jest pobudzenie czynności ośrodka oddechowego. Objawia się to przyspieszeniem oraz pogłębieniem oddechu. W wyniku utraty znacznych ilości dwutlenku węgla rozwija się zasadowica oddechowa. Wraz z narastaniem ciężkości zatrucia dochodzi do wyrównania zasadowicy oddechowej, a następnie do rozwoju kwasicy metabolicznej. Patogeneza kwasicy metabolicznej jest wynikiem wielu złożonych procesów jakie zachodzą w organizmie w wyniku zatrucia salicylanami. Leki te upośledzając fosforylację oksydacyjną zmniejszają zużycie jonów wodorowych powstałych z hydrolizy ATP. Ponadto hamują lipogenezę, a nasilają lipolizę, zwiększając pulę ciał ketonowych. Salicylany w początkowej fazie zatrucia powodującą hiperlikemię, następnie w wyniku zużycia glikogenu rozwija się hipoglikemia. Obserwowana hipokaliemia jest wynikiem nasilonej sekrecji jonów potasowych przez nerki oraz występujących wymiotów.

Tabela 10.2. Zatrucie salicylanami

Zatrucia salicylanami		
Dawka (mg/kg m.c.)	Stężenie mg/dL	Stopień zatrucia
do 150	30-50	lekkie
150-300	50-70-	umiarkowane
>300	70-100	ciężkie
>500	>100	śmiertelne

10.1.1.2.3. Leczenie

Brak specyficznej odtrutki, leczenie objawowe oparte jest na zasadach intensywnej terapii. Prowokacja wymiotów lub płukanie żołądka powinny być wykonane w czasie pierwszej godziny od zażycia leku. Jednakże przy dużych dawkach salicylanów czas ten może być wydłużony do 12 godz. Do skutecznych metod przyspieszających eliminację trucizny z organizmu należą diureza z alkalizacją natomiast w ciężkich zatruciach z towarzyszącym obrzękiem mózgu oraz niewydolnością wątroby lub nerek zalecana jest hemodializa. Alkalizacja moczu do pH 8 zwiększa ponad trzykrotnie wydalanie salicylanów z moczem.

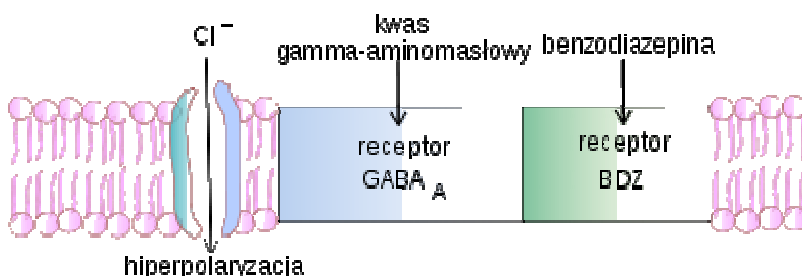
10.1.2. Zatrucia lekami działającymi na ośrodkowy układ nerwowy

10.1.2.1. Zatrucia benzodiazepinami

Leki z grupy benzodiazepin są używane w leczeniu nerwicy lękowej, bezsenności, zespołów lękowych, jako leki przeciwdrgawkowe i zwiotczające mięśnie szkieletowe. Zatrucia benzodiazepinami są częste, jakkolwiek do zgonów w wyniku zatrucia benzodiazepinami dochodzi bardzo rzadko. Śmiertelne zatrucia są zazwyczaj wynikiem mieszanego zatrucia benzodiazepinami i innymi lekami wpływającymi depresyjnie na OUN. Alkohol i barbiturany bardzo mocno nasilają działanie depresyjne benzodiazepin na ośrodkowy układ nerwowy, co w efekcie może doprowadzić do śpiączki, a nawet do śmierci.

10.1.2.1.1. Metabolizm benzodiazepin

Benzodiazepiny wzmacniają hamujące działanie kwasu gamma-aminomasłowego (GABA). Benzodiazepiny łącząc się ze swoim receptorem powodują zmiany jego konformacji przestrzennej ułatwiające powstanie połączenia GABA-GABA receptor. Połączenie się GABA z receptorem otwiera kanały chlorkowe w błonie komórkowej neuronu w wyniku czego wzrasta napływ jonów chlorkowych do wnętrza komórki powodując hiperpolaryzację błony komórkowej i w konsekwencji zahamowanie powstawania impulsów nerwowych (ryc. 10.1). Zahamowanie aktywności neuronów w OUN jest odpowiedzialne za działanie przeciwlękowe, przeciwdrgawkowe oraz nasenne agonistów receptorów benzodiazepinowych.



Ryc.10.1. Schemat receptora benzodiazepinowego sprzężonego z receptorem GABA_A

Pochodne benzodiazepiny jako związki o właściwościach lipofilnych wchłaniają się bardzo szybko z przewodu pokarmowego, maksymalne stężenie we krwi osiągają po ok. 0,5-6 godz. Metabolizowane są w wątrobie przy udziale izoenzymów CYP3A4 i CYP2A19 cytochromu P450, w większości przypadków do reaktywnych metabolitów. Około 60% metabolitów wydala się przez nerki, najbardziej lipofilne pochodne benzodiazepin wydalone zostają do żółci a

następnie zostają przemieszczone do przewodu pokarmowego i dalej wchłaniane zwrotnie wchodząc w cykl krążenia wątrobowo-jelitowego. Jedynie 1% leku wydala się z moczem w formie niezmienionej.

Okres półtrwania leku jest różny i wynosi od kilku godz. do kilku dni. Podobnie pozorna objętość dystrybucji, która zależy od lipofilności leku waha się od 0,3 do 3 L/kg masy ciała. Pochodne benzodiazepiny łatwo przechodzą do płynu mózgowo-rdzeniowego i mleka matki, gdzie osiągają stężenia równe tym w surowicy. Po dotarciu do krążenia ogólnego wiążą się w wysokim stopniu z białkami. Stopień wiązania z białkami zależy od ich litofilności i wynosi od 70 do 98%.

Tabela 10.3 Klasyfikacja benzodiazepin

Czas działania	Lek	Okres półtrwania (godz.)
Długo działające	Diazepam, elenium, klonazepam, flurazepam	20-100
Krótko działające	Oxazepam, lorazepam	6-24
Bardzo krótko działające	Mediolan, Temazolam, triazolam	3-12

10.1.2.1.2. Objawy zatrucia

Benzodiazepiny łącząc się z receptorami GABA-ergicznymi nasilają hamującą aktywność kwasu γ -aminomasłowego w wyniku, czego dochodzi do depresji OUN z niewielką depresją krążenia i oddychania.. Nawet znaczne przedawkowanie benzodiazepin daje zwykle łagodne objawy i rzadko prowadzi do zgonu. W ciężkich zatruciach występuje śpiączka i depresja układu oddychania ponadto obserwuje się osłabienie odruchów oraz zwężenie źrenic. Przewlekłe stosowanie benzodiazepin prowadzi do rozwoju tolerancji, a nagłe przerwanie stosowania leku wywołuje zespół odstawienny.

10.1.2.1.3. Diagnostyka laboratoryjna

Potwierdzenie lub wykluczenie zatrucia opiera się na testach ilościowych lub jakościowych metabolitów benzodiazepin w moczu.

10.1.2.1.4. Leczenie

Specyficzną odtrutką jest antagonistą receptora benzodiazepinowego-flumazenil. U pacjentów ze śpiączką niewiadomego pochodzenia odtrutkę podajemy w celu wykluczenia lub potwierdzenia zatrucia benzodiazepinami. W

przypadku czystego zatrucia benzodiazepinami, następuje poprawa świadomości już w pierwszych minutach po podaniu odtrutki. Pacjenci z podejrzeniem zatrucia benzodiazepinami powinni mieć monitorowane funkcje układu oddechowego i krążenia. Płukanie żołądka jest celowe jedynie wtedy, gdy nie minęła godzina od spożycia toksycznej dawki leku. Wielokrotne podawanie węgla aktywowanego, hemodializa i hemoperfuzja są nieskuteczne ze względu na znaczną lipofilność, wysokie wiązanie z białkami oraz stosunkowo dużą objętość dystrybucji pochodnych benzodiazepin. Leczenie objawowe jest zgodne z zasadami intensywnej terapii.

10.1.3. Zatrucie barbituranami

Barbiturany są grupą leków o działaniu uspakajającym, nasennym i przeciwpadaczkowym. Wśród leków uspokajająco-nasennych wykazują największe ryzyko zatrucia i śmiertelność. Obecnie zastosowanie tych leków ogranicza się do leczenia zaburzeń padaczkowych, bólów migrenowych oraz do krótkotrwałej anestezji. Ze względu na czas działania dzielimy je na: ultrakrótco, krótko, średnio długo i długo działające. Obecnie stosowane są jedynie te o ultrakrótkim działaniu (thiopental) w anestezji oraz długo działające (luminal) w leczeniu padaczki.

Tabela 10.4. Parametry farmakokinetyczne thiopentalu i luminalu

Lek	V_d (L/kg)	Wiązanie z białkami (%)	$T_{1/2}$ (godz.)	Droga eliminacji
Thiopental	0,5-4,0	75-90	4-20 przy dużych dawkach do 60	Wątrobowa <1% w postaci niezmienionej
Luminal	ok. 0,5	ok. 50	90-100	Nerkowa (25-30%)

10.1.3.1.1. Metabolizm pochodnych kwasu barbiturowego

Mechanizm działania tych leków wynika z wpływu na kompleks receptora GABA, który zawiera miejsce wiązania nie tylko dla benzodiazepin, ale także dla barbituranów. Pochodne kwasu barbiturowego, wiążąc się z tym receptorem, aktywują kanał chlorkowy, co prowadzi do hiperpolaryzacji neuronu i stłumienia jego czynności. Barbiturany wpływają silnie na neurony tworzącego siatkowatego i kory, przez co działają uspokajająco. Niektóre barbiturany (np. fenobarbital) działają także przeciwdrgawkowo, co znalazło zastosowanie w leczeniu padaczki. Leki należące do tej grupy wykazują również działanie depresyjne na ośrodek oddechowy i naczynioruchowy, nie wywierają natomiast działania

przeciwbólowego. Mogą, jednak nasilać działanie innych leków o właściwościach przeciwbólowych, takich jak niesteroidowe leki przeciwbólowe, co dawniej wykorzystywano w leczeniu.

Pochodne kwasu barbiturowego wchłaniają się łatwo z przewodu pokarmowego, dobrze rozpuszczają się w lipidach, z wyjątkiem długo działających i docierają do ośrodkowego układu nerwowego. Są metabolizowane w wątrobie do nieaktywnych metabolitów. Wydalają się przez nerki w postaci niezmienionej lub nieaktywnych metabolitów. Barbiturany aktywują enzymy mikrosomalne wątroby. I tak, fenobarbital podwyższa stężenie formy 2B cytochromu P450 oraz zwiększa szybkość transkrypcji genów z podrodziny CYP2C i CYP3A. Indukcja enzymów mikrosomalnych jest przyczyną wielu niekorzystnych interakcji barbituranów z innymi lekami. Pochodne kwasu barbiturowego osłabiają działanie leków hipoglikemicznych, przeciwzkrzepowych, β -adrenolityków, cyklosporyny, kwasu walproinowego i wielu innych.

10.1.3.1.2. Objawy zatrucia

Wystąpienie objawów klinicznych zatrucia zależy od rodzaju wchłoniętego leku. W przypadku barbituranów o ultrakrótkim działaniu objawy rozwijają się w ciągu 15-30 min, z maksymalnymi efektami po 2-4 godzinach. W zatruciu lekami długo działającymi objawy zatrucia pojawiają się po 1-2 godzin, a maksymalny efekt występuje między 6 a 18 godziną. W początkowym okresie dominuje senność, zaburzenia równowagi i mowy. Chory początkowo zapada w sen a następnie w śpiączkę. Dochodzi do obniżenia ciśnienia tętniczego, zapaści krążeniowej, a w szczególnych przypadkach do zatrzymania krążenia. Może dojść do rozwoju zapalenia lub obrzęku płuc. Śmierć jest wynikiem porażenia ośrodka oddechowego, ośrodka naczynioruchowego pnia mózgu lub zatrzymania akcji serca.

10.1.3.1.3. Diagnostyka laboratoryjna

Diagnostyka toksykologiczna opiera się na pólnościowym oznaczaniu pochodnych kwasu barbiturowego w moczu. Dodatkowo należy oznaczyć elektrolity, glukozę, CPK, mocznik, kreatyninę, mioglobinę w moczu pacjentów z ciężkim zatruciem, gazometrię oraz EKG i RTG klatki piersiowej.

10.1.3.1.4. Leczenie

Leczenie ostrego zatrucia barbituranami ma głównie charakter objawowy. Ważne jest jednak również najszybsze usunięcie leku z organizmu. W tym celu podawane są leki alkalizujące mocz, co zwiększa wydalanie barbituranów, które

są słabymi kwasami. Stosowana jest również wymuszona diureza. Zatrucia przewlekłe natomiast przypominają w pewnym stopniu stan upojenia alkoholowego. Objawiają się bowiem zaburzeniami koordynacji i mowy, nadmierną drażliwością i agresją.

10.1.3.2. Zatrucie lekami trójpierścieniowymi przeciwdepresyjnymi

Leki trójkycliczne antydepresyjne (TCA) są najczęściej przepisywanymi przez lekarzy lekami przeciwdepresyjnymi, stanowią ok. 90% przedawkowań wśród tej grupy leków i są przyczyną 84% zgonów spowodowanych zatruciami lekami przeciwdepresyjnymi w ogóle. Są najbardziej toksycznymi lekami przeciwdepresyjnymi znajdującymi się obecnie w użyciu, głównie ze względu na ich dużą kardiotoxycywność. Często obserwuje się nagłą utratę świadomości i ciężkie objawy zatrucia, zazwyczaj już w ciągu 60 minut od ich podania.

10.1.3.2.1. Metabolizm leków trójkyclicznych antydepresyjnych

Leki przeciwdepresyjne dobrze wchłaniają się z przewodu pokarmowego i metabolizowane głównie w wątrobie przy udziale cytochromu P-450. Dlatego też stosowanie jednoczesne inhibitorów cytochromu P-450 znacznie wydłuża ich okres półtrwania. Terapeutyczne działanie tych leków polega przede wszystkim na blokowaniu wychwytu zwrotnego neurotransmiterów w ośrodkowym układzie nerwowym a dotyczy to głównie noradrenaliny, serotoniny i dopaminy. Natomiast objawy zatrucia takie jak śpiączka, drgawki są wynikiem antagonistycznego działania tych leków na receptory muskarynowe i histaminowe. W przypadku zatrucia każdy rodzaj leków antydepresyjnych może wywołać pełnoobjawowy zespół cholinolityczny. Tym nie mniej najgroźniejsze działanie toksyczne tych leków wynika z ich wpływu na kanały jonowe w sercu. Leki te blokują zarówno kanały sodowe jak i potasowe. Wynikiem zablokowania kanałów sodowych jest spowolnienie depolaryzacji i wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego kardiomiocytów, co prowadzi do wydłużenia i zdeformowania zespołów komorowych. Natomiast zablokowanie kanałów potasowych wpływa na repolaryzację kardiomiocytów, co w konsekwencji może prowadzić do wielokształtnego częstoskurczu komorowego

10.1.3.2.2. Objawy zatrucia

Objawy zatrucia pojawiają się w pierwszych godzinach po podaniu leku. Obraz kliniczny zatrucia może być bardzo różny. W zatruciach mniejszymi dawkami występują objawy zespołu cholinolitycznego takie jak ucucie zmęczenia, szum w uszach, zaburzenie ostrości widzenia, rozszerzenie źrenic,

splatanie, majaczenie, zaburzenia ruchowe, letarg i śpiączka. Może również dojść do depresji ośrodka oddechowego. W przypadku dużych dawek pojawiają się drgawki, spada ciśnienie tętnicze krwi i nasilają się objawy spowodowane ich działaniem kardiotoksycznym.

10.1.3.2.3. Diagnostyka laboratoryjna

Oprócz objawów klinicznych potwierdzeniem zatrucia jest oznaczenie stężenia leków trócyklicznych antydepresyjnych we krwi. Stężenie terapeutyczne wynosi 50-250 ng/mL. Po zażyciu jednego grama szczytowe stężenie we krwi jest większe niż 1000 ng/mL.

Dodatkowymi badaniami są: badania równowagi kwasowo-zasadowej, podstawowe badania biochemiczne, morfologia krwi oraz EKG.

10.1.3.2.4. Leczenie

Pacjentom z podejrzeniem zatrucia lekami trócyklicznymi antydepresyjnymi wdraża się postępowanie zgodne z zasadami intensywnej terapii. U chrych z tachykardią stosujemy dwuwęglan w celu lekkiej alkalizacji krwi (pH ok. 7,5). Drgawki zwalcza się za pomocą wodorowęglanu sodu lub pochodnych benzodiazepiny. W pierwszej godzinie zatrucia wskazana jest prowokacja wymiotów lub płukanie żołądka oraz podanie węgla aktywowanego w dawce 1 g/ kg m.ciała. Ze względu na dużą objętość dystrybucji wielokrotne podawanie węgla, hemodializa czy hemoperfuzja są nieskuteczne.

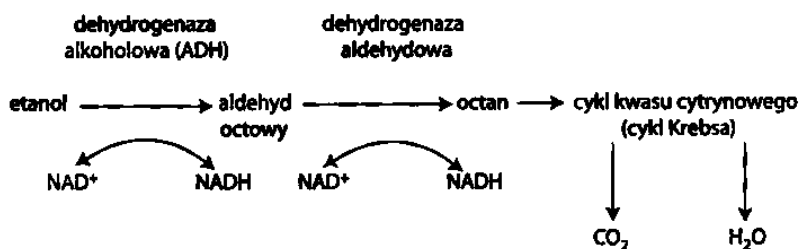
10.2. Zatrucia alkoholami

Wśród alkoholi, zatrucia ostre alkoholem etylowym są najczęstszą przyczyną hospitalizacji w wielu krajach. Głównym źródłem etanolu są legalne, powszechnie dostępne różnego rodzaju napoje alkoholowe. Objawy zatrucia są nasilone w przypadkach jednoczesnego spożycia etanolu oraz leków takich jak duże dawki paracetamolu, benzodiazepin czy leków z grupy barbituranów. Oprócz typowych napojów alkoholowych, etanol jest składnikiem wielu preparatów o różnym przeznaczeniu. Spożycie ich może również prowadzić do wystąpienia zatrucia. Zatrucia innymi alkoholami takimi jak alkohol metylowy czy glikol etylenowy występują stosunkowo rzadko.

10.2.1.1. Zatrucia etanolem

10.2.1.1.1. Metabolizm etanolu

Alkohol etylowy jest bezbarwną cieczą o charakterystycznym zapachu. Dawka śmiertelna etanolu wynosi 5-8 g/kg m.c. dla dorosłych i 3 g/kg. m.c. dla dzieci. Wchłania się szybko z żołądka i jelita cienkiego do krwi, a następnie jest szybko rozprowadzany do wszystkich tkanek i narządów. Metabolizm alkoholu etylowego rozpoczyna się już w żołądku przy udziale dehydrogenazy alkoholowej (ADH). Jednakże zasadniczy metabolizm etanolu zachodzi w wątrobie. Przy wysokich stężeniach alkoholu w metabolizmie alkoholu bierze udział katalaza oraz cytochrom P-450 2E1. Około 95-98% etanolu ulega utlenieniu, najpierw przez ADH do aldehydu octowego, a następnie przez dehydrogenazę aldehydową do kwasu octowego. Utlenianie alkoholu etylowego wymaga obecności formy utlenionej dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD), który jest redukowany NADH. W efekcie dochodzi do zmian potencjału oksydoredukcyjnego w komórce. Zmiana stosunku NAD: NADH zaburza wiele procesów zachodzących w komórce. Wzrost stężenia NADH hamuje dalsze utlenianie alkoholu, a z kolei spadek stężenia NAD hamuje aktywność enzymów wymagających tego nukleotydu. W konsekwencji dochodzi do zahamowania glukoneogenezy, nagromadzenia się mleczanu, obniżenia aktywności reakcji cyklu kwasów karboksylowych i nagromadzeniu acetylo-CoA, który powstaje w dużych ilościach z pochodzącego z etanolu kwasu octowego. Wzrost stężenia NADH i acetylo-CoA jest sygnałem do syntezy kwasów tłuszczowych, które w postaci trójglicerydów gromadzą się w wątrobie. Zwiększona synteza kwasów tłuszczowych prowadzi do hiperlipidemii, a zaburzone ich utlenianie prowadzi do wzrostu stężenia związków ketonowych.



Ryc.10.2. Metabolizm alkoholu etylowego

Przy wysokich stężeniach alkoholu w metabolizmie alkoholu bierze udział katalaza oraz cytochrom P-450 2E1. Częste spożywanie alkoholu indukuje tę formę cytochromu i zwiększa tym samym jego utlenianie. Przy wysokich stężeniach alkoholu udział tej drogi w utlenianiu alkoholu może sięgać nawet 50%.

10.2.1.1.2. Skutki metaboliczne zatrucia alkoholem etylowym

- Hipoglikemia
Zaburzenie to występuje często u dzieci i osób niedożywionych i jest wynikiem zahamowania glukoneogenezy przez alkohol.
- Zaburzenia elektrolitów
Do najczęstszych zaburzeń występujących u osób zatrutych alkoholem, a w szczególności u przewlekle pijących, zaliczamy: hipokaliemię, hipokalcemię, hipofosfatemię i hipomagnezemię. Przyczyną tych zaburzeń jest niedożywienie, zmniejszone wchłanianie oraz wzmożone wydalanie indukowane przez etanol.
- Alkoholowa kwasica ketonowa
Alkoholowa kwasica ketonowa jest określana jako kwasica metaboliczna ze zwiększoną luką anionową. Zaburzenie to występuje po 2-3 dniach od zatrucia etanolem i jest wynikiem zaburzeń metabolicznych, które prowadzą do zwiększonej syntezy ketokwasów, głównie beta-hydroksymaślanu.

10.2.1.1.3. Objawy zatrucia

Ostre zatrucie alkoholem etylowym prowadzi głównie do zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego. Stadia kliniczne ostrego zatrucia alkoholem etylowym (tabela 10.3) prowadzą od podniecenia poprzez zamroczenie do głębokiej śpiączki. Śpiączce towarzyszą: obniżone ciśnienie tętnicze krwi, obniżona ciepłota ciała i hipowentylacja. W przebiegu śpiączki wątrobowej mogą wystąpić określone zespoły kliniczne i biochemiczne, które są następstwem lub powikłaniem ostrego zatrucia.

Zatrucie alkoholem etylowym może prowadzić do wystąpienia zespołów klinicznych, takich jak:

- niewydolność oddechowa
- niewydolność naczyniowo-sercowa
- ostre zapalenie trzustki
- martwica mięśni prądkowanych
- hiperurikemia, u osób za skazą dnawą
- ostre uszkodzenie wątroby; przewlekle picie alkoholu prowadzi do stłuszczenia, zapalenia i marskości wątroby

Natomiast do zespołów biochemicznych, które towarzyszą ostremu zatruciu alkoholem, zaliczamy:

- kwasicę metaboliczną, zazwyczaj niewielkiego stopnia
- hipoglikemię, występującą między 6-12 godz. od spożycia; dotyczy głównie dzieci oraz osób wyniszczonych i w stanie głodu
- odwodnienie pozakomórkowe i komórkowe.

Tabela 10.5. Zależność między stężeniem alkoholu a stopniem ciężkości zatrucia

Stężenie alkoholu we krwi		Stopień ciężkości zatrucia
% (g/dL)	‰ (g/L)	
<0,02	<0,2	Stężenie fizjologiczne, prawnie dopuszczalne
0,02-0,05	0,2-0,5	Stan po spożyciu alkoholu
0,05-0,15	0,5-1,5	lekkie
0,15-0,3	1,5-3,0	średnio ciężkie
0,3-0,5	3,0-5,0	ciężkie
>0,5	>5,0	śmiertelne

Wg Dembińska-Kieć i wsp. 2010

10.2.1.1.4. Leczenie

Stan typowego, niepowikłanego upojenia alkoholowego nie wymaga leczenia. Pomocy wymagają zatruci, ze stężeniem powyżej 3 promili, u których wystąpiły zaniki odruchów oraz zaburzenia ze strony układu krążenia i/lub oddechowego. Płukanie żołądka jest wskazane tylko w zatruciach mieszanych. Nie ma wskazań do podawania węgla aktywowanego. Alkohol nie jest absorbowany przez węgiel. Głównie prowadzi się leczenie objawowe. W szczególnych przypadkach, przy wysokim stężeniu alkoholu i niewydolności nerek, hemodializa może przyspieszyć wydalanie etanolu z organizmu.

10.2.1.2. Zatrucie metanolem

Alkohol metylowy jest silnie toksycznym jednowęglowym etanolem. Jest powszechnie stosowany, jako rozpuszczalnik i w produkcji formaldehydu.. Wykorzystuje się go również jako rozpuszczalnik do farb, lakierów oraz w płynach do mycia szyb. Najczęściej zatrucia metanolem dotyczą pojedynczych epizodów i są wynikiem przypadkowego spożycia tego alkoholu. Obecnie są to zatrucia stosunkowo rzadkie, jednakże nierozpoznane w porę prowadzą do śmierci. Minimalna dawka śmiertelna dla tego ksenobiotyku wynosi ok. 30 g.

10.2.1.2.1. Metabolizm metanolu

Alkohol metylowy szybko wchłania się z układu oddechowego, przewodu pokarmowego oraz przez skórę. Maksymalne stężenie we krwi po podaniu doustnym występuje po 30-60 minutach. Nie wiąże się z białkami osocza, ulega równomiernej dystrybucji do tkanek, w których gromadzi się proporcjonalnie do ich uwodnienia. Metanol jest metabolizowany w wątrobie przez ten sam układ enzymatyczny co etanol. Pod wpływem dehydrogenazy alkoholowej ulega on

powolnej przemianie do aldehydu mrówkowego a następnie szybkiej do kwasu mrówkowego, który jest odpowiedzialny za toksyczność metanolu. Kwas mrówkowy ulega akumulacji w organizmie, wywołując ciężką niespotykaną w innych stanach chorobowych kwasicę metaboliczną, potęgowaną przez równoczesną akumulację kwasu mlekowego. Mrówczany powodują uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego. Kwas mrówkowy jest odpowiedzialny również za uszkodzenie narządu wzroku. W wyniku akumulacji w gałce ocznej dochodzi do uszkodzenia siatkówki oraz nerwu wzrokowego i nabłonka rogówki.

10.2.1.2.2. Objawy zatrucia

Pierwsze objawy zatrucia występują stosunkowo późno, tzn. nawet po kilku do kilkunastu godzinach. Dodatkowo czynnikiem opóźniającym wystąpienie objawów zatrucia jest jednoczesne spożycie alkoholu etylowego, który znacznie spowalnia metabolizm alkoholu metylowego.

Podstawowe objawy zatrucia to zaburzenia OUN, przewodu pokarmowego i narządu wzroku. Stopień nasilenia się objawów zatrucia zależy od ilości zakumulowanych mrówczanów.

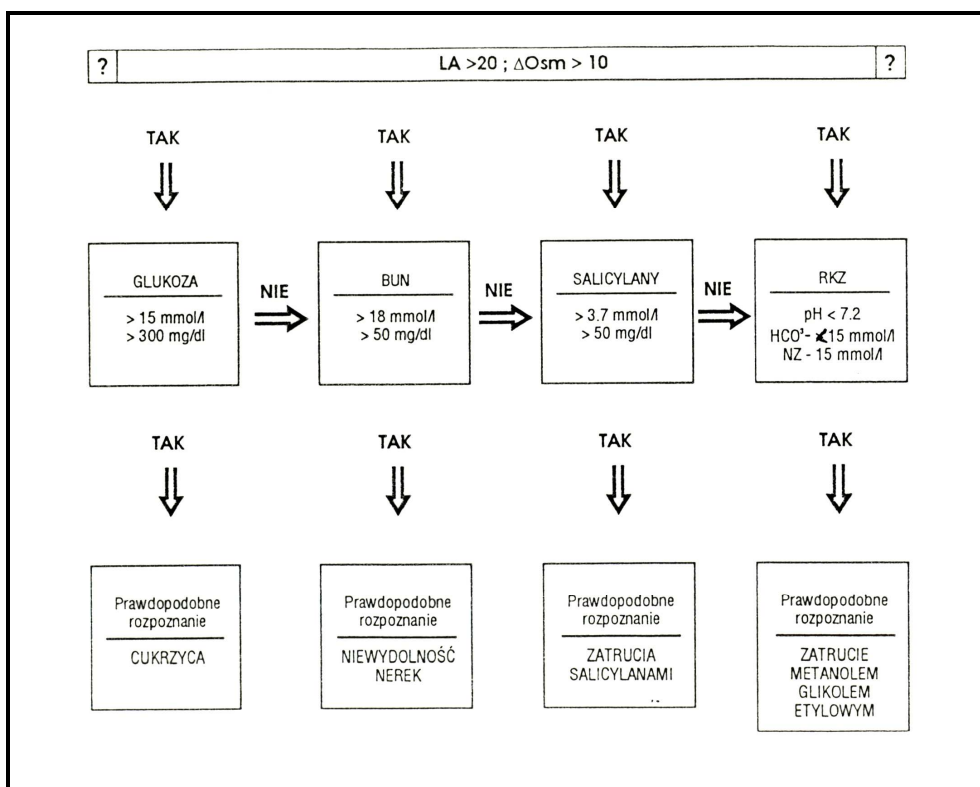
10.2.1.2.3. Diagnostyka laboratoryjna

Do badań podstawowych zaliczamy: badania gazometryczne, stężenia elektrolitów, glukozy, parametry funkcji nerek, aktywność amylazy (zapalenie trzustki w przebiegu zatrucia).

Badaniem potwierdzającym zatrucie metanolem będzie oznaczenie stężenia tego alkoholu we krwi. Oznaczenie metanolu we krwi po 24 godz. z reguły daje wynik negatywny. Potwierdzeniem zatrucia może być ilościowe czy jakościowe oznaczenie metanolu w moczu (śladowe ilości mogą występować w moczu nawet do 72 godz.).

10.2.1.2.4. Diagnostyka różnicowa

U każdego pacjenta w śpiączce z kwasicą metaboliczną, u którego luka anionowa jest powyżej 20, należy brać pod uwagę zatrucie metanolem. Dotyczy to szczególnie pacjentów, którzy trafiają do szpitala po upływie 3 dób i za pomocą badań laboratoryjnych nie stwierdzamy obecności tego alkoholu zarówno we krwi jak i moczu. Należy je różnicować z innymi zatruciami przebiegającymi z kwasicą metaboliczną takimi jak zatrucie glikolem etylenowym, kwasica ketonowa u alkoholików, zatrucia salicylanami, cukrzyca, mocznica (ryc. 10.2).



Ryc. 10.2. Diagnostyka różnicowa zatrucia metanolem i innymi związkami w oparciu o luki anionową i osmolalności

10.2.1.2.5. Leczenie

Podstawowe leczenie zatrucia metanolem obejmuje:

- podtrzymywanie podstawowych funkcji życiowych
- podawanie specyficznych odtrutek hamujących przemianę alkoholu metylowego:
 - Fomepizol (4-metylpirazol) – preferowana odtrutka, jednak ze względu na wysoką cenę jest trudno dostępna.
 - alkohol etylowy. U osób przytomnych podajemy doustnie w postaci 40% roztworu w dawce początkowej 0,7–0,8 mg/kg masy ciała, a następnie w dawce podtrzymującej, od 0,1 do 0,2 ml 95% alkoholu etylowego/kg/godz. w przypadku osób nieprzytomnych etanol możemy podać przez sondę dożołądkowo w dawkach podanych powyżej, lub w infuzji dożylniej 10% roztworu w 5% glukozie. Stężenie etanolu we krwi powinno być utrzymywane w granicach 1-1,5 g/L.

- zwalczanie kwasicy metabolicznej
- przyspieszenie eliminacji. Metodą z wyboru jest hemodializa, którą stosujemy, gdy poziom alkoholu metylowego we krwi przekracza 100 mg/100 mL, występują zaburzenia widzenia oraz, gdy podawanie wodorowęglanów nie wyrównuje kwasicy metabolicznej.

10.2.1.3. Zatrucie glikolem etylenowym

Glikol etylenowy jest stosowany jako rozpuszczalnik w przemyśle farbiarskim i drukarskim. Ponadto jest stosowany do produkcji płynów niezamarzających do chłodziń oraz jako dodatek do płynów do mycia szyb. Doustna dawka śmiertelna wynosi ok. 1,4 mg/kg m.c. W organizmie glikol nie akumuluje się, natomiast gromadzą się jego metabolity, np. kwas szczawiowy i jego sole gromadzą się w nerkach i mózgu.

10.2.1.3.1. Metabolizm glikolu etylenowego

Glikol etylenowy, jako bezbarwna i bezwonna ciecz, dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego. Maksymalne stężenie występuje po 1-2 godz. od momentu spożycia. Metabolizowany jest głównie w wątrobie przy użyciu dehydrogenazy alkoholowej oraz oksydazy aldehydowej. W wyniku przemian powstają kwasy: glikolowy, glioksalowy, szczawiowy oraz mrówkowy. Powstające metabolity wywołują kwasicę metaboliczną. Kwas szczawiowy i jego sole tworzą kryształy w kanalikach nerkowych, prowadząc do ich uszkodzenia. Pozostałe metabolity glikolu również przyczyniają się do rozwoju niewydolności nerek. W wyniku wiązania jonów wapnia przez jony szczawianowe dochodzi do hipokalcemii objawiającej się tężyczką.

10.2.1.3.2. Objawy zatrucia

Glikol etylenowy łatwo wchłania się z przewodu pokarmowego. Początkowe objawy zatrucia to bóle i zawroty głowy, później dołączają się bóle brzucha, wymioty, czasem biegunka. Po okresie pobudzenia przypominającym upojenie alkoholowe, dochodzi do działania depresyjnego na ośrodkowy układ nerwowy i wystąpienia śpiączki z przyspieszonym i pogłębionym oddechem.

10.2.1.3.3. Leczenie

Odrutką w zatruciach glikolem etylenowym jest alkohol etylowy. U osób przytomnych podaje się 50-80 ml 40% alkoholu etylowego. U osób nieprzytom-

nych alkohol etylowy podaje się w stężeniu 5-10% w postaci wlewu dożylnego z 5% glukozą. Konieczne jest zwalczanie kwasicy metabolicznej poprzez podawanie wodorowęglanów lub trisaminolu. W ciężkich zatruciach niezbędne staje się zastosowanie hemodializy.

10.3. Wybrane przypadki ostrych zatruc

Przypadek 10.1, część 1

Pacjentka 40-letnia została przyjęta do szpitala o godz. 24. W momencie przyjęcia była nieprzytomna, w stanie głębokiej śpiączki. Z wywiadu: pacjentka przyjmowała duże dawki paracetamolu i propoxyphenu (narkotyczny analgetyk). Wstępne badania wykazały sinicę i szpilkowate źrenice.

- a. Jakie postępowanie natychmiast podejmiesz?
- b. Jakie badania diagnostyczne zlecisz?

Postępowanie:

Ad. a. Podobnie jak w innych stanach nagłych w leczeniu ostrych zatruc należy kierować się zasadą ABC. Podtrzymanie podstawowych funkcji życiowych ma w zatruciach charakter leczenia objawowego, które jest najważniejszym działaniem terapeutycznym.

Ad. b. Podajemy naloxan, który jest odtrutką w przypadku zatrucia opiatami. Jednocześnie podejmujemy diagnostykę laboratoryjną w celu:

- określenia stężenia paracetamolu we krwi
- określenia funkcji wątroby i nerek

Przypadek 10.1 część 2

Z informacji uzyskanych od męża pacjentki wynikało, że ostatnią dawkę paracetamolu pacjentka przyjęła ok. godz. 20.

Badanie toksykologiczne dało następujący wynik:

- Stężenie paracetamolu we krwi 230 mg/L
Stężenie terapeutyczne: 10-20 mg/L

- c. Jakie postępowanie lecznicze teraz podejmiesz?
- d. W jaki sposób monitorujemy skuteczność leczenia?

Ad. c. Stężenie paracetamolu we krwi powyżej 150 mg/L wskazuje, że powinniśmy podać pacjentce N-acetylocysteinę zgodnie z obowiązującymi procedurami. Czas, jaki upłynął od spożycia ostatniej dawki (krótszy niż 10 godz.) jest też dodatkowym wskazaniem do podania odtrutki.

Ad. d

- kontrolujemy stężenie paracetamolu we krwi
- podajemy płyny w celu zwiększenia diurezy
- kontrolujemy przez 5-6 dób parametry wątrobowe oraz nerkowe.

Przypadek 10.2. Część 1

Pacjent lat 20, zjawił się w Izbie Przyjęć o własnych siłach podając, że przyjął przed 5 godz. około 100 tabletek Polopiryny S.

Badanie fizykalne: pacjent był błądy, pocił się obficie, odczuwał szum w uszach, oddychanie znacznie przyspieszone, pacjent był podniecony i wyraźnie niespokojny.

- a. Jakie postępowanie natychmiastowe podejmiesz?
- b. Jakie badania diagnostyczne zlecisz?

Ad. a

Płukanie żołądka; przy dużych dawkach salicylanów płukanie żołądka możemy zastosować nawet do 12 godz od przyjęcia toksycznej dawki. Dlaczego?

Ad. b

Badania laboratoryjne, które powinniśmy zlecić to: parametry oceniające stan gospodarki kwasowo-zasadowej, elektrolity, oznaczenie stężenia salicylanów we krwi i w moczu.

Maksymalne stężenie salicylanów we krwi – 0,5-1,0 godz.

$T_{1/2}$ 2-4 godz., przy dużych dawkach, kiedy dochodzi do wysycenia metabolicznej drogi eliminacji, wydłuża się do 20-36 godz.

Stężenie terapeutyczne – do 30 mg/L

Przypadek 10.2, część 2

Wyniki badań laboratoryjnych:

Stężenie salicylanów w surowicy – 5,2 mmol/L (71 mg/dL)

Stężenie salicylanów w moczu – 13,2 mmol/L (181 mg/dL)

pH	7,45
pCO ₂	15 mm Hg
HCO ₃	13 mmol/L
NZ	-11 mmol/L
Stężenie potasu	2,8 mmol/L

- c. Jakie zaburzenia RKZ wystąpiły u pacjenta?
- d. Jaka jest Twoja interpretacja wyniku uzyskanego dla potasu?
- e. Jakie postępowanie lecznicze teraz podejmiesz?

Ad.c i d. U pacjenta obserwujemy zasadowicę oddechową częściowo wyrównaną, świadczy o tym również stężenie potasu.

Ad. e

Nawodnienie.

W celu przyspieszenia eliminacji salicylanów z organizmu stosujemy forsowną diurezę z alkalizacją. Kwas salicylowy obniża pH moczu do wartości

ok. 4,5. Przy takim pH, kwas salicylowy występuje w formie niezjonizowanej i około 80% ulega reabsorpcji w nerkach. Alkalizacja moczu do pH ok. 8 odwraca te proporcje i przyspiesza wydalanie salicylanów z organizmu.

Stężenie elektrolitów oraz gazometrię należy oznaczać w zależności od stopnia zatrucia, nawet co dwie godz.

Jeżeli u pacjenta, pomimo właściwego nawodnienia i forsowania diurezy z alkalizacją, występują ciężkie zmiany neurologiczne – śpiączka, pobudzenie, drgawki, objawy obrzęku mózgu, niewydolność nerek, oporna kwasica, obrzęk płuc. Należy podjąć hemodializę. Dializa powinna być kontynuowana aż do spadku stężenia salicylanów poniżej 20 mg/dL.

Przypadek 10.3

Pacjent 45 lat, znaleziony w stanie nieprzytomnym. Z wywiadu wynika, że pacjent pił alkohol od kilku dni. Przy przyjęciu do kliniki był nieprzytomny, w głębokiej śpiączce, bez reakcji na ból. Lewa źrenica rozszerzona i obie źrenice bez reakcji na światło. Brak głębokich odruchów ścięgowych oraz odruchu rogówkowego. Ciśnienie tętnicze: 160/90.

Zaobserwowano wielki oddech Kussmala. W wydychanym powietrzu nie wyczuwano alkoholu.

a. Jakie postępowanie natychmiastowe podejmiesz?

b. Jakie badania diagnostyczne zlecisz?

Ad. a. Zapewnienie drożności dróg oddechowych. W tym przypadku konieczną okazała się intubacja pacjenta.

Ad. b. Zlecono badania oceniające stan gospodarki wodno-elektrolitowej oraz kwasowo-zasadowej oraz oceniające funkcje nerek i stan glikemii. Wyniki są zawarte w poniższej tabeli.

Hematologia/biochemia	Elektrolity	RKZ
Ht – 37%	Na – 147 mmol/L	pH – 6,69
WBC – 15 G/L	K – 4,9 mmol/L	HCO ₃ – 3,0 mmol/L
Glu – 8,2 mmol/L	Cl – 96 mmol/L	NZ – 30,2 mmol/L
kreatynina – 118 μmol/L	Ca – 2,2 mmol/L	O ₂ – 15,6 kPa

Ponadto wykonano:

Badanie PMR: gukoza b.z., białko b.z., leukocyty 4/μL.

Badanie ogólne moczu w dniu przyjęcia – b.z.

W osadzie szczawianów nie stwierdzono.

EKG – migotanie przedsionków

TK głowy – b.z.

c. Jakie jest wstępne rozpoznanie?

d. Jakie postępowanie jest obecnie konieczne?

e. Jakie badania dalsze zlecisz?

Ad. c. Po analizie wyników badań laboratoryjnych i TK, wstępna diagnoza to zatrucie metanolem lub glikolem etylenowym/

Ad. d. Konieczne jest natychmiastowe uzupełnienie niedoboru wodorowęglanów. Wyliczony niedobór wodorowęglanów wynosił 540 mmoli. Pacjentowi podano również digoksynę i przywrócono rytm zatokowy.

Ad. e. Oznaczenie stężenia metanolu i glikolu etylenowego w surowicy:

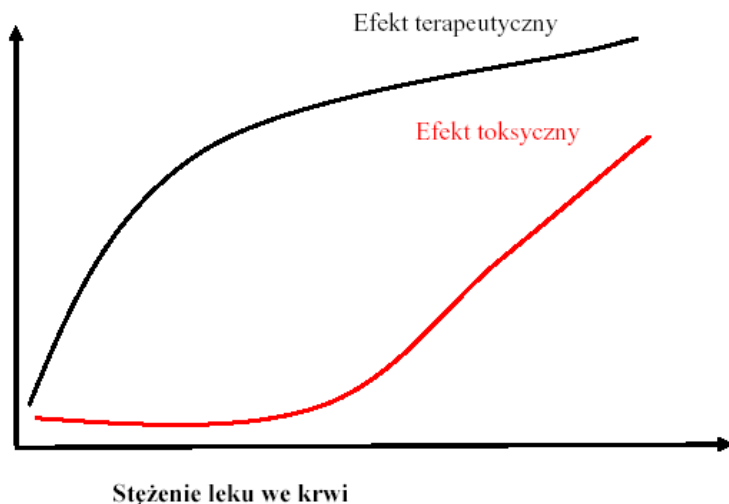
Metanolu nie stwierdzono, natomiast stężenie glikolu etylenowego w surowicy wynosiło 4,5 g/L (stężenie toksyczne – 0,2-0,5 g/L).

Włączono wlew alkoholu etylowego, dawka początkowa – 50 g, a następnie wlew z szybkością 10 g/godz.

Ponadto włączono zabieg hemodializy, który po 4 godz. obniżył stężenie glikolu do 2,4 g/L, a po 8 godz. do 0,8 g/L. W czasie dializy wystąpiła anuria, która utrzymywała się przez dwa tygodnie. Wykonano w tym czasie 8 zabiegów hemodializy.

10.4. Terapeutyczne monitorowanie leków (TML)

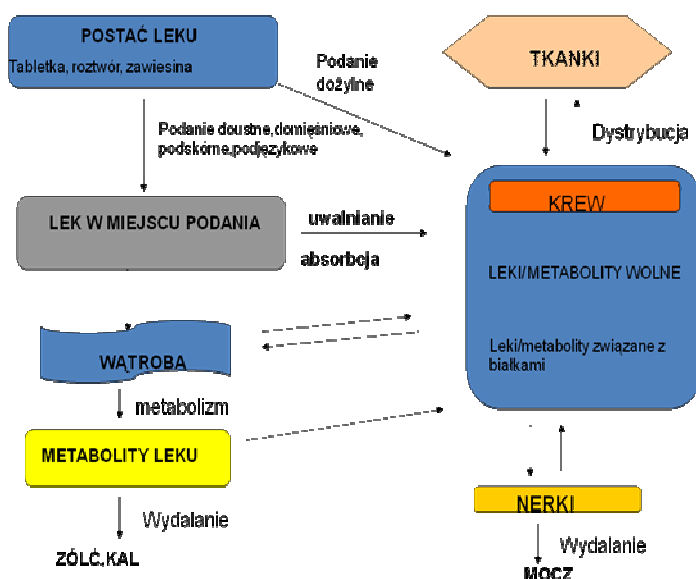
TML można zdefiniować, jako wykorzystanie stężeń leków oznaczanych we krwi do indywidualizacji farmakoterapii. Zastosowanie TML pozwala na tworzenie i kontrolę skutecznych schematów dawkowania leków, które pozwalają na uzyskanie maksymalnego efektu terapeutycznego przy minimalnym efekcie toksycznym (ryc. 10.3). Poznanie kinetyki leku w organizmie jest podstawą tworzenia schematów dawkowania leków.



Ryc. 10. 3. Zależność między stężeniem leku a jego działaniem na organizm

Farmakokinetyka dostarcza narzędzi, które służą do ilościowego, matematycznego opisu leków w organizmie. Pozwala to na ocenę rodzaju przemian leku w organizmie, których ostatecznym efektem jest pojawienie się leku w miejscu działania oraz jego usuwanie z organizmu.

Stężenie leku w organizmie jest wypadkową zachodzących przemian takich jak: wchłanianie, dystrybucja, eliminacja i metabolizm (ryc. 10.4).



Ryc. 10.4. Losy leku w organizmie

Przebieg procesów wchłaniania, dystrybucji i eliminacji jest opisywany przez parametry farmakokinetyczne, które są wyznaczone na podstawie analizy zmian stężenia leku we krwi. Do parametrów tych zaliczamy:

- dostępność biologiczną – jest to część dawki leku, jaka dociera do krążenia systemowego po podaniu pozanaczyniowym, niezbędna do określenia wielkości podawanej dawki
- pozorną objętość dystrybucji (V_d) – jest to hipotetyczna objętość płynów w organizmie, w których lek w stanie stacjonarnym miałby stężenie takie jak zmierzone we krwi
- całkowity klirens leku (Cl) – jest to objętość krwi, z jakiej w jednostce czasu lek jest nieodwracalnie usuwany z organizmu
- biologiczny okres półtrwania ($T_{1/2}$) – wyraża czas, po upływie którego stężenie leku we krwi zmniejszy się o połowę. Obliczenia $T_{1/2}$ odnoszą się do czasu, kiedy lek osiągnął stan równowagi we krwi (po zakończeniu wchłaniania i dystrybucji)

- stałą szybkości eliminacji (K_{el}) – ułamek całkowitej ilości leku w organizmie, usuwany z niego w jednostce czasu.

Parametry charakteryzujące eliminację leku z organizmu, do których zaliczamy Cl , $T_{1/2}$ oraz K_{el} mają zasadnicze znaczenie dla określenia dawek leku oraz przedziału dawkowania, które zapewniają pożądane stężenia leku w organizmie.

10.4.1. Najważniejsze wskazania do monitorowania stężenia leków

Do najważniejszych wskazań należą:

- duże różnice indywidualne w szybkości metabolizmu leku
- stosowanie leków, których eliminacja z organizmu nie podlega prawom kinetyki liniowej, np. Fenytoina czy Aminofilina, ich stężenie we krwi zwiększa się nieproporcjonalnie do wielkości dawki
- niski indeks terapeutyczny
- brak testów klinicznych dla oceny efektywności działania leku
- objawy przedawkowania lub niedodawkowania są nierozróżnialne, wczesne objawy działania toksycznego leku są trudne do rozpoznania
- choroby przewodu pokarmowego, wątroby i nerek
- stosowanie terapii wieloma lekami jednocześnie i możliwe interakcje
- brak oczekiwanego efektu terapeutycznego mimo zastosowania leku zgodnie ze wskazaniami oraz we właściwej dawce
- przewlekłe stosowanie leku w trybie leczenia ambulatoryjnego, podejrzenie braku współpracy pacjenta, nie stosowanie się do zaleceń lekarza.

10.4.2. Grupy leków, których stężenia są monitorowane

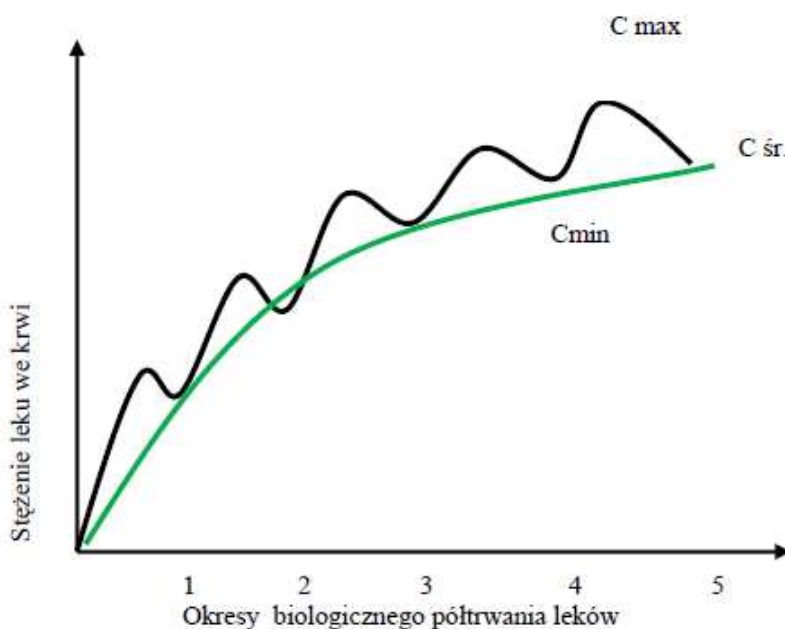
Opierając się na wskazaniach klinicznych wyodrębniono grupy leków, których stosowanie wymaga monitorowania stężenia podczas terapii (tabela 10.4)

Tabela 10.6. Leki, których stężenie we krwi jest monitorowane

Leki nasercowe	Digoksyna, digitoksyna
Leki przeciwartmyczne	Amiodaron, meksyletyna, lidokaina, chinidyna, prokainamid /N-acetyloprokainamid
Leki przeciwastmatyczne	Teofilina
Leki przeciwpadaczkowe	Fenytoina, fenobarbital, kwas walproinowy

Leki nasercowe	Digoksyna, digitoksyna
Antybiotyki	Aminoglikozydowe (gentamycyna, amikacyna, tobramycyna, netylmycyna), wankomycyna
Leki immunosupresyjne	Cyklosporyna A, takrolimus, sirolimus
Leki przeciwnowotworowe	Metotreksat
Leki przeciwdepresyjne	Trójcykliczne antydepresyjne

10.4.3. Kiedy rozpoczynamy TML?



Ryc. 10.5. Zmiany stężenia leku we krwi podczas przewlekłego dawkowania leku

Przy wielokrotnym podawaniu leku pomiar stężenia prowadzi się po osiągnięciu stanu stacjonarnego, tzn. gdy ustali się równowaga pomiędzy szybkością wprowadzanego leku do organizmu, a szybkością jego eliminacji. W stanie stacjonarnym stężenie leku w tkankach nie ulega zmianie, a stężenia leku mierzone w jednakowych punktach czasowych przedziału dawkowania pozostają na stałym poziomie. Stan stacjonarny ustala się zwykle po upływie 4-5 biologicznych okresów półtrwania leku i po tym czasie zwykle rozpoczynamy TML.

10.4.4. Pobieranie próbek krwi w TML

Do oznaczania stężenia leków wykorzystujemy zarówno krew pełną jak i osocze oraz surowicę. Informacja o rodzaju materiału biologicznego, wykorzystywanego do oznaczania stężenia leku powinna trafić do użytkowników badań. Należy zaznaczyć, że przy oznaczaniu stężenia leków, podobnie jak i w innych badaniach laboratoryjnych, należy wykonać wszystkie czynności składające się na fazę przedanalityczną zgodnie z wystandardyzowanymi procedurami. Bardzo ważne w TML jest ściśle przestrzeganie właściwego czasu pobierania próbek krwi. Czas pobierania krwi powinien być dostosowany do schematu dawkowania leku oraz postaci farmaceutycznej leku i drogi jego podania.

TML powinno się rozpocząć po osiągnięciu stanu stacjonarnego, zazwyczaj po 4-5 okresach biologicznego półtrwania leku. W przypadku większości leków oznacza się minimalne stężenie w przedziale dawkowania w saniu stacjonarnym, pobierając próbkę krwi bezpośrednio przed podaniem kolejnej dawki leku. W niektórych przypadkach oznacza się stężenie maksymalne leku w przedziale dawkowania, pobierając próbki krwi żyłnej 30 min po podaniu dożylnym lub 30-60 min po podaniu domięśniowym. Stosunkowo rzadko stosujemy stężenie maksymalne w przypadku leków podawanych doustnie. Osiągnięcie stężenia maksymalnego w tym przypadku zależy od formulacji farmaceutycznej leku oraz wielu innych czynników takich, jak: jednoczesne spożycie pokarmu, niewydolność serca. Wyjątek stanowi cyklosporyna A. Terapeutyczne monitorowanie cyklosporyny A prowadzi się za pomocą trzech próbek, a mianowicie: za pomocą próbki przed podaniem kolejnej dawki leku (C_0) oraz próbek pobranych w 2 (C_2) i 4 (C_4) godzinie po podaniu leku.

10.4.5. Jak wyznaczamy dawkę obciążającą leku?

Do czasu uzyskania stanu stacjonarnego leku, podajemy dawkę obciążającą (inicjującą), którą wyliczamy na podstawie parametrów farmakokinetycznych leku wg wzoru:

$$\text{Dawka obciążająca} = C_p \times V_d / f$$

gdzie:

C_p – stężenie pożądane leku

V_d – pozorna objętość dystrybucji

f – dostępność biologiczna leku.

Po osiągnięciu stanu stacjonarnego zmieniamy dawkę na podtrzymującą, która stanowi 50% dawki obciążającej.

10.4.6. Przypadki kliniczne

Przypadek 10.4

72-letni mężczyzna o wadze 60 kg przeszedł operację naprawy zastawki serca. Długotrwała choroba spowodowała słaby przepływ krwi, w wyniku czego nastąpiło uszkodzenie nerek. Klirens nerkowy Cl_T spadł do 50 mL/min. Dzień po zabiegu temperatura ciała wzrosła do 38,5°C. Badania mikrobiologiczne krwi wykazały infekcję organizmu przez *Staphylococcus aureus*. Antybiogram wskazał na zastosowanie w leczeniu wankomycynę, która minimalne stężenie inhibitorowe wykazywała na poziomie 15 mg/L.

Obliczenie dawki obciążającej (D_o):

$$C_p = 30 \text{ mg/L}, \tau = 6 \text{ h}, V_d = 0,5 \text{ L/kg}, f = 1,0$$

$$D_o = \frac{C_p \times V_d}{f} = 15 \text{ mg/kg}$$

Obliczenie skorygowanego czasu biologicznego półtrwania (τ_s):

$$\tau_s = \frac{D_o \times f}{C_p \times Cl_T} = 600 \text{ min (10 h)}$$

Przypadek 10.5

10-letni chłopiec został przyjęty do szpitala z powodu napadów padaczkowych, które w ostatnim czasie stały się częstsze, mimo stosowania w leczeniu ambulatoryjnym dość dużych dawek karbamazepiny (600 mg/dobę) i fenytoiny (250 mg/dobę). W chwili przyjęcia zmierzone stężenie karbamazepiny w surowicy wynosiło 4,26 mg/L (było bliskie dolnej granicy stężeń terapeutycznych wynoszących dla tego leku 4-10 mg/L). Po stopniowym odstawieniu fenytoiny i utrzymaniu tej samej dawki karbamazepiny zaobserwowano wzrost stężenia tego leku do 7,21 mg/L i ustąpienie napadów padaczkowych.

Jeżeli oznaczone stężenie leku w stanie stacjonarnym nie odpowiada wartościom terapeutycznym, a stan chorego nie ulega poprawie, nową dawkę karbamazepiny można obliczyć z równania:

$$D_{\text{nowa}} = D_{\text{stosow.}} \cdot \frac{C_{\text{żądane}}}{C_{\text{zmierzone}}}$$

Komentarz:

Zastosowanie TDM pozwoliło stwierdzić wystąpienie interakcji farmakokinetycznej – fenytoina indukowała metabolizm karbamazepiny. Dzięki TDM dość często udaje się zastąpić leczenie skojarzone padaczki monoterapią.

11. TRANSFUZJOLOGIA. BADANIA LABORATORYJNE W ZAPOBIEGANIU I DIAGNOSTYCE POWIKŁAŃ POPZRZETOCZENIOWYCH

Anna Raszeja-Specht

Przed podjęciem decyzji o podaniu krwi lub przetoczeniu preparatów krwiopochodnych należy uwzględnić aktualną wiedzę na temat metod pobierania, preparatyki krwi, zasad dobierania krwi do przetoczeń (w tym – podstawy immunohematologiczne, opisane w I tomie skryptu) oraz wszelkie czynniki dotyczące chorego – jego stan kliniczny, w tym rodzaj i ciężkość schorzenia, a zatem wynikające z tego wskazania do podania określonych preparatów. Transfuzjologia kliniczna rozwija się razem z innymi dziedzinami medycyny i pośrednio wchodzi w ich skład, dając teoretyczne podstawy przetoczeń w ostrych i przewlekłych krwawieniach, u pacjentów z oddziałów chirurgii, traumatologii, ginekologii, hematologii, neonatologii i pediatrii. Osobnym problemem jest przetaczanie krwi u biorców komórek krwiotwórczych oraz u biorców narządów.

Wprowadzanie nowych metod i zaleceń dotyczących krwiolecznictwa wymaga odpowiedniego przestrzegania i nadzorowania procedur związanych z przetaczaniem. Podawanie krwi i preparatów krwiopochodnych niesie w sobie szereg elementów ryzyka powikłań potransfuzyjnych, dlatego powinno być ograniczone do przypadków koniecznych – ratowania życia i poprawy zdrowia. W każdym szpitalu obecnie funkcjonuje system zapewnienia jakości, który szczegółowo opisuje procedury związane z procesami przetaczania. Oczywiście podstawą rozwiązania problemów jest współpraca z Regionalnymi Centrami Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, które odpowiadają za jakość preparatów dostarczanych do szpitala oraz wyjaśniają ewentualne przyczyny powikłań okołotransfuzyjnych.

Przedstawione poniżej przykłady pozwalają na praktyczne wykorzystanie wiadomości merytorycznych, zawartych w poniższym rozdziale oraz w odpowiednim rozdziale tomu I (rozdział 2 „Badania immunohematologiczne w transfuzjologii”).

11.1. Wczesne powikłania poprzetoczeniowe

W piśmiennictwie spotyka się różne podziały powikłań poprzetoczeniowych, uwzględniające:

- **czas** (wczesne i późne),
- **mechanizm powstawania** (immunologiczne i nieimmunologiczne),
- **możliwość wywoływania hemolizy** (hemolityczne i niehemolityczne)
- oraz mniej lub bardziej nasilone **objawy kliniczne** (lekkie i ciężkie).

Tabela 11.1. Powikłania poprzetoczeniowe immunologiczne - wczesne i późne

Efekt	Prawdopodobna przyczyna
Wczesny	
Ostry odczyn hemolityczny	Alloprzeciwciała biocydy lub przeciwciała dawcy
Odczyn gorączkowy (niehemolityczny)	Obecność krwinek białych w preparacie
Ostra poprzetoczeniowa niewydolność płuc (TRALI)	Obecność krwinek białych lub cytokin
Reakcja alergiczna (wysypka, rumień, pokrzywka)	Białka osocza, alergeny we krwi dawcy
Reakcja anafilaktyczna	Przeciwciała anti-IgA
Późny	
Opóźniony odczyn hemolityczny	Alloprzeciwciała biocydy lub przeciwciała dawcy
Alloimmunizacja	Antygeny krwinek czerwonych, białych (HLA), płytek (HPA)
Poprzetoczeniowa skaza płytkowa	Przeciwciała przeciw płytkowe
Poprzetoczeniowa choroba przeszczep p-gospodarzowi (TA-GvHD)	Limfocyty T Niezdolność w układzie HLA

Tabela 11.2. Powikłania poprzetoczeniowe nieimmunologiczne – wczesne i późne

Efekt	Prawdopodobna przyczyna
Wczesny	
Przeciążenie krążenia (TACO)	Przetoczenie dużej objętości krwi u pacjenta z obniżoną wydolnością serca
Posocznica poprzetoczeniowa	Zakażenie bakteryjne
Hipotensja	Efekt działania bradykininy podczas stosowania inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę (ACE)
Ból w czasie przetoczenia	Nieznana
Zator powietrzny, płytkowy	Powietrze w zestawie do przetoczeń, mikroagregaty płytkowe
Hemoliza nieimmunologiczna	Uszkodzenie krwinek: mechaniczne, termiczne, osmotyczne, polekowe
Hipotermia	Szybkie przetoczenie zimnej krwi; problem kardiologiczny -arytmia
Hiperkaliemia	Uwalnianie potasu z komórek
Hipokalcemia	Toksyczne działanie cytrynianu, wiązanie wapnia
Tendencja do krwawień	Masywna transfuzja
Późny	
Przeciążenie żelazem – hemosyderoza	Liczne transfuzje
Przeniesienie czynników zakaźnych	Zanieczyszczenia krwi dawcy

W tabelach 11.1 i 11.2 zestawiono podstawowe powikłania immunologiczne i nieimmunologiczne, występujące w czasie lub po transfuzji.

Pod pojęciem wczesnych powikłań należy rozumieć te, które pojawiły się do 24 godzin od transfuzji, natomiast późne – to powikłania występujące w drugiej i następnych dobach po przetoczeniu.

Wśród objawów klinicznych, towarzyszących ostrym reakcjom poprzetoczeniowym, należy wymienić gorączkę, dreszcze, bóle (w miejscu wkłucia, w klatce piersiowej, bóle brzucha, mięśni), wahania ciśnienia tętniczego, zaburzenia oddychania, zmiany skórne (pokrzywka, rumień, świąd, obrzęki), nudności, wymioty, ciemne zabarwienie moczu, krwawienia i objawy skazy krwotocznej.

Przypadek 11.1

Pacjentowi lat 48, z oddziału chirurgii ogólnej, oznaczono w laboratorium grupę krwi: **A Rh (+)**. Po południu, z powodu nagłego krwawienia, zlecono wykonanie próby zgodności dla 2 jednostek koncentratu krwinek czerwonych (KKCz) jednoimiennych.

Z powodu problemów technicznych z pobraniem krwi z żyły, wykonano próbę krzyżową z tej samej próbki krwi, z której rano wykonano oznaczenie grupy krwi. Wydano do przetoczenia krew na podstawie zgodnego wyniku próby krzyżowej. Po przetoczeniu około 30 ml krwi wystąpiły objawy wstrząsu poprzetoczeniowego. Transfuzję przerwano.

Komentarz: Wykonane badania kontrolne stwierdziły **przetoczenie krwi obcogrupowej**, ponieważ jak wykazały badania kontrolne, pacjent miał grupę krwi **O Rh (-)**. Kontrola wydanych wyników grup krwi wykazała niewłaściwe oznakowanie pobranych próbek krwi. Jest to jeden z podstawowych błędów, prowadzących do przetoczenia krwi niezgodnej w zakresie grup głównych. Najważniejsze błędy, jakie mogą prowadzić do przetoczenia krwi niezgodnej, zestawiono w tabeli 11.3.

Za każdy zabieg przetoczenia krwi i jej składników odpowiedzialny jest osobiście lekarz zlecający transfuzję. Do jego zadań należy:

- Ustalenie wskazań do przetoczenia krwi lub jej składników
- Identyfikacja biorcy i kontrola dokumentacji przed przetoczeniem
- Nadzór nad przetoczeniem
- Prowadzenie dokumentacji przetoczenia
- Sporządzenie raportu o nieprzewidzianych zdarzeniach, szczególnie o błędach i powikłaniach, jakie obserwowane są w czasie i/lub po przetoczeniu, i mogą być wynikiem transfuzji krwi lub jej preparatów.

Sam zabieg przetoczenia nadzoruje odpowiednio przeszkolona pielęgniarka, a jej zadaniem jest:

- Pobranie próbek krwi od pacjenta
- Identyfikacja biorcy i kontrola dokumentacji przed przetoczeniem

- Obserwacja pacjenta w czasie przetoczenia i informowanie lekarza o wszelkich niepokojących objawach w trakcie i po przetoczeniu.

Tabela 11.3. Podstawowe błędy towarzyszące zabiegom transfuzji

Rodzaj błędu	Zagrożenia dla biorcy	Miejsce powstania błędu
Nieprawidłowa identyfikacja chorego	Przetoczenie krwi niezgodnej grupowo Ryzyko wystąpienia powikłań potransfuzyjnych	Oddział
Pobranie krwi od niewłaściwej osoby		Oddział
Błąd w zamówieniu krwi/preparatu		Oddział/lekarz
Niewłaściwe oznakowanie próbki	Błędne wyniki badań	Oddział/laboratorium
Przekroczenie czasu między wykonaniem próby zgodności a przetoczeniem	Ryzyko wystąpienia opóźnionej reakcji hemolitycznej	Oddział
Niepotrzebne zlecenie transfuzji	Niepotrzebne zużycie preparatów krwiopochodnych; narażenie pacjenta na niepotrzebne ryzyko	Oddział/lekarz
Niewykrycie istotnych przeciwciał	Ryzyko wystąpienia powikłań potransfuzyjnych	Laboratorium

Jeżeli powikłanie pojawia się w czasie transfuzji, należy:

- Przerwać przetoczenie
- Utrzymać dostęp do żyły przez podłączenie wlewu 0,9% NaCl w nowym miejscu
- Powiadomić Bank Krwi (jednostkę wewnątrzszpitalną lub inną odpowiadającą – RCKiK)
- Pobrać od pacjenta dwie próbki krwi – „na skrzep” i na antykoagulant EDTAK₂
- Zabezpieczyć: pojemnik z krwią i zestaw do przetaczania
- Pobrać próbkę moczu (przy podejrzeniu odczynu hemolitycznego)
- Pobrać krew na posiew (przy podejrzeniu odczynu bakteryjnego)
- Wypełnić odpowiedni kwestionariusz („Powikłanie poprzetoczeniowe”) i przesłać do RCKiK wraz z pozostałymi zabezpieczonymi materiałami, użytymi do transfuzji.

Informacje o przebiegu przetoczenia oraz powikłaniach powinny zostać odnotowane w historii choroby, księdze transfuzyjnej i karcie informacyjnej chorego przy wypisie ze szpitala.

Przypadek 11.2

Dwoje dzieci w wieku lat 2 i 1,5 roku, przebywające na oddziale chirurgii z powodu oparzeń I oraz II stopnia, po oznaczeniu grupy krwi: **O Rh (+)** i **B Rh (+)** oraz po wykonaniu prób krzyżowych, otrzymały obcogrupową krew. Dziecku z grupą **B Rh (+)** przetoczono krew dawcy **O Rh (+)** bez objawów wstrząsu. Natomiast u dziecka **O Rh (+)**, po podaniu około 20 mL krwi **B Rh (+)**, wystąpiły objawy wstrząsu.

Komentarz: Zgodnie z procedurą, dwie dyżurujące pielęgniarki porównały wprawdzie dane serologiczne pacjentów i preparatów, ale nie w sali chorych, a w dyżurce pielęgniarskiej. Następnie przetoczyły dzieciom niewłaściwą krew.

Po wyprowadzeniu ze wstrząsu i dalszym leczeniu oparzeń dziecko wypisano do domu w ogólnym stanie dobrym.

Przypadek 11.3

Dwie chore: lat 38 z **B Rh (+)** i lat 59 z **O Rh (+)** przebywające na oddziale ginekologicznym, otrzymały obcogrupowy KKCz pomimo prawidłowych wyników badań serologicznych:

- chorej z grupą **B Rh (+)** przetoczono, bez objawów wstrząsu, 1 jednostkę KKCz grupy **O Rh (+)**, natomiast
- chorej z grupą **O Rh (+)**, przetoczono 1 jednostkę KKCz grupy **B Rh (+)**.

Pacjentka z grupą **O Rh (+)** w czasie zabiegu operacyjnego otrzymała 1 jednostkę KKCz jednoimiennego, a następnie zgodnie z zaleceniem lekarskim, kolejną jednostkę krwi. Tym razem przetaczano jej krew obcogrupową, grupy **B Rh (+)**, przeznaczoną dla pierwszej chorej. Wobec pojawienia się niepokojących objawów (dreszcze, pobudzenie) już po przetoczeniu około 10 mL krwi, wezwano lekarza dyżurnego, który podejrzewając „odczyn gorączkowy na krew” przerwał przetoczenie i podał leki przeciwwstrząsowe.

Po około 30 min stan chorej poprawił się, ale zaobserwowano „intensywne broczenie z rany”. W związku z tym lekarz dyżurny zlecił kontynuowanie przerwanego przetoczenia. W pooperacyjnym znieczuleniu ogólnym założono szew hemostatyczny. W czasie przewożenia chorej na salę operacyjną, ze względów technicznych, przerwano przetaczanie, a następnie po raz trzeci podłączono krew obcogrupową. Pomyłkę zauważono dopiero wtedy, gdy wskutek obfitego krwawienia zamówiono kolejne jednostki krwi w laboratorium, które stwierdziło obcogrupowe przetaczanie.

Komentarz: Wystąpił ostry odczyn hemolityczny, wywołany przetoczeniem krwi obcogrupowej. Mimo intensywnego leczenia i przetoczenia wymiennego chorej nie udało wyprowadzić się ze wstrząsu.

Częstość występowania ostrego odczynu hemolitycznego oceniana jest na 1:25 tysięcy przetaczanych jednostek krwi. Śmiertelność chorych z ostrym

odczynnem hemolitycznym nie jest w pełni znana, a ryzyko śmierci jest oceniane na około 1:100-200 tysięcy przetoczeń. Większość ostrych powikłań hemolitycznych jest wynikiem przetoczenia krwi niezgodnej w układzie grup głównych (ABO), a niszczenie krwinek w tych przypadkach przebiega wewnątrznaczyniowo, dając obraz laboratoryjny charakterystyczny dla hemolizy wewnątrznaczyniowej (hemoglobinemia i hemoglobinuria, hiperbilirubinemia, wzrost LDH). Hemoliza zewnątrznaczyniowa jest najczęściej wynikiem obecności przeciwciał z układu Rh, Kidd i Duffy, i często powoduje stopniowo narastające objawy niedokrwistości.

Wśród powikłań prowadzących do zgonu, na pierwszym miejscu wymienia się odczyn hemolityczny, następnie ostrą poprzetoczeniową niewydolność płuc (TRALI) i przeciążenie krążenia (TACO). Różnicowanie TRALI i TACO jest trudne, ponieważ w obu powikłaniach występuje obrzęk płuc, a pozostałe objawy kliniczne są mało specyficzne i niejednoznaczne. Z badań laboratoryjnych wykorzystywane może być oznaczenie mózgowego peptydu natriuretycznego (BNP), stosowane w kardiologii do oceny niewydolności serca. TACO charakteryzuje podwyższenie BNP (1,5-2-krotne), podczas gdy w TRALI wynik oznaczenia BNP jest prawidłowy.

11.2. Późne powikłania poprzetoczeniowe

Przetoczenie składników komórkowych krwi oraz osocza umożliwia kontakt układu immunologicznego biorcy z setkami obcych antygenów. Alloprzeciwciała skierowane przeciw krwinkom czerwonym, powodują ich hemolizę, a przeciwciała przeciw antygenom leukocytów mogą wywołać odczyn gorączkowy i skrócić czas przeżycia przetoczonych granulocytów. Alloimmunizacja antygenami HLA lub swoistymi antygenami płytkowymi, może prowadzić do niszczenia krwinek płytkowych i oporności na przetaczanie koncentratów płytkowych. Przetoczenie może powodować zaburzenia ujawniające się po kilku a nawet kilkunastu dniach, i nie zawsze kojarzone jest z przebytymi transfuzjami (tabela.11.1).

Przypadek 11.4

Pacjentce lat 41, grupa krwi **O Rh (+)**, leczonej na oddziale chirurgii, zamówiono krew do przetoczenia i wykonano próbę zgodności serologicznej dla trzech dawców jednoimiennego koncentratu krwinek czerwonych (KKCz), po 350 mL.

Dwie jednostki skrzyżowanej krwi przetoczono tuż po zabiegu. Przetoczenie trzeciej jednostki KKCz rozpoczęto w ciągu trzeciej doby po wykonaniu próby zgodności serologicznej. Po przetoczeniu około 30 mL wystąpiły objawy wstrząsu.

Kontrola badań serologicznych wykonana z krwią pacjentki pobraną po przerwaniu przetaczania ostatniej jednostki krwi, wykazała obecność przeciwciał odpornościowych a-Le^a oraz brak zgodności serologicznej z jednym z dawców KKCz przetoczonej tuż po zabiegu oraz z dawcą KKCz przetaczanego w ciągu trzeciej doby od wykonania próby krzyżowej.

Kontrola badań serologicznych wykonana z krwią pacjentki pobraną przed zabiegiem – prawidłowa.

Komentarz: Ze szczegółowej analizy historii choroby wynikało, że pacjentka miała kilkakrotnie przetaczaną krew około pół roku przed obecnym zabiegiem oraz, że w tym czasie stwierdzono w jej surowicy obecność przeciwciał a-Le^a. Nie poinformowano o tym laboratorium, które dobierało krew do przetoczenia. Należy pamiętać, że wynik próby krzyżowej jest ważny przez 48 godzin od momentu wykonania badania w laboratorium.

Przypadek 11.5

Chory lat 35, **B Rh(+)**, leczony na oddziale chirurgicznym, otrzymał po wykonaniu badań serologicznych 2 jednostki KKCz po 350 mL.

W drugiej dobie po przetoczeniu w badaniach laboratoryjnych stwierdzono:

Badania podstawowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
RBC	3,18	4,5-6,5	G/L
HGB	9,0	12-16	g/dL
Ht	25,1	40-52	%

W związku z tym zamówiono i przetoczono, po wykonaniu badań serologicznych, kolejną jednostkę jednoimiennego KKCz. Przetoczenie również nie zmieniło badań morfologicznych, a stan pacjenta systematycznie pogarszał się.

Czwartego dnia po przetoczeniu obserwowano u pacjenta zmiany parametrów morfologicznych:

Badania podstawowe	Wynik	Zakres wartości referencyjnych	Jednostki
RBC	3,25	4,5-6,5	G/L
HGB	10,1	12-16	g/dL
Ht	28,8	40-52	%
Bilirubina	2,8	do 1.0	mg/dL
Mocznik (BUN)	32	10-20	mg/dL

Nie łączono przedstawionych powyżej obserwacji z wykonanymi wcześniej przetoczeniami krwi i dwa dni później przetoczono kolejną (czwartą) jednostkę jednoimiennego KKCz.

Wykonane następnego dnia kontrolne badania serologiczne z próbek krwi pacjenta pobranych na próbę krzyżową do 2 ostatnich transfuzji wykazały obecność przeciwciał odpornościowych z układu Kidd: anty-Jk^a. Przeciwciała te nie zostały wykryte przez pracownię serologiczną w czasie wykonania prób krzyżowych.

Komentarz: Opóźniony odczyn hemolityczny występuje pomiędzy 2. a 28. dniem po przetoczeniu, a w pojedynczych przypadkach może być obserwowany nawet później. Cechą charakterystyczną jest brak możliwości wykrycia przeciwciał w próbkach pobranych przed transfuzją, natomiast wykrywa się je w różnym czasie po przetoczeniu krwi. Obserwowane zjawisko jest wynikiem tzw. wtórnej odpowiedzi immunologicznej, która wynika z wcześniejszego kontaktu biorcy z określonym antygenem. W chwili wykonywania badań pacjent ma niskie miano przeciwciał (tzw. „okienko” diagnostyczne). Podana krew pobudza komórki pamięci biorcy i stymuluje wytwarzanie alloprzeciwciał skierowanych przeciwko odpowiednim antygenom na komórkach biorcy. Objawy kliniczne są przeważnie łagodniejsze i wynikają z zewnątrznaczyniowego niszczenia krwinek. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się najczęściej objawy łagodnej niedokrwistości, z obniżeniem stężenia hemoglobiny i podwyższeniem bilirubiny.

Nie wszystkie przeciwciała, skierowane przeciwko antygenom krwinek czerwonych, powodują ich uszkodzenie i odczyn hemolityczny. Stąd wynika klasyfikacja przeciwciał – na istotne bądź nieistotne klinicznie. Do grupy istotnych klinicznie (swoistych) zalicza się m.in. przeciwciała przeciw antygenom z układów ABO, Rh, Duffy, Kell, Kidd, oraz MNS i szereg innych. Należy jednak pamiętać, że obok swoistości, wrażliwość na działanie przeciwciał może zależeć od ich stężenia, amplitudy cieplnej, przynależności do klasy/podklasy immunoglobulin, zdolności wiązania dopełniacza, oraz liczby i gęstości antygenów na krwince biorcy. Dlatego przeciwciała uznane za ważne klinicznie powodują odczyn poprzetoczeniowy jedynie u niektórych biorców. Mimo starannie dobranych i przeprowadzonych badań, u części chorych, u których wystąpił odczyn hemolityczny, nie wykrywa się żadnych przeciwciał – ani przed przetoczeniem, ani po przetoczeniu. Może to wynikać z niedoskonałości rutynowo stosowanych metod badawczych.

11.3. Powikłania związane z masywną transfuzją

Powikłania poprzetoczeniowe mogą być wynikiem tzw. „masywnej transfuzji”, czyli podjęcia działań mających na celu uzupełnienie masywnej utraty krwi. W chirurgii funkcjonuje szereg definicji, mających znaczenie praktyczne przy określaniu utraty krwi, uwzględniających szybkość i wielkość utraty. Pojęcie „masywna transfuzja” oznacza przetoczenie 1 objętości krwi krążącej (70 mL/kg. m. c.) lub konieczność przetoczenia 10 jedn. KKCz w ciągu 24 godzin. Powikłania potransfuzyjne mogą być spowodowane koagulopatią,

hipotermią i zaburzeniami metabolicznymi i wynikają m. in. ze zmian, jakie zachodzą w KKCz w trakcie przechowywania (przykładowo – masywne przetoczenie świeżych preparatów krwi może nie powodować ww. powikłań).

Przyczyny tego rodzaju zaburzeń i ich wpływ na stan pacjenta przedstawiono w tabeli 11.4.

Tabela 11.4 Powikłania po masywnej transfuzji

Mechanizm	Możliwe powikłania
Starzenie się krwinek czerwonych i hemoliza	Hiperkalemia, hiperamonemia, ew. kwasica, zaburzenia transportu tlenu
Niedobory czynników krzepnięcia i płytek – efekt rozcieńczenia	Koagulopatia – niedobór fibrynogenu, czynników V i VIII, trombocytopenia; 1,5-krotne przedłużenie APTT i PT (wskazania do przetoczenia FFP)
Przetoczenie krwi o temp. 4°C – spadek ciepłoty ciała o 1°C/ 4 jedn. KKCz	Hipotermia
Przetoczenie dużych objętości cytrynianu	Alkaloza / hipokalemia
Toksyczne działanie cytrynianu	Hipokalcemia, hipomagnezemia

Tzw. „śmiertelna triada” – połączenie koagulopatii, kwasicy i hipotermii, prowadzi do zgonu pacjenta. W związku z tym zaleca się monitorowanie stanu pacjenta poprzez wykonywanie badań laboratoryjnych – oznaczanie morfologii (istotne: Hb/Ht oraz liczba PLT), wykonywanie gazometrii, oznaczenia potasu oraz czasów: APTT i PT.

11.4. Czynniki zakaźne przenoszone przez krew

W większości krajów wykonuje się badania przeglądowe dawcy przed każdym oddaniem krwi, w celu uniknięcia przeniesienia czynników zakaźnych na biorcę. Podstawowe czynniki oznaczane we wszystkich krajach, to: wirusy HBV, HCV i HIV oraz krętek błady. W niektórych krajach przeprowadza się badania dodatkowo w kierunku wirusa HTLV, wirusa Zachodniego Nilu oraz brucelozę. W wielu krajach oznacza się przeciwciała anty-CMV. Badanie aktywności transaminazy alaninowej (ALT) ma na celu wykluczenie dawcy potencjalnie zakażonego nieznanym czynnikiem hepatotropowym, a warunkiem wykluczenia jest podwójne przekroczenie wartości referencyjnej. Do badań przeciwciał anty-HCV i anty-HIV, oraz antygenu HBsAg wykorzystywane są techniki serologiczne, a techniki biologii molekularnej (NAT) wykrywają materiał genetyczny wirusów.

Czynniki zakaźne: wirusy, bakterie, pierwotniaki i priony przenoszone przez krew, mogą być przyczyną istotnych powikłań poprzetoczeniowych u biorców zakażonych składników krwi.

Najczęściej stwierdza się obecność wirusów:

- hepatotropowych – wirusy zapalenia wątroby typu A, B i C (HAV, HBV, HCV)
- retrovirusów – wirusy nabytego upośledzenia odporności (HIV1 i HIV2) oraz wirusy ludzkiej białaczki T-komórkowej (HTLV1 i 2)
- wirusy herpes – cytomegalii (CMV), Epsteina-Barr (EBV)
- erytrowirusy – ludzkie parwowirusy B19
- inne – wirus Zachodniego Nilu, wirus Denque

Najczęściej wykrywanie pierwotniaki, to:

- *Plasmodium* (malaria)
- *Toxoplasma gondii* (toksoplazmoza)
- *Babesia* (babeszjoza)
- *Leishmania spp.* (leiszmanioza)

Ryzyko przeniesienia ww. czynników zakaźnych zależy od sytuacji epidemiologicznej w danym kraju, przebiegu zakażenia oraz biologicznych własności czynnika. Przykładowo, zakażenia niektórymi wirusami herpes (EBV, CMV) ma za sobą duża część dorosłej populacji czyli potencjalnych dawców. Wirusy typu *herpes* są obecne w leukocytach, gdzie przechodzą w stan uśpienia, nie powodując objawów zakażenia. Największym zagrożeniem dla biorców są wirusy HCV, HBV i HIV, dlatego w transfuzjologii najistotniejsze jest wykrycie przewlekłego nosicielstwa antygenu HBs (wykrywanie antygenu we krwi dawcy) oraz HCV (wykrywanie przeciwciał oraz RNA wirusa w surowicy dawcy). Podstawowe metody, stosowane w celu wykrywania czynników zakaźnych w transfuzjologii, zestawiono w tabeli 11.5.

Tabela 11.5 Metody stosowane dla ograniczenia ryzyka przeniesienia czynników zakaźnych przez przetoczenie

Działania	Metody
Kwalifikacja dawców	Wywiad lekarski i epidemiologiczny, badania lekarskie
Badania przeglądowe przed oddaniem krwi	Testy serologiczne i molekularne (HBV, HCV, HIV, krętek błady), Oznaczanie aktywności ALT (obecnie rzadko)
Karencja składników krwi	Obserwacja przez 16 tygodni – wykluczenie „okienka serologicznego”
Minimalizacja błędów ludzkich	Właściwa organizacja pobrania materiału (systemy zamknięte, oznakowania kodami paskowymi itp.), automatyzacja oznaczeń, komputeryzacja
Nadzór nad procedurami w placówkach służby krwi	Wytyczne i protokoły postępowania, regularny nadzór i kontrola
Inaktywacja czynników zakaźnych w materiałach, w których jest to możliwe	Metody fizyczne, chemiczne, fotodynamiczne i fotochemiczne

Należy pamiętać, że wprowadzenie czułych i specyficznych metod badań laboratoryjnych nie wyeliminowało całkowicie ryzyka przeniesienia czynników zakaźnych, jakie stwarza przetoczenie składników krwi ludzkiej. Stąd konieczność zastosowania różnych metod fizycznych, chemicznych i fotochemicznych (ultrafiltracja, ogrzewanie, fotoinaktywacja itp.), umożliwiających inaktywację szerokiego spektrum czynników zakaźnych. Metody te muszą być tak dobrane, żeby nie zmieniały własności terapeutycznych preparatów, co ma szczególne znaczenie w przypadku frakcji osocza pulowanego (pochodzącego od wielu dawców). Próba usunięcia czynników zakaźnych z komórek – krwinek czerwonych i płytkowych, musi uwzględniać inaktywację czynników znajdujących się zarówno w komórkach, jak i na ich powierzchni i w osoczu, nie zaburzając równocześnie struktury i funkcji tych komórek.

11.5. Przechowywanie materiału do przetoczeń

Zmiany zachodzące w trakcie przechowywania krwinek czerwonych, płytek i granulocytów zależą od rodzaju i składu płynów konserwujących oraz czasu i temperatury przechowywania.

11.5.1. *Krwinki czerwone*

Przechowywanie koncentratów czerwonekrwinkowych (KKCz) określanej dawniej mianem masy erytrocytarnej (ME), wiąże się z mniej lub bardziej nasilonymi uszkodzeniami erytrocytów. Płyny konserwujące zawierają roztwór glukozy i cytrynianu, i mogą być wzbogacane dodatkowo fosforanami, adeniną, wodorowęglanami i mannitolem. Używanie popularnych płynów, znanych od wielu lat i wielokrotnie ulepszanych, takich jak ACD, ACD z adeniną, CPD i CPD z adeniną, powoduje obniżenie 2,3-DPG, ATP i stężenia potasu w erytrocytach, a także obniżenie pH jako efekt wzrostu stężenia kwasu mlekowego. Obserwuje się również wzrost stężenia pirogronianu i amoniaku w środowisku, a także wzrost stężenia sodu w komórkach. Część uszkodzonych krwinek ulega hemolizie, co skutkuje ich usunięciem z krążenia już w pierwszej dobie po przetoczeniu. Pozostałe erytrocyty (z reguły >70%) uzyskują prawidłową zdolność do przeżycia i transportu tlenu.

Nadal poszukuje się płynu idealnego, pozwalającego na zapobieganiu procesom starzenia się erytrocytów, a nawet ich „odmładzaniu”. Efekt taki można uzyskać poprzez względną alkalizację próbki (zapobieganie zakwaszeniu) oraz przez podwyższenie stężenia ATP. Najczęściej stosowanym markerem żywotności krwinek czerwonych w preparatach jest oznaczenie ATP.

11.5.2. Płytki krwi

W odróżnieniu od krwinek czerwonych, płytki posiadają pełen zestaw enzymatyczny cyklu kwasów trójkarboksylowych. Źródłem ATP w płytkach jest glikoliza i fosforylacja oksydacyjna, a ATP wykorzystywane jest w aktywacji płytek do zmiany ich kształtu i tworzenia pseudopodiów. W trakcie przechowywania, w przypadku niedotlenienia nasila się proces glikolizy i produkcja kwasu mlekowego.

Preparaty płytkowe (koncentraty krwinek płytkowych) uzyskiwane są od dawców z krwi pełnej lub metodą aferezy. Przy pobieraniu rutynowo stosowane są płyny klasyczne, typu CPD lub CPDA, które zawierają cytrynian, fosforany, glukozę i adeninę. Uzyskany koncentrat może być przechowywany w odpowiednich warunkach do 5 dni w temp. pokojowej. Najistotniejszy jest problem utrzymania odpowiedniego pH preparatu płytkowego i zapobieganie zaburzeniom struktury i funkcji płytek, przy czym brak jest prostych testów laboratoryjnych, oceniających te zjawiska (oznaczają można markery uwalniania płytkowego: β TG i P-selektynę). Na jakość przechowywanych płytek może wpływać również rodzaj pojemnika, metody preparatyki (wirowanie, mieszanie), rodzaj i skład płynu konserwującego oraz napromienienie gamma (inaktywacja leukocytów).

11.5.3. Granulocyty

W odróżnieniu od koncentratów erytrocytarnych i płytkowych, preparaty leukocytarne, ze względu na krótki czas przeżycia komórek (do 6 godzin), powinny być podawane natychmiast po przygotowaniu. Obecnie preparaty uzyskuje się drogą leukaferozy z wirowaniem, a w celu zwiększenia wydajności pobrania, czasu przeżycia oraz poprawy funkcji antybakteryjnej granulocytów, stosuje się premedykację dawców glikokortykoidami lub czynnikami wzrostu odpowiednich komórek (np. czynnikiem wzrostu granulocytów, G-CSF).

Koncentraty granulocytów zawierają zawiesinę komórek w autologicznym osoczu z dodatkiem płynu CPD lub CPDA i w przechowywane są w temperaturze pokojowej, maksymalnie do 24 godzin.

11.6. Autotransfuzja

Autotransfuzja, określana również mianem transfuzji autologicznej, polega na wykorzystaniu własnej krwi osoby chorej, pobranej od pacjenta przed zabiegiem operacyjnym lub odzyskanej podczas zabiegu operacyjnego. Powtórne przetoczenie krwi własnej zapobiega wielu powikłaniom, o których była mowa powyżej – przede wszystkim chorobom zakaźnym przenoszonym przez krew, powikłaniom poprzetoczeniowym typu reakcji immunologicznych

oraz zaburzeniom metabolicznym. U pacjentów obserwowano zmniejszenie częstości powikłań pooperacyjnych (płucnych i krążeniowych) oraz szybsze gojenie się ran operacyjnych. Nie bez znaczenia są również aspekty ekonomiczne oraz wykorzystanie preparatów krwi własnej u osób, które ze względów religijnych nie wyrażają zgody na leczenie obcą krwią. Niestety nie wszyscy pacjenci mogą skorzystać z transfuzji autologicznej. Przeciwwskazania zestawiono w tabeli 11.6.

Tabela 11.6. Przeciwwskazania do stosowania autotransfuzji

Bezwzględne	Zaburzenia hematologiczne; znaczna niedokrwistość Choroby krążenia: Niestabilna choroba wieńcowa Przebyty zawał serca, ciężkie zwężenie aorty Niekontrolowane nadciśnienie tętnicze Ostra niewydolność oddechowa Zaawansowane choroby nowotworowe Ciężkie zaburzenia endokrynologiczne (np. niewyrównana cukrzyca) Cięcie cesarskie
Względne	Umiarkowane niedobory składników krwi Dodatnie wyniki badań w kierunku markerów przebytych infekcji wirusowych i bakteryjnych Leczenie cytostatykami i radioterapia Faza ostrej infekcji Padaczka

11.7. Wskazania do stosowania krwi i jej składników

Wskazania do przetaczania pełnej krwi ulegały w ciągu ostatnich lat ogromnym ograniczeniom, i dlatego w poniższej tabeli (tabela 11.7) przedstawiono podstawowe preparaty krwiopochodne i ich zastosowanie.

Tabela 11.7. Wskazania do stosowania składników krwi

Preparat	Zastosowanie
Koncentrat krwinek czerwonych (KKCz)	Niedokrwistość z objawami znacznego niedotlenienia (Hb<8 g/dL lub Hb<11 g/dL – w zależności od objawów klinicznych) Uzupełnienie ubytku krwi krążącej (1 jedn. KKCz podwyższa Ht o 2-3% i Hb o 1 g/dL) Transfuzja wymienna u noworodków; Hemodializa
KKCz – krwinki płukane	Niedokrwistości autoimmunohemolityczne Ciężkie odczyny alergiczne po przetoczeniu KKCz

Preparat	Zastosowanie
KKCz – krwinki deglicerolizowane	Transfuzje autologiczne Pacjenci z p-ciałami przeciw antygenom o dużej częstości w populacji
KKCz – ubogoleukocytarny	Odczyny gorączkowe poprzetoczeniowe Niedokrwistość oraz p-ciała anty-HLA Wielokrotni biorcy (np. zakwalifikowani do przeszczepu szpiku) Transfuzje dopłodowe i w okresie noworodkowym
KKCz – napromieniowany	Zaburzenia układu odpornościowego (limfocyty)
Koncentrat krwinek płytkowych (KKP) – wirowanie	Małopłytkowość różnego pochodzenia (kryterium: stan kliniczny oraz liczba płytek) Zaburzenia funkcji płytek Hipoplazja/aplazja szpiku – polekowa
KKP – afereza	Ciężka klinicznie skaza płytkowa Przewlekłe leczenie płytkami
Koncentraty leukocytarne	Posocznica, neutropenia, hipoplazja szpiku kostnego, zakażenia antybiotykooporne

Tabela 11.8 Wskazania do stosowania preparatów krwiopochodnych

Preparat	Zastosowanie/wskazania do stosowania
Albumina	Hipowolemia (wstrząs) Hipoalbuminemia (niewydolność wątroby) Rozległe oparzenia Plazmafereza
Immunoglobuliny	Pierwotne i wtórne zespoły niedoboru odporności Choroby o podłożu immunologicznym Zakażenia wirusowe i bakteryjne Profilaktyka konfliktu serologicznego
Osocze świeżo mrożone (FFP)	U chorych z aktywnym krwawieniem przed zabiegami (kontrola APTT, PT – przedłużenie > 1,5-krotne) Po masowym przetoczeniu krwi Niedobory wieloczynnikowe Plamica zakrzepowa małopłytkowa (TTP), zespół hemolityczno-mocznicy (HUS) – konieczność wymiany osocza Przedawkowanie pochodnych kumaryny – konieczność natychmiastowego odwrócenia działania (INR>1,6) Niedobór białek układu antykoagulacyjnego (AT, białko C i S) *Każda jednostka FFP zwiększa stężenie poszczególnych czynników o kilka procent
Krioprecypitat	Uprzednie masowe przetoczenia (>8 jedn./dobę) Hemofilia, choroba von Willebranda, niedobór fibrynogenu (wrodzony lub nabyty – np. w DIC)
Koncentraty czynników VIII i IX	Hemofilie wrodzone lub nabyte

12. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA CHORÓB UWARUNKOWANYCH WRODZONYMI DEFECTAMI GENETYCZNYMI

Tadeusz Pawełczyk

Analiza molekularna jest obecnie niezbędnym elementem diagnostyki chorób spowodowanych wrodzonymi defektami genetycznymi. W przypadku wielu chorób identyfikacja konkretnej zmiany (mutacji) genetycznej może wpłynąć na wybór terapii pomocna jest też w identyfikacji nosicieli wśród członków rodziny chorego. W prezentowanym materiale zredukowano do minimum opis objawów klinicznych chorób koncentrując się tylko na tych, które zależą od rodzaju danej zmiany genetycznej. Student po zapoznaniu się z materiałem zawartym w tym rozdziale powinien rozumieć cel, zasadę i interpretację molekularnego testu diagnostycznego zlecanego do wykonania dla prowadzonego pacjenta.

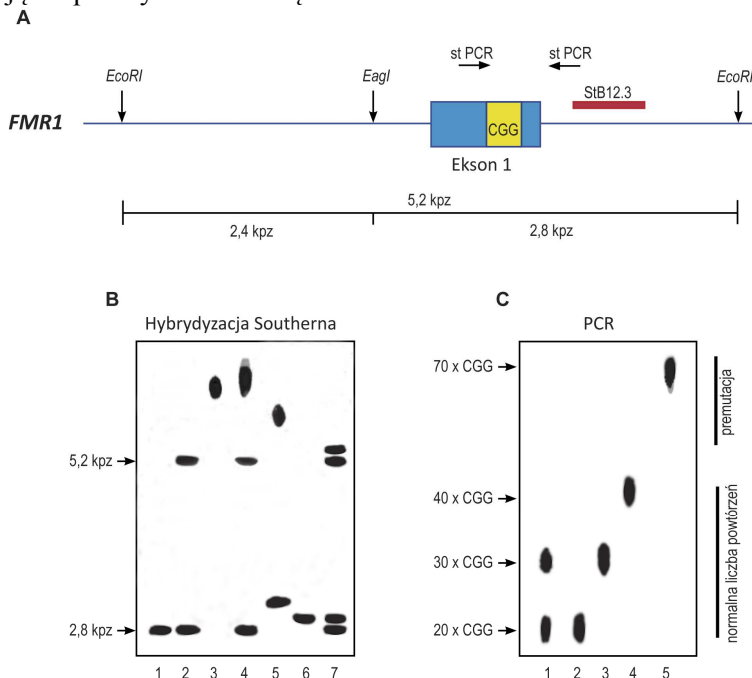
12.1. Zespół łamliwego chromosomu X

Zespół łamliwego chromosomu X (Fra X) jest najczęściej występującą postacią dziedzicznego upośledzenia umysłowego. Choroba ta dziedziczy się jako cecha dominująca sprzężona z chromosomem X. Częstość jego występowania szacuje się na 1:2000-4000 żywych urodzeń chłopców i 1:9000 u dziewcząt. Choroba dotyka zarówno mężczyzn jak i kobiety, lecz u kobiet jej przebieg jest łagodniejszy.

12.1.1. Podłoże molekularne

Molekularne podłoże rozwoju zespołu Fra X jest złożone i powiązane z mutacjami w obrębie genu *FMR1*. Jak dotąd u osób z zespołem Fra X nie stwierdzono mutacji w obrębie innych genów, które można by powiązać z rozwojem tej choroby. Gen *FMR1* obejmujący 38 kilo par zasad (kpz) zbudowany jest z 17 eksonów i jest umiejscowiony w dystalnej części długiego ramienia chromosomu X. *FMR1* podlega ekspresji w większości tkanek, a powstały w wyniku transkrypcji mRNA wielkości 4 kilo zasad (kz) podlega w niektórych tkankach alternatywnemu składaniu prowadząc do powstania szeregu izoform białka upośledzenia umysłowego łamliwego chromosomu X (FMRP). Niewielkie ilości białka FMRP zlokalizowane są w jądrze komórkowym, lecz większość FMRP występuje w cytoplazmie działając jako negatywny regulator procesu translacji. Wiadomo, że FMRP odgrywa istotną rolę w rozwoju synaps neuronalnych. U pacjentów z zespołem Fra X obserwuje się nieprawidłowości w budowie i dystrybucji wyrostków kolczystych.

Zaburzenia funkcjonowania genu *FMRI* są związane z występowaniem zwiększonej ilości powtórzeń sekwencji tri nukleotydu (CGG) w regionie 5' genu (ryc. 12.1). Mutacje wynikające ze zwiększonej ilości powtórzeń sekwencji CGG stanowią ponad 99% wszystkich mutacji prowadzących do powstania zespołu Fra X. Pozostały procent zmian to mutacje punktowe występujące sporadycznie w obrębie *FMRI*.



Ryc. 12.1. Mapa regionu genu *FMRI* i przykładowe wyniki analiz regionu powtórzeń CGG-A. Na schemacie zaznaczono miejsca cięcia enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *EagI* oraz wielkości fragmentów DNA otrzymanych po cięciu tymi enzymami. Poziomymi strzałkami zaznaczone są miejsca hybrydyzacji starterów reakcji PCR położone na zewnątrz regionu powtórzeń CGG. Zaznaczono również miejsce hybrydyzacji sondy DNA StB12.3. **B.** Przykładowy wynik analizy Southerna z użyciem sondy StB12.3 na DNA z limfocytów. Na ścieżce 1 fragment DNA wielkości 2,8 kbp pochodzący od zdrowego mężczyzny, na ścieżce 2 widać dwa prążki odpowiadające fragmentom DNA 2,8 i 5,2 kbp pochodzące od zdrowej kobiety. Fragment 5,2 kbp pochodzi od zdezaktywowanej w wyniku metylacji kopii chromosomu X. Na ścieżce 3 prążek odpowiadający DNA pochodzący od mężczyzny z pełną mutacją i metylacją blokującą cięcie *EagI*. Na ścieżce 4 prążki odpowiadające fragmentom DNA kobiety z pełną mutacją na jednym chromosomie X i normalną drugą kopią X. Na ścieżce 5 prążki odpowiadające fragmentom DNA mężczyzny z pełną mutacją i częściową metylacją (mozaikowość metylacyjna). Na ścieżce 6 prążki odpowiadające DNA mężczyzny z premutacją, a na ścieżce 7 prążki odpowiadające DNA kobiety z premutacją. **C.** Przykładowy wynik analizy liczby powtórzeń CGG za pomocą PCR. Na ścieżce 1 produkt amplifikacji DNA kobiety z normalną liczbą powtórzeń CGG (20 i 40 na poszczególnych kopiach chromosomu X). Na ścieżkach 2, 3 i 4 wynik analizy DNA mężczyzny z normalną liczbą powtórzeń CGG. Na ścieżce 5 wynik analizy DNA mężczyzny z premutacją (70 powtórzeń CGG)

Ilość powtórzeń CGG w obrębie normalnego *FMRI* waha się w granicach od 5 do 40 co skutkuje występowaniem różnych form allelicznych. W populacji ogólnej większość osób charakteryzuje się występowaniem 20-40 powtórzeń CGG, które są stabilne i nie ulegają zmianie podczas przekazywania potomstwu. Allele posiadające graniczną ilość powtórzeń 41-59 czasami ulegają niewielkim zmianom (kilka powtórzeń) podczas przekazywania od rodzica do dziecka co pozostaje bez objawów klinicznych. Znane są jednak przypadki pojawienia się patologicznych alleli u potomków rodzica będącego bezobjawowym nosicielem allelu zawierającego 55-59 powtórzeń. Wśród patologicznych alleli można wyróżnić dwie kategorie. Jedna z nich to allele zawierające 60-200 powtórzeń CGG (premutacja), a druga to allele zawierające ponad 200 powtórzeń (pełna mutacja). Zwiększeniu ponad 200 liczby powtórzeń sekwencji CGG towarzyszy metylacja regionu promotorowego genu *FMRI* co prowadzi do zahamowania ekspresji genu i w rezultacie braku białka FMRP w komórkach. Ponieważ jednak metylacja *FMRI* nie jest procesem „wszystko albo nic” możliwe jest istnienie szeregu allelicznych form pośrednich. Pacjenci z pełną mutacją, ale z częściową metylacją (mozaikowość metylacyjna) mogą posiadać niewielkie ilości białka FMRP i charakteryzować się łagodniejszym przebiegiem choroby. Podobnie osoby u których występują jednocześnie komórki z pełną mutacją i komórki z premutacją (mozaikowość rozmiaru mutacji) mogą funkcjonować w zakresie dolnej granicy normalnej sprawności intelektualnej (IQ >70). Osoby z premutacją nie wykazują objawów choroby jednak ze względu na niestabilność genu podczas mejozy u potomstwa takich osób istnieje ryzyko zwiększenia liczby powtórzeń CGG do ponad 200 i w konsekwencji rozwoju choroby. Charakterystyczną cechą dziedziczenia zespołu Fra X jest dziedziczenie matczyne. Osoby z pełną mutacją otrzymują zmutowany allel *FMRI* lub Allel *IFMRI* z premutacją od matki. Ojcowskie allele *FMRI* z premutacją są względnie stabilne i podczas przekazywania do córek nigdy nie ulegają przemianie do pełnej mutacji. Allel ten może ulec konwersji do allelu z pełną mutacją dopiero w następnym pokoleniu podczas przekazania go przez matkę nosicielkę jej potomstwu.

12.1.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych

Często zdarza się, że rodzice dowiadują się o swoim nosicielstwie mutacji *FMRI* przy okazji badania ich pierwszego dziecka wykazującego cechy zaburzeń rozwojowych. Bywa, że od pierwszych objawów upływa sporo czasu i przed otrzymaniem wyników badania pierwszego dziecka dochodzi do rozwoju kolejnej ciąży. Z tego względu szybka diagnostyka tej choroby jest niezwykle istotna tak, aby rodzice mogli skorzystać z poradnictwa genetycznego przed poczęciem kolejnego dziecka.

Dla dzieci z niedorozwojem umysłowym badania molekularne *FMRI* mają znaczenie diagnostyczne, ponieważ mogą potwierdzić lub wykluczyć zespół

FraX. Jest to o tyle istotne, że objawy kliniczne zespołu Fra X nie są jednoznaczne i nie pozwalają na definitywną diagnozę, zwłaszcza w wieku przed-szkolnym.

Kobiety będące nosicielkami premutacji lub pełnej mutacji z 50% prawdopodobieństwem przekazują zmieniony allel potomstwu. Przekazanie pełnej mutacji zawsze prowadzi do rozwoju zespołu Fra X, natomiast ryzyko przekształcenia premutacji w pełną mutację zależy od ilości powtórzeń CGG w matczynej premutacji. Informacja ta jest istotna w poradnictwie genetycznym przy szacowaniu ryzyka urodzenia dziecka z pełną mutacją. Analizy przeprowadzone na relatywnie licznych grupach chorych wskazują, że ryzyko przekształcenia premutacji w pełną mutację u męskiego potomka kobiety będącej nosicielem permutacji wynosi około 7% dla allelu z 56-59 powtórzeniami, 10% dla 60-69 powtórzeń, 30% dla 70-79 powtórzeń, 36% dla 80-89 powtórzeń oraz 50% dla ponad 90 powtórzeń.

12.1.3. Dostępne analizy molekularne

Testy laboratoryjne mutacji *FMRI* obejmują określanie liczby powtórzeń CGG oraz ocenę poziomu metylacji genu. Standardowe analizy opierają się na technice hybrydyzacji Southerna z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych wrażliwych (*Eag I*, *BssH II*, *Nru I*) i niewrażliwych na metylację (*EcoR I*, *Hind III*) oraz amplifikacji segmentów zawierających sekwencje CGG w reakcji PCR (ryc. 12.1).

W większości laboratoriów metoda PCR optymalizowana jest dla amplifikacji fragmentów zawierających do 150 powtórzeń CGG. W takich warunkach wydajność reakcji PCR jest odwrotnie proporcjonalna do ilości powtórzeń CGG i maleje wraz ze wzrostem ich ilości co przekłada się na malejącą ilość produktu, aż do całkowitego jego braku przy długich sekwencjach. Laboratoria stosujące metodę PCR łącznie z metodą hybrydyzacji Southerna są w stanie zapewnić bardziej kompleksową analizę obejmującą ilość powtórzeń, stopień metylacji DNA, oraz występujące stosunkowo rzadko delecje w obrębie regionu zawierającego powtórzenia CGG. W niektórych laboratoriach dostępna jest analiza poziomu białka FMRP. Z uwagi na to, że ciężkość przebiegu zespołu Fra X jest odwrotnie proporcjonalna do ilości białka FMRP, oznaczenie poziomu białka FMRP u pacjenta z mozaikowością metylacyjną może być czynnikiem prognostycznym ciężkości choroby.

12.1.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Z uwagi na to, że gen *FMRI* jest jedynym genem związanym z rozwojem zespołu Fra X specyficzność testu jest 100%. Czułość testów opartych na metodzie PCR łącznie z hybrydyzacją Southerna wynosi 99% co jest związane z

rzadkim występowaniem małych delecji/insercji i mutacji punktowych poza obszarem genu *FMR1* w którym dochodzi do powtórzeń sekwencji CGG. Trzeba sobie jednak zdawać sprawę, że częstotliwość występowania zmian w innych rejonach genu *FMR1* może być niedoszacowana, gdyż pozostałe regiony genu nie są z reguły analizowane kiedy brak jest zmiany ilości powtórzeń CGG. Obecność komórkowej mozaikowości pod względem ilości powtórzeń CGG lub stopnia metylacji DNA stwarza problemy interpretacyjne w prognozowaniu ciężkości choroby. W zasadzie u wszystkich pacjentów z niedoborem białka FMRP obserwuje się niedorozwój umysłowy różnego stopnia, lecz w niektórych przypadkach pacjenci z obniżonym poziomem FMRP wykazują sprawność intelektualną na poziomie dolnej granicy normy. Z uwagi na brak długookresowych obserwacji młodych pacjentów z poszczególnymi typami mutacji prognozowanie powinno być ostrożne.

12.2. Dystrofie mięśniowe Duchenne'a i Beckera

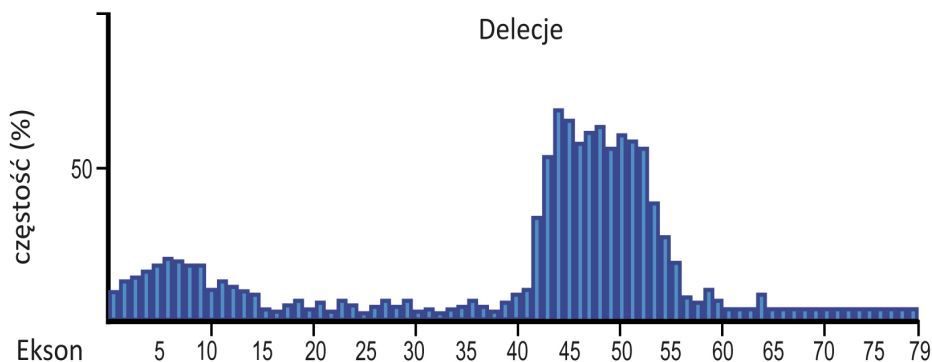
Dystrofie mięśniowe są grupą ponad dziesięciu klinicznie i genetycznie odmiennych jednostek chorobowych charakteryzujących się postępującym osłabieniem mięśni i degeneracją mięśni szkieletowych. Wśród nich dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest najczęściej zdarzającą się dystrofią występującą z częstością 1 na 3500 żywych urodzeń dzieci płci męskiej. Jest to choroba dziedziczona recesywnie sprzężona z chromosomem X. Przyczyną DMD są mutacje w genie *DMD* kodującym dystrofinę i mogą być przekazywane przez matki nosicielki lub być efektem nowych mutacji (~30%) zachodzących w komórce jajowej. Pierwsze objawy kliniczne pojawiają się z reguły przed ukończeniem 3 roku życia, a większość pacjentów nie dożywa 20 roku życia. Dystrofia mięśniowa Beckera (BMD) jest alleliczną postacią DMD spowodowaną mutacjami w obrębie genu *DMD* nie zmieniającymi ramki odczytu co skutkuje zachowaniem resztkowych funkcji dystrofiny w komórkach i wolniejszym rozwojem choroby o łagodniejszych objawach klinicznych.

12.2.1. Podłoże molekularne

Gen *DMD* jest największym ludzkim genem obejmującym 2,4 miliona par zasad rozmieszczonych w 79 eksonach. Transkrypt *DMD* o wielkości 14 kbp podlega alternatywnemu składaniu generując poza mRNA dystrofiny szereg mniejszych mRNA kodujących białka podlegające biosyntezie w innych niż mięśniowa tkankach, głównie w komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Dystrofina jest elementem dużego kompleksu dystroglikanowego, w którym pełni rolę pomostu łączącego wewnątrzkomórkowy cytoszkielet miofilamentów z macierzą zewnątrzkomórkową. Funkcją tego kompleksu jest przenoszenie i równoważenie naprężeń powstających w obrębie kurczących się miofilamentów

i macierzy zewnątrzkomórkowej. Brak lub utrata funkcji dystrofiny prowadzi do zniszczenia komórek mięśniowych. Pacjenci z DMD mają śladowe ilości lub zupełny brak dystrofiny, podczas gdy u pacjentów z BMD poza obniżeniem poziomu tego białka obserwuje się również obecność dystrofiny o zmienionej wielkości cząsteczki. Brakowi dystrofiny towarzyszy również zanik innych białek kompleksu glikanowego głównie białek asocjujących z dystrofiną.

Analiza DNA mężczyzn z DMD/BMD pokazuje, że w 65% przypadków dochodzi do różnego rodzaju delecji w genie *DMD*. Delecje te najczęściej występują w obrębie 43-56 eksonu (~80%) oraz 1-15 eksonu (~20%) przy czym rozmiarowo największe delecje mają miejsce z reguły w obrębie końca 5' genu (ryc. 10.2). Jak dotąd nie zaobserwowano zależności między rozmiarem lub lokalizacją delecji i fenotypem. Jedną z większych delecji (utrata 35 eksonów) dotąd zaobserwowanych w genie *DMD* wykryto u pacjenta z BMD czyli łagodniejszym typem dystrofii. Wydaje się, że istotnym czynnikiem mającym wpływ na fenotyp jest zachowanie ramki odczytu w obrębie genu *DMD*. Delecje znajdujące u chorych z DMD prowadzą z reguły do zmiany ramki odczytu w genie *DMD*, natomiast u chorych z BMD ramka odczytu jest zachowana. Przesunięcie ramki odczytu może powodować powstanie kodonu dla innego aminokwasu lub kodonu stop co skutkuje całkowitym brakiem białka, natomiast przy zachowanej ramce odczytu dochodzi często do powstania wewnętrznie zmienionego, ale częściowo czynnego białka. Hipoteza dotycząca zmiany ramki odczytu pozwala na wyjaśnienie różnic fenotypowych u 92% przypadków DMD/BMD. Pozostaje jednak niewielka grupa chorych u których ta zależność nie występuje. Spotyka się pacjentów z BMD z delecją w obrębie eksonu 3 do 7, która związana jest ze zmianą ramki odczytu. U niewielkiej liczby pacjentów z DMD obserwuje się z kolei delecje zachodzące z zachowaniem ramki odczytu. Znane są również przypadki występowania różnic fenotypowych pomimo posiadania przez chorych tej samej mutacji w obrębie genu *DMD*. Dotyczy to często występującej zmiany czyli delecji eksonu 45, którą identyfikowano zarówno u chorych z DMD jak i BMD. Poza delecjami u chorych obserwuje się duplikacje (~6%) i mutacje punktowe rozmieszczone w obrębie całego genu *DMD*. Duplikacje najczęściej (80%) występują w obrębie końca 5' i rzadziej (20%) w środkowej części genu *DMD*.



Ryc. 12.2. Rozmieszczenie występowania mutacji (delecji) w genie dystrofiny

12.2.2. *Kliniczna użyteczność badań molekularnych*

Analiza DNA w diagnostyce DMD/BMD stosowana jest do wykrywania nosicielstwa, w diagnostyce prenatalnej, u pacjentów w okresie bezobjawowym oraz do identyfikacji rodzaju dystrofii u pacjentów z objawami niepełnymi DMD/BMD. Najbardziej specyficznym testem diagnostycznym w DMD/BMD jest analiza białka dystrofiny metodą western blot, lecz wymaga on przeprowadzenia biopsji mięśni pacjenta. Brak prążka białkowego rozpoznawanego przez przeciwciała do dystrofiny jest bardzo specyficznym wskaźnikiem DMD, natomiast słaby sygnał lub obecność prążków białkowych o masach innych niż 427 kDa wskazuje na BMD. Testu diagnostycznego opartego o analizę białka dystrofiny nie można stosować w badaniach prenatalnych ponieważ gen *DMD* nie ulega ekspresji w komórkach płynu owodniowego, jak i w kosmówce. Hybrydyzacja typu western ze względu na małą czułość nie nadaje się również do wykrywania nosicielstwa mutacji *DMD* u kobiet.

12.2.3. *Dostępne analizy molekularne*

Obecnie wykrywanie delecji w genie dystrofiny opiera się na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), a dokładnie na reakcji kompleksowego PCR. W metodzie tej poddaje się jednoczesnej amplifikacji kilka do kilkunastu sekwencji DNA (np. eksonów). Analiza rozdzielonych elektroforetycznie produktów na żelua garozowym pozwala ocenić który ekson uległ delecji, gdyż w miejscu odpowiadającemu produktowi danego eksonu brak jest prążka. Stosując kombinację 18 par odpowiednich starterów można w przybliżeniu zidentyfikować 98% znanych delecji w *DMD*. Korzyścią tej metody są bardzo niewielkie ilości DNA, krótki czas wykonania (1-2 dni), stosunkowa niska cena i rzadko występujące pomyłki diagnostyczne. Dlatego metoda ta może być

stosowana z powodzeniem w diagnostyce prenatalnej oraz do identyfikacji delecji u chorych mężczyzn. Identyfikacja delecji nie tylko potwierdza diagnozę, ale pozwala na identyfikację nosiciela delecji wśród członków rodziny chorego. W tym celu stosowane są testy z wykorzystaniem hybrydyzacji Southerna lub analiza z zastosowaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR), która jest metodą pozwalającą na otrzymanie wyników ilościowych. Hybrydyzacja Southerna jest metodą stosowaną również do identyfikacji duplikacji genu *DMD*. W rodzinach w których choroba związana jest z niezidentyfikowaną mutacją (35% chorych) testem pozwalającym zidentyfikować nosiciela nieznannej mutacji oraz możliwym do zastosowania w diagnostyce prenatalnej jest analiza polimorfizmu powtórzeń dinukleotydowych w obrębie genu *DMD* (analiza sprzężeń).

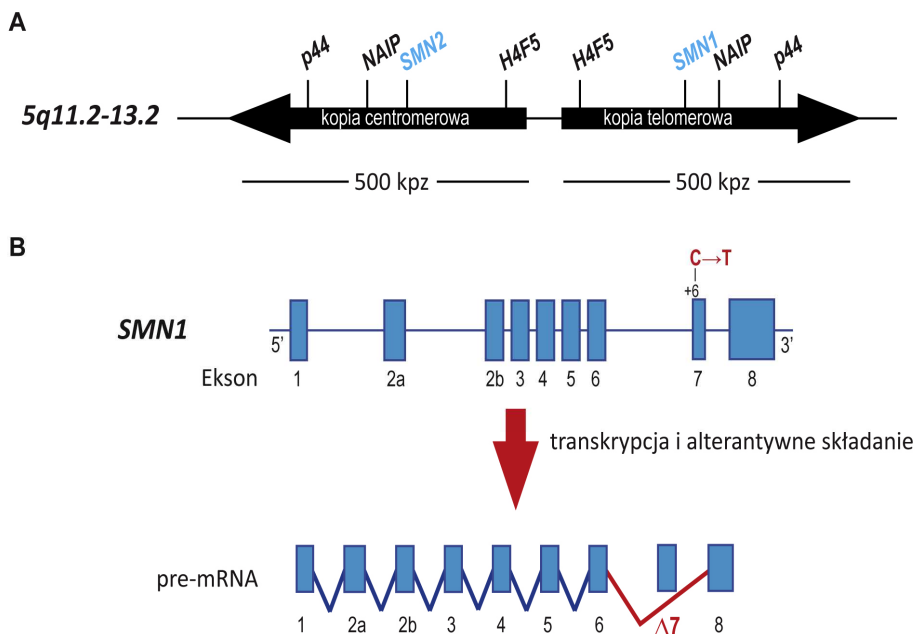
12.2.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Metody analityczne wykorzystujące kompleksowy PCR do wykrywania delecji są w stanie potwierdzić diagnozę 65% przypadków *DMD* i 85% przypadków *BMD*. Główną korzyścią hybrydyzacji Southerna jest detekcja 5-8% pacjentów z duplikacjami *DMD*. W przypadku negatywnych wyników badań na obecność delecji lub duplikacji niezbędnym jest przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej białka dystrofiny na materiale otrzymanym z biopsji mięśnia pacjenta. Należy podkreślić, że brak nosicielstwa delecji stwierdzony na podstawie analizy DNA wyizolowanego z komórek somatycznych matki chorego nie wyklucza możliwości urodzenia przez nią kolejnego chorego syna ze względu na możliwość występowania mozaikowości w obrębie komórek linii płciowej. Dokładne ryzyko porodu następnego chorego dziecka jest trudne do oszacowania ponieważ związane jest z wielkością (liczebnością) zmutowanego klonu. Ocenia się, że matki z mozaikowością komórek linii płciowej mają 15% ryzyko ponownego urodzenia syna z *MDM*.

12.3. Rdzeniowy zanik mięśni

Rdzeniowy zanik mięśni (*SMA*) jest terminem określającym grupę chorób nerwowo-mięśniowych w których dochodzi do degeneracji neuronów ruchowych rdzenia kręgowego w wyniku czego następuje osłabienie i zanik mięśni. Ze względu na wiek wystąpienia objawów klinicznych i dynamikę progresji choroby rozróżnia się jej cztery podstawowe formy kliniczne (*SMA1-4*). Pod względem częstotliwości występowania w Polsce jest to druga po mukowiscydozie choroba dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Choroba występuje z częstością 1:7000 żywych urodzeń i jest związana z występowaniem mutacji w *locus* 5q11.2-q13.2.

12.3.1. Podłoże molekularne



Ryc. 12.3. Schemat regionu SMA na chromosomie 5 (A). W obrębie *locus* 5q11.2-13.2 znajdują się dwie kopie regionu długości 500 kpz zawierającego cztery różne geny (*p44*, *NAIP*, *SMN*, *H4F5*). Kopia genu *SMN* położona na elemencie telomerowym oznaczona jest numerem 1, a kopia położona w obrębie fragmentu centromerowego numerem 2. B. Mechanizm powstawania najczęściej obserwowanej mutacji u chorych na SMA tj. delecji eksonu 7. Na schemacie zaznaczono miejsce występowania tranzycji C→T w eksonie 7. Mutacja ta zmienia miejsce modyfikujące alternatywne składanie pre-mRNA w taki sposób, że dochodzi do delecji eksonu 7

W *locus* 5q11.2-q13.2 znajduje się region SMA złożony z dwóch odwróconych względem siebie segmentów wielkości ~500 kpz tzw. elementu centromerowego i telomerowego (ryc. 12.3). Każdy z tych obszarów zawiera ten sam zestaw czterech genów tj. *p44* (gen dla podjednostki p44 czynnika transkrypcyjnego TFIID), *NAIP* (gen dla białka hamującego apoptozę komórek neuronalnych), *SMN* (gen dla czynnika warunkującego przeżycie neuronów motorycznych) oraz *H4F5* (gen dla małego czynnika 1A bogatego w sekwencje EDRK). Czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój choroby są mutacje występujące w obrębie genu *SMN1* zlokalizowanego na elemencie telomerowym. Druga kopia tego genu tj. *SMN2* położona jest w obrębie elementu centromerowego. Każda z kopii genu zbudowana jest z 9 eksonów i ulega transkrypcji, przy czym białko SMN2 ma niewielką aktywność w porównaniu z białkiem SMN1. Dlatego mutacje zachodzące w obrębie genu *SMN2* nie są związane z

występowaniem objawów klinicznych i występują w około 5% zdrowej populacji. Czynnikiem powszechnie uznawanym za wystąpienie choroby są mutacje w obrębie genu *SMN1*. Delecje eksonu 7 w *SMN1* występują u 94% chorych na SMA. Dochodzi do tego w wyniku mutacji substytucyjnej polegającej na tranzykcji C→T w pozycji +6 eksonu 7. Mutacja ta skutkuje zmianą miejsca modyfikującego alternatywne składanie pre-mRNA i delecją całego eksonu 7.

U pozostałych chorych obserwuje się mniejsze delecje i mutacje punktowe w *SMN1*. Mutacje występujące w pozostałych genach regionu SMA jeżeli występują samodzielnie, nie powodują rozwoju choroby, natomiast gdy towarzyszą delecji w genie *SMN1* mogą mieć wpływ na ciężkość objawów SMA. Chociaż mutacje genu *SMN1* stwierdza się u większości chorych to jak dotąd nie zaobserwowano związku między genotypem i fenotypem. Być może jest to spowodowane występowaniem delecji eksonu 7 u większości chorych niezależnie od typu SMA. Ponadto rutynowa diagnostyka nie rozróżnia delecji *SMN1* od zjawiska konwersji kiedy gen *SMN1* zastąpiony jest przez *SMN2*. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że liczba kopii *SMN2* ma wpływ na ciężkość choroby. W normalnej populacji notuje się występowanie od 0 do 3 kopii *SMN2*. Natomiast u pacjentów z łagodniejszym przebiegiem SMA typu II i III obserwuje się więcej kopii *SMN2* niż u pacjentów z SMA typu I.

12.3.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych

Wykrywanie delecji eksonu 7 w obu allelach *SMN1* jest obecnie traktowane jako badanie potwierdzające rozpoznanie. Czulość tego testu to ~95%. Wykrycie delecji w obu allelach pozwala również oszacować prawdopodobieństwo urodzenia kolejnego dziecka z SMA, które jak we wszystkich chorobach dziedzicznych autosomalnie recesywnie wynosi 25%. Należy jednak pamiętać, że brak delecji nie wyklucza choroby, ponieważ 5% pacjentów ma inne mutacje, które nie są identyfikowane rutynową analizą.

Identyfikacja nosicielstwa mutacji *SMN1* jest niezwykle istotna w rodzinach obarczonych występowaniem SMA. Ponadto szacuje się, że częstość nosicielstwa mutacji *SMN1* w populacji ogólnej wynosi 1 na 42-50 osób. Wykrywanie delecji eksonu 7 w *SMN1* jest również podstawą diagnostyki prenatalnej. Materiałem do badań są komórki trofoblastu płodu pobierane pod kontrolą USG w 10-12 tygodniu ciąży.

12.3.3. Dostępne analizy molekularne

Rutynowa diagnostyka molekularna SMA obejmuje wykrywanie obecności delecji eksonu 7 w *SMN1* za pomocą reakcji PCR z parą starterów zaprojektowaną w sposób, który umożliwi odróżnienie produktu (inna wielkość) powstałego z amplifikacji fragmentu genu *SMN1* i *SMN2*. Niektóre metody

wykorzystują różnicę jednego nukleotydu w sekwencji eksonów genu *SMN1* i *SMN2*, co skutkuje odmienną mapą restrykcyjną amplifikowanego fragmentu. Identyfikacja mutacji punktowych i innych małych zmian genetycznych u ~5% chorych, u których nie występuje delecja eksonu 7 prowadzona jest za pomocą analizy polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP) i sekwencjonowania amplifikowanych eksonów. Metodą pozwalającą wykryć nosicielstwo delecji eksonu 7 jest analiza z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym, która przy zastosowaniu odpowiednich standardów wewnętrznych pozwala określić liczbę kopii *SMN1* i *SMN2*.

12.3.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Obecność eksonu 7 w genie *SMN1* nie wyklucza SMA, ponieważ ~5% chorych ma inne mutacje, chociaż występują one niezwykle rzadko. Metoda przesiewowa wykrywania delecji eksonu 7 nie dostarcza informacji ilościowej, dlatego wynik negatywny testu może być również otrzymany dla heterozygoty z delecją tylko w obrębie jednej kopii *SMN1*. Interpretacja testów na nosicielstwo delecji eksonu 7 również nie jest jednoznaczna, ponieważ w około 2% przypadków SMA mamy do czynienia z delecją *de novo* zachodzącą w czasie gametogenezy. Kolejnym uwarunkowaniem utrudniającym prostą interpretację testów na nosicielstwo jest zjawisko występowania dwóch kopii genu *SMN1* na jednym chromosomie obserwowane w ~2% ogólnej populacji. Zjawisko występowania 2 kopii *SMN1* na jednym chromosomie ma poważne implikacje dla poradnictwa genetycznego, ponieważ dla osoby z dwoma kopiami genu na jednym chromosomie otrzymuje się wynik analizy taki sam jak dla osoby z jedną kopią genu na każdym z pary chromosomów. U około 5% rodziców dziecka z SMA stwierdza się występowanie dwóch kopii *SMN1* na jednym i brak genu na drugim z pary chromosomów 5.

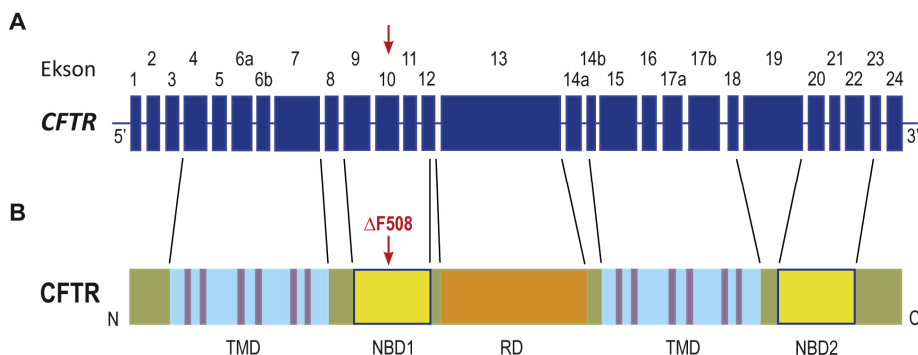
12.4. Mukowiscydoza (zwyrodnienie włóknisto-torbielowate)

W populacji kaukaskiej mukowiscydoza (CF) jest najczęstszym śmiertelnym schorzeniem uwarunkowanym genetycznie. Choroba dziedziczona jest w sposób autosomalny recesywny i dotyka jedno na ~ 2500 żywo urodzonych dzieci. W Polsce rocznie rodzi się około 200 chorych dzieci. Mukowiscydoza jest chorobą wieloukładową o zróżnicowanych objawach klinicznych najczęściej dotyczących układu oddechowego i pokarmowego rozwijającą się w wyniku upośledzenia funkcji gruczołów wydzielniczych. Charakteryzuje się nawracającymi infekcjami układu oddechowego prowadzącymi do niewydolności oddechowej. Często również dochodzi do upośledzenia aktywności wydzielniczej trzustki i różnych form dysfunkcji wątroby. Średnia długość życia pacjentów z mukowiscydozą nie przekracza 30 lat.

12.4.1. Podłoże molekularne

Za rozwój choroby odpowiedzialne są mutacje w obrębie genu *CFTR* znajdującego się na długim ramieniu chromosomu 7 (7q31). Gen ten zawiera 250 kpz i jest jednym z większych w ludzkim genomie. *CFTR* składa się z 27 eksonów (ryc. 12.4), które kodują transporter jonów zależny od cAMP. Białko to zbudowane jest z 1480 aminokwasów tworzących strukturę przezbłonowego kanału jonowego należącego do rodziny białek transportowych wiążących ATP tzw. białek ABC. W obrębie białka CFTR wyróżnić można szereg domen funkcjonalnych kodowanych przez poszczególne eksony genu *CFTR*. I tak eksony 9-12 i 19-23 kodują dwie domeny wiążące nukleotydy (NBD), domena regulatorowa jest zakodowana w obrębie eksonów 12-14a, natomiast dwie domeny przezbłonowe kodowane są przez eksony 3-7 i 14b-18. Kanał zbudowany przez białko CFTR transportuje na zewnątrz komórki poza jonami chlorkowymi również kationy potasowe i sodowe oraz ATP. Domeną regulującą aktywność kanału jest domena NBD1 wiążąca ATP. Domena ta jest miejscem jednej z najczęściej występujących mutacji tj. delecji fenyloalaniny w pozycji 508 ($\Delta F508$). Od czasu poznania sekwencji genu *CFTR* w roku 1989 zidentyfikowano ponad 1400 mutacji i około 200 wariantów sekwencyjnych. Mutacje te mają charakter mutacji punktowych zmieniających sens kodonu, mutacji nonsensowych, delecji oraz mutacji powodujących zmianę alternatywnego składowania mRNA. W wyniku tych mutacji obserwuje się powstanie mniejszego białka, brak modyfikacji potranslacyjnych na skutek zmiany sekwencji miejsc, w których one zachodzą, upośledzenie aktywności transportowej kanału, zmiany właściwości regulatorowych, mniejszą ilość białka w błonach plazmatycznym komórek ze względu na zaburzony transport pęcherzykowy. Za wyjątkiem kilku mutacji większość zidentyfikowanych mutacji ma charakter sporadyczny i występuje u członków poszczególnych rodzin.

Bezsprzecznie najczęstszą mutacją identyfikowaną u chorych z mukowiscydozą jest $\Delta F508$, która w populacji kaukaskiej stanowi ~72% wszystkich mutacji (tabela 12.1). Co prawda częstotliwość jej występowania w poszczególnych krajach jest różna i waha się od 30% w Turcji do 88% w Dani (tabela 12.2). W polskiej populacji 9 mutacji łącznie z $\Delta F508$ stanowi ~ 68% wszystkich mutacji obserwowanych u chorych z CF (tabela 12.3). Są jednak takie populacje jak kanadyjska populacja Hutteire gdzie u chorych z CF poza $\Delta F508$ obserwuje się występowanie tylko jeszcze jednej mutacji (M1101K).



Ryc. 12.4. Gen *CFTR* oraz białko przez niego kodowane. **A.** Schemat genu *CFTR* z zaznaczonym miejscem położenia w obrębie eksonu 10 mutacji $\Delta F508$ (czerwona strzałka). Na rycinie tylko wielkości eksonów zachowują swoje proporcje. **B.** Rozmieszczenie domen w białku CFTR. Białko CFTR umiejscowione jest błonie plazmatycznej komórek epitelialnych za pomocą dwóch domen przezbłonowych (TMD). Domeny NBD1/2 są miejscem wiązania nukleotydów. Domena RD jest domeną regulatorową. Linie powyżej schematu białka zaznaczają eksony kodujące poszczególne domeny CFTR

12.4.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych

Tabela 12.1. Najczęściej występujące mutacje w genie *CFTR*

Mutacja	Częstość (%)
$\Delta F508$	72
G542X	2,3
G551D	2,3
621+1G→T	1,6
W1282X	1,5
N1303K	1,3
R553X	0,9
$\Delta I507$	0,9
R117H	0,7
3849+10kbC→T	0,6
2789+5G→A	0,5
1717-1G→A	0,5
R347P	0,5
711+1G→T	0,4

Obecnie w Polsce wszystkie noworodki poddawane są testowi przesiewowemu w kierunku mukowiscydozy polegającemu na analizie poziomu

immunoreaktywnego trypsynogenu (IRT) we krwi pobranej od niemowlęcia w 2-3 dobie życia na specjalną bibułę, którą po wysuszeniu przesyła się do specjalistycznych laboratoriów regionalnych. Ze względu na ograniczoną swoistość pozytywny wynik badania ITR nie stanowi o rozpoznaniu choroby, ale jest wskazaniem do przeprowadzenia analizy DNA. Identyfikacja mutacji w genie *CFTR* jest jedynym pełnym potwierdzeniem rozpoznania klinicznego. Ponadto jest ważnym badaniem uzupełniającym u osób z granicznymi poziomami chlorków lub chorych z nietypowymi objawami klinicznymi i normalnym poziomem Cl⁻.

Tabela 12.2. Częstość występowania mutacji $\Delta 508$ w różnych populacjach

Kraj	Częstość (%)
Dania	88
Holandia	79
Wielka Brytania	78
Irlandia	75
Francja	75
USA	66
Niemcy	65
Polska	55
Włochy	50
Turcja	30

Tabela 12.3. Najczęstsze mutacje *CFTR* w populacji polskiej

Nazwa mutacji	Lokalizacja	Częstość (%)
$\Delta F508$	ex10	54
del121kb	del2,3	2,6
G542X	ex11	2,5
3849+10kb→T	in19	2,3
1717-1G→A	in10	2,2
N1303K	ex21	1,9
R553X	ex21	1,2
218insA	ex4	0,9
W1282	ex20	0,6

Mutacje w genie *CFTR* są również identyfikowane u chorych z niedrożnością przewodów nasiennych, cierpiących na przewlekłe zapalenia oskrzeli, u chorych z aspergillusowym alergicznym odoskrzelowym zapaleniem płuc oraz pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok obocznych nosa z polipowatością. Przypadki te należy zatem traktować jako łagodne postaci mukowiscydozy.

Identyfikacja mutacji u zdiagnozowanego probanta pozwala na określenie nosicielstwa w rodzinie chorego. Dla określenia nosicielstwa i sposobu dziedziczenia przydatna jest również analiza markerów polimorficznych (sekwencje nukleotydowe położone wewnątrz lub na zewnątrz genu i występujące w postaci minimum dwóch form allelicznych).

Wykrywanie mutacji *CFTR* jest również podstawą diagnostyki prenatalnej. Źródłem DNA do badań są komórki trofoblastu lub rzadziej amniocyty, które można pobrać od 10 tygodnia ciąży. Badania te prowadzi się, kiedy rodzice pochodzą z rodzin ryzyka mukowiscydozy. Diagnostyka prenatalna powinna być również oferowana w przypadku ciąży niskiego ryzyka, u których stwierdza się podwyższoną echogenność jelit.

12.4.3. Dostępne analizy molekularne

Ze względu na dużą liczbę mutacji *CFTR* oraz ich heterogenność populacyjną nie dysponujemy obecnie testem pozwalającym na wykrycie wszystkich zmian w obrębie *CFTR*. Najczęściej testy stosowane do diagnostyki molekularnej mukowiscydozy zapewniają identyfikację kilku do kilkunastu wybranych mutacji, które najczęściej występują u chorych z CF. Laboratoria diagnostyczne stosują z reguły kombinację kilku zestawów diagnostycznych w celu osiągnięcia maksymalnej czułości analizy. Jako pierwszy używany jest zwykle zestaw pozwalający na identyfikację kilku do kilkunastu najczęściej występujących mutacji, a w przypadku wykrycia mutacji tylko w jednej kopii genu lub nie wykrycia zmian w obu allelach analiza jest prowadzona z użyciem testu pozwalającego na wykrycie innego panelu mutacji. Zestawy stosowane w polskich laboratoriach opierają się na wykorzystaniu kompleksowego PCR w trakcie którego amplifikacji podlega wiele fragmentów genu *CFTR*, które następnie podlegają hybrydyzacji ze znakowanymi fluorescencyjnie sondami. W przypadku otrzymania wyników negatywnych prowadzone są dalsze analizy oparte na metodach opracowanych w poszczególnych laboratoriach.

Badanie nosicielstwa mutacji *CFTR* oraz śledzenie sposobu jej dziedziczenia w populacji polskiej oparte jest zasadniczo na użyciu 11 zewnątrzgenowych markerów polimorficznych. Analiza ta polega na amplifikacji odpowiednich fragmentów DNA (markerów) i następczej analizie RFLP z zastosowaniem odpowiedniego dla każdego markera enzymu restrykcyjnego.

12.4.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Analiza mutacji *CFTR* może dostarczyć tylko trzy rodzaje wyników; nieobecność mutacji, mutacje obecne w jednym allelu, mutacje w obu allelach. Interpretacja tych wyników jest natomiast bardziej kompleksowa i zależy od rodzaju testu, populacji, której członkiem jest pacjent oraz historii rodzinnej. Z

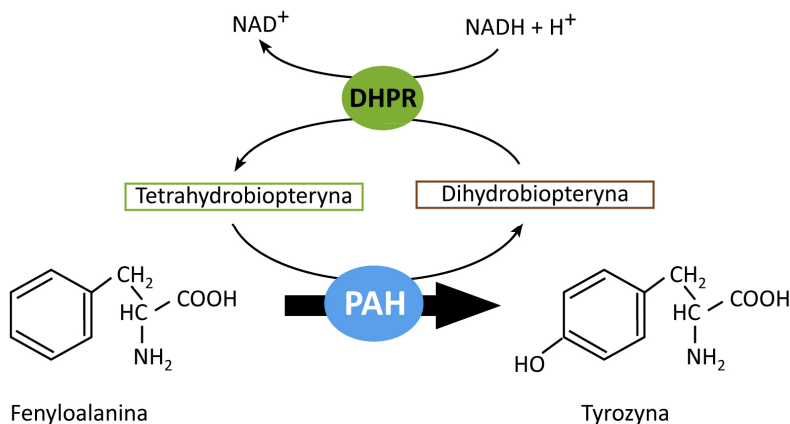
uwagi na to, że żaden ze stosowanych testów diagnostycznych nie identyfikuje wszystkich mutacji, otrzymanie wyniku negatywnego nie przesądza o nieobecności choroby. Jedynie na podstawie wyników analizy sekwencji całego genu możliwe jest wykluczenie obecności mutacji. W przypadku znalezienia jednej mutacji u pacjenta bez wyraźnych objawów klinicznych można wnioskować, że jest on jej nosicielem. Otrzymanie takiego wyniku dla pacjenta z objawami może świadczyć, że jest on nosicielem CF lub chorym heterozygotą posiadającym drugą niezidentyfikowaną mutację.

Wynik analizy molekularnej wskazujący na obecność mutacji w obu allelach potwierdza definitywnie diagnozę. Natomiast związek genotypu z fenotypem klinicznym nie jest wystarczająco poznany i ustalony. Dlatego wystąpienie poszczególnych mutacji w formie homozygotycznej lub heterozygotycznej kombinacji dwóch różnych mutacji nie stanowi podstawy do wyciągania wniosków prognostycznych. Czulość stosowanych testów diagnostycznych zależy od rodzaju populacji. W populacji polskiej za pomocą powszechnie stosowanych testów komercyjnych udaje się wykryć mutacje u niespełna 70% chorych. Spowodowane jest to głównie niską częstotliwością występowania mutacji $\Delta F508$ w populacji polskiej (tabela 12.2). Za pomocą tych samych testów diagnostycznych wykrywa się ponad 90% mutacji *CFTR* w populacji duńskiej.

Zazwyczaj analiza markerów polimorficznych obarczona jest otrzymaniem błędnych wyników ze względu na częste występowanie zjawiska rekombinacji pomiędzy miejscem mutacji i *locus* danego markera polimorficznego. W przypadku markerów polimorficznych stosowanych w diagnostyce mukowiscydozy ryzyko to jest niewielkie i wynosi 0,004. W populacji polskiej haplotyp B składający się z jednego allela XV2C i 2 alleli KM19 w ponad 70% przypadków występuje ze zmutowanym *CFTR* i jest haplotypem największego ryzyka wystąpienia mutacji.

12.5. Fenyloketonuria

Fenyloketonuria (PKU) jest autosomalną recesywną chorobą metaboliczną, która rozwija się w wyniku nagromadzenia się we krwi i tkankach fenyloalaniny i jej metabolitu kwasu fenylopirogronowego. Stężenie fenyloalaniny we krwi chorych zazwyczaj przekracza 20 mg/dL czemu towarzyszy również nagromadzenie się fenyloketonów. Jest to spowodowane brakiem aktywności hydroksylazy fenyloalaninowej (PAH), która przemienia fenyloalaninę do tyrozyny (ryc. 12.5). Konsekwencją braku aktywności PAH jest nie tylko nagromadzenie się fenyloalaniny, ale również niedobór tyrozyny będącej prekursorem dopaminy i noradrenaliny. W konsekwencji u nie leczonych chorych na PKU dochodzi do głębokiego upośledzenia rozwoju umysłowego. W populacji kaukaskiej fenyloketonuria występuje z częstotliwością $\sim 1:20\ 000$ żywych urodzeń (w Polsce 1:7 000).



Ryc. 12.5. Reakcja hydroksylazy fenyloalaninowej (PAH). DHPR, reduktaza dihydropterydynowa

12.5.1. Podłoże molekularne

Znacząca większość przypadków PKU (98%) spowodowana jest mutacjami w genie kodującym PAH. Gen *PAH* jest położony na długim ramieniu chromosomu 12 (12q23) i obejmuje region 90 kbp z czego 4 kbp to sekwencje kodujące zlokalizowane w obrębie 13 eksonów. Obecnie poznano ponad 400 różnych mutacji w genie *PAH* takich jak delecje, mutacje zmiany sensu, insercje, mutacje nonsesowe oraz mutacje miejsc wycinania intronów. Większość tych zmian to mutacje jednostkowe występujące w obrębie pojedynczych rodzin. Najczęściej występującą (31%) mutacją w Europie jest zamiana argininy do tryptofanu w pozycji 408 (R408W). Część chorych (2%) wykazuje zaburzenia w biosyntezie lub regeneracji tetrahydrobiopteryny (BH4) będącej kofaktorem PAH (ryc. 12.5). Zaburzenia te są wynikiem mutacji w genie reduktazy dihydropterydynowej (DHPR) lub enzymów biorących udział w syntezie biopteryny.

12.5.2. Badania przesiewowe i diagnostyka molekularna

Obecnie w Polsce wszystkie noworodki obowiązkowo poddawane są badaniu przesiewowemu w kierunku PKU. W tym celu w 3 dobie życia (po 48 godz.) pobiera się próbkę krwi dziecka na specjalną bibułę. Bibuła ta wysyłana jest do jednego z 8 specjalistycznych regionalnych laboratoriów, w których za pomocą metody enzymatyczno-fluorometrycznej oznaczany jest poziom fenyloalaniny. Stężenie fenyloalaniny przekraczające 3 mg/dL (lecz nie wyższe niż 6 mg/dL), jest wskazaniem do powtórzenia analizy z drugiego

pobrania próbki krwi. Dzieci, u których stężenie fenyloalaniny w pierwszym badaniu wynosi ≥ 6 mg/dL, kierowane są do kliniki. W przypadku otrzymania wyniku powyżej 3 mg/dL z drugiego pobrania dziecko również kierowane jest do kliniki.

Wyniki analizy mutacji w genie *PAH* oraz oznaczenie genotypu ułatwia ustalenie rozpoznania, długookresowego rokowania, dalszej kontroli i leczenia a także użyteczne jest w poradnictwie genetycznym. Często u chorych z PKU obserwuje się zjawisko heterozygotyczności mutacyjnej prowadzące do występowania licznych kombinacji genotypowych i przyczyniające się do klinicznej niejednorodności choroby. W niektórych przypadkach na podstawie genotypu można oszacować prawdopodobny poziom aktywności enzymatycznej PAH.

Tabela 12.4. Związek między rodzajem mutacji w *PAH* a fenotypem PKU

Mutacja	Częstość	Aktywność PAH*	Fenotyp
R408W	31%	<1%	Klasyczna PKU
IVS12+nt1G → A	11%	<1%	Klasyczna PKU
IVS10-11 G → A	6%	brak	Klasyczna PKU
I65T	5%	26%	Klasyczna PKU Łagodna PKU Hyperfenyloalaninemia
Y414C	5%	50%	Łagodna PKU Hyperfenyloalaninemia
R261Q	4%	30%	Klasyczna PKU Łagodna PKU

*Aktywność mierzona w komórkach COS zawierających gen *PAH* z wymienioną mutacją.

Ze względu na występowanie korelacji między genotypem a fenotypem (tabela 12.4) wykrycie konkretnej zmiany może być również wykorzystane do ustalenia stopnia restrykcyjności diety chorego pod względem zawartości fenyloalaniny. Ponadto u chorych z mutacjami w obrębie domeny PAH wiążącej kofaktor BH4 (V190A, R241C, A300S, A313T, E390G, A403V i P407S) możliwe jest zwiększenie aktywności enzymu przez podawanie farmakologicznych dawek 6(R)-L-erytro-tetrahydrobiopteryny. Diagnostyka prenatalna u kobiet z rodzin ryzyka w przypadku wykrycia mutacji w *PAH* pozwala na wdrożenie odpowiedniej diety jeszcze przed urodzeniem dziecka.

U pacjentów z pozytywnym wynikiem badania przesiewowego wykonuje się analizę mutacji *PAH*. Obecnie dostępne są zestawy diagnostyczne pozwalające wykryć panel najczęstszych mutacji. W polskiej populacji 75% chorych ma jedną z dziesięciu mutacji (R408W, R158Q, IVS10, R216Q, IVS10-c.1066-11g-a, IVS12-c.1315+1g-a, G272X, R252W, Y414C, P281L). Znalezienie mutacji w obu allelach jest możliwe u ponad 55% chorych. Wykrywanie najczęściej występujących mutacji prowadzone jest z wykorzystaniem reakcji PCR do amplifikacji regionów występowania mutacji i następczej analizy RFLP z zastosowaniem odpowiednich enzymów restrykcyjnych. W przypadku nie wykrycia mutacji sekwencjonowaniu poddawanych jest 13 eksonów wraz z obszarami graniczącymi z intronami co umożliwia wykrycie około 94% mutacji lecz jest stosunkowo kosztowne. Sekwencjonowanie może być zastąpione przez wysokosprawną chromatografię cieczową w warunkach denaturujących (DHPLC), która pozwala na wykrycie 96% mutacji i jest analizą tańszą.

12.5.3. Interpretacja wyników testów molekularnych

Stosunkowo duża heterogenność klinicznych fenotypów PKU spowodowana jest dużą ilością różnych mutacji występujących w genie *PAH*. Mutacje nonsensowe eliminujące całkowicie aktywność PAH prowadzą do rozwoju klasycznej postaci PKU. Natomiast mutacje, które determinują powstanie białka o częściowej aktywności enzymatycznej mają wpływ na rozwój łagodniejszych form choroby. Jak we wszystkich chorobach jednogenowych postać choroby zależy od rodzaju mutacji w genie *PAH*. Jednak zależność między rodzajem mutacji a obrazem fenotypowym nie zawsze jest stała. Wynika to z wpływu innych czynników genetycznych i środowiskowych. U niektórych chorych na PKU nie stwierdza się upośledzenia umysłowego pomimo nie stosowania diety restrykcyjnej i obecności podwyższonego stężenia fenyloalaniny w płynach ustrojowych. Wpływ innych czynników niż mutacje w *PAH* na przebieg PKU potwierdzają obserwacje rodzeństwa posiadającego taki sam zestaw zmian genetycznych w obrębie *PAH*, ale różniących się obrazem fenotypowym.

12.6. Głuchota wrodzona

Wrodzony niedosłuch jest rozpoznawany na podstawie wyników badań fizykalnych, otologicznych i audiologicznych uzupełnianych przez wywiad rodzinny i badania pomocnicze obejmujące tomografię komputerową kości skroniowej, analizę moczu, badania czynnościowe tarczycy, wziernikowanie ucha i elektrokardiografię. Pomimo tak szerokiego spektrum przeprowadzanych analiz często jednoznaczna identyfikacja podłoża genetycznego niedosłuchu jest trudna. Dopiero rozwój diagnostyki molekularnej stworzył możliwość postawienia jednoznacznej diagnozy niedosłuchu wrodzonego

12.6.1. Podłoże molekularne

Wśród niedosłuchów wrodzonych można wyodrębnić te spowodowane mutacją w obrębie jednego genu (monogenowe) oraz te będące wynikiem kombinacji czynników środowiskowych i mutacji występujących w szeregu genach (postacie wieloczynnikowe). Postaci niedosłuchu jednogenowe można z kolei podzielić na te, którym nie towarzyszą inne poza utratą słuchu objawy (niedosłuch izolowany) oraz zespoły dysmorficzne w których utrata słuchu jest jednym z objawów szeregu zmian patologicznych (niedosłuch objawowy). Niedosłuch izolowany jest najczęściej (70%) występującym niedosłuchem warunkowanym genetycznie. Ten typ niedosłuchu jest zróżnicowaną pod względem podłoża molekularnego i objawów klinicznych grupą niedosłuchów. Znane jest ponad 60 różnych *loci* (DFN) sprzężonych z utratą słuchu, wśród których 28 związane jest z postaciami dziedziczymi się w sposób autosomalny recesywny (DFNB), 29 są formami dziedziczonymi w sposób autosomalny dominujący (DFNA) i 6 jest zlokalizowanych na chromosomie X (DNF). Niedosłuch DNFB jest najczęściej (75%) występującą formą wrodzonego niedosłuchu prelingwalnego charakteryzującego się nieodwracalnym uszkodzeniem funkcji ślimaka i niedosłuchem odbiorczym. Genem, którego mutacje powodują utratę słuchu jest gen *GJB2* położony w regionie q12-13 chromosomu 13. Mutacje w *GJB2* obserwowane są u 55% pacjentów z głębokim niedosłuchem, u 48% dzieci z niedosłuchem ciężkim i u 42% z niedosłuchem umiarkowanym. U 70% pacjentów upośledzenie słuchu nie zmienia się w czasie, ale u części chorych obserwowana jest stopniowa progresja (5-10 dB) do osiągnięcia dojrzałości.

Gen *GJB2* zbudowany jest z dwócheksonów z których jedynie drugi koduje sekwencję białka, natomiast pierwszy odgrywa rolę regulatorową w procesie transkrypcji. Produktem genu jest koneksyna 26 (Cx26) będąca białkiem oligomeryzującym z pięcioma innymi koneksynami w wyniku czego powstaje przezłonowa struktura białkowa nazywana koneksonem. Koneksyny sąsiadujących komórek oddziałując ze sobą tworzą kanały szczelinowe (*neksus*) łączące wnętrza tych komórek umożliwiając międzykomórkowy przepływ jonów i metabolitów co zapewnia ich synchroniczną i szybką odpowiedź na bodźce. Cx26 występuje w fibrocytach i komórkach podporowych ślimaka i odgrywa istotną rolę w transporcie jonów potasowych zapewniając ich szybkie przemieszczanie w obrębie komórek podporowych i komórek prążka naczyniowego. Mutacje w obrębie *GJB2* powodują brak białka Cx26 lub są przyczyną utraty jego funkcji w wyniku skrócenia okresu półtrwania (przyspieszona degradacja), upośledzonego transportu do błony plazmatycznej, zmian strukturalnych zaburzających funkcje transportowe koneksonu lub niezdolność do oligomeryzacji. Do chwili obecnej poznano ponad 80 różnych zmutowanych alleli *GJB2* związanych z niedosłuchem. Najczęściej wśród mutacji *GJB2* obserwuje się zmianę sensu, delecje ze zmianą ramki odczytu i mutacje typu nonsensowego. W populacji kaukaskiej najczęstszą mutacją jest delecja glicyny w pozycji 35 (35delG). Mutacja ta w Europie wykrywana jest w

70-85% zmutowanych alleli *GJB2* stanowiąc ~40% wszystkich mutacji stwierdzanych u chorych z wrodzoną głuchotą. Szacuje się, że częstość występowania nosicielstwa 35delG w populacji polskiej wynosi około 1:50 i jest podobna do tej spotykanych w krajach sąsiednich. W obrębie krajów Europy obserwuje się swojego rodzaju gradient występowania tej mutacji zorientowany z południa na północ. Największą częstość (~3,3%) nosicielstwa 35delG notuje się w populacji basenu Morza Śródziemnego, a najniższą (0,5%) w Wielkiej Brytanii. Poza delecją 35delG w populacji polskiej obserwuje się również 5 innych mutacji występujących częściej niż w pojedynczych przypadkach (M34T, Q47X, R184P, delQ120, 167delT, 313del14).

12.6.2. *Kliniczna użyteczność badań molekularnych*

W przypadku niedosłuchu wrodzonego związanego z mutacją *GJB2* istotnym jest potwierdzenie rozpoznania klinicznego za pomocą testu molekularnego gdyż to zaoszczędza dziecku niepotrzebny stres związany z dodatkowymi badaniami. Drugą i o wiele istotniejszą korzyścią wynikającą z wczesnego rozpoznania jest możliwość wdrożenia szybkiej interwencji terapeutycznej, która może decydować o powodzeniu leczenia i mieć istotny wpływ na prawidłowy rozwój dziecka. Cechą charakterystyczną wrodzonych izolowanych niedosłuchów jest brak innych współwystępujących objawów klinicznych.

Niezwykle rzadko niedosłuch warunkowany mutacją *GJB2* współistnieje z hiperkeratozą dłoni i stóp, lecz dotyczy to specyficznych wariantów alleli *GJB2*. Mutację D66H obserwuje się u chorych z niedosłuchem, któremu towarzyszy nietypowa odmiana rogowca (keroderma multilans Vohwinkel) rozwijająca się na skutek nieprawidłowej produkcji inwolukryny będącej białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej keratynocytów warstwy ziarnistej skóry. Poza niedosłuchem i zmianami skórnymi w tym zespole chorobowym obserwuje się również spontaniczną autoamputację paliczków dłoni. Inną mutacją, którą wykrywa się u chorych z niedosłuchem warunkowanym *GJB2* i współistniejącym rogowcem stóp i dłoni, jest M34T.

Badania mutacji w *GJB2* prowadzone w celu diagnozy DFNB1 mają dwa podstawowe ograniczenia. Pierwsze ograniczenie wynika z ilości mutacji i ich losowego rozmieszczenia w obrębie całego genu co wiąże się z koniecznością analizy całej sekwencji kodującej. Drugim ograniczeniem jest niewielka korelacja między genotypem i fenotypem utrudniająca przewidywanie na podstawie zidentyfikowanych mutacji stopnia niedosłuchu u chorego. Często u chorych z niedosłuchem warunkowanym *GJB2* i posiadających te same zmiany genetyczne stwierdza się różny stopień upośledzenia słuchu.

12.6.3. Dostępne analizy molekularne

Analiza mutacji *GJB2* prowadzona jest w oparciu o metody opracowane w poszczególnych laboratoriach analitycznych z wykorzystaniem metody PCR-RFLP, PCR specyficznego względem allelu (AS-PCR), analizy polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP), analizy heterodupleksów (HA), wysokosprawną chromatografię cieczową w warunkach denaturujących (DHPLC), RT-PCR i sekwencjonowanie bezpośrednie. Ze względu na stosunkową prostotę i niską kosztocłonność analizy AS-PCR jest ona często stosowana lecz jej wadą jest brak kontroli pojedynczej reakcji PCR. Złotym standardem do ustalenia nieznannej mutacji jest sekwencjonowanie. W przypadku *GJB2* sekwencja kodująca o wielkości 770 pz położona jest tylko w jednym eksonie, co ułatwia znacznie amplifikację fragmentów odpowiedniej długości.

12.6.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Najczęstszym testem przesiewowym stosowanym do wykrycia DFNB1 jest test oparty o wykrywanie mutacji 35delG. Teoretyczną czułość wykrywania zmutowanego *GJB2* z wykorzystaniem metody AS-PCR do wykrywania 35delG (zdefiniowana jako stosunek liczebności populacji z niedosłuchem warunkowanym *GJB2* i mutacją 35delG do liczebności populacji z niedosłuchem warunkowanym wszystkimi mutacjami *GJB2*) oblicza się na 96,9%, natomiast teoretyczna specyficzność tej metody (stosunek liczby chorych z niedosłuchem niezwiązanym z *GJB2* i nie posiadającej 35delG do liczby chorych z niedosłuchem niezwiązanym z *GJB2*) to 97,4%. Obliczenia te zakładają całkowicie losowe dobieranie się par rodzicielskich pod względem nosicielstwa zmian w *GJB2*. W subpopulacjach o ograniczonej heterogenności genetycznej czułość tej metody przesiewowej będzie malała. W populacji USA wartości empiryczne tych parametrów są zbliżone do teoretycznych wartości i wynoszą odpowiednio 94% i 97%.

W przypadku testu przesiewowego opartego o wykrywanie 35delG otrzymanie wyniku badania molekularnego 35delG/35delG lub 35delG/(inna mutacja) jest równoznaczne z potwierdzeniem rozpoznania klinicznego. Wynik ten może posłużyć również do badań nosicielstwa w obrębie rodziny chorego. Natomiast otrzymanie wyniku -/- tego testu przesiewowego formalnie nie wyklucza obecności mutacji rzadkich jednak w populacji polskiej jest to sytuacja mało prawdopodobna. U pacjentów, u których rozpoznanie kliniczne wskazuje na wrodzony niedosłuch analizie należy poddać inny *locus DFNB*. W przypadku takim nie można również wykluczyć podłoża środowiskowego choroby.

Inną grupę stanowią probanci o genotypie 35delG/+. Chorzy ci posiadają mutację tylko w jednym allelu *GJB2*. Na podstawie tego wyniku nie można rozstrzygnąć czy chory jest heterozygotą dwóch mutacji w *GJB2* lub nosicielem

mutacji 35delG, a niedosłuch jest wynikiem zmian w innym *locus*. Wśród chorych DFNB1 w zależności od populacji obserwuje się od 1 do 10% przypadków występowania heterozygot 35delG/+. Może to świadczyć o występowaniu niezidentyfikowanych genów modyfikujących, których mutacje wywołują efekt plejotropowy i prowadzą do utraty słuchu.

12.7. Hemofilia A

Hemofilia A (HA) jest wrodzoną skazą krwotoczną spowodowaną niedoborem VIII czynnika krzepnięcia krwi (FVIII). Choroba ta dziedziczy się w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X i dotyka w przybliżeniu 1:10000 żywo urodzonych dzieci płci męskiej. W około 30% przypadków są to zachorowania spowodowane nowymi mutacjami pojawiającymi się w rodzinach, w których dotąd nie notowano przypadków zachorowań na HA. Diagnostyka HA polega na ocenie aktywności czynnika VIII i na podstawie otrzymanych wyników zakwalifikowaniu chorego do jednej z trzech grup HA: ciężkiej (poniżej 1% aktywności FVIII), umiarkowanej (1-5% aktywności FVIII) i łagodnej (powyżej 5% aktywności FVIII). Dokładniejszy opis diagnostyki HA można znaleźć w tomie I Diagnostyki Laboratoryjnej.

12.7.1. Podłoże molekularne

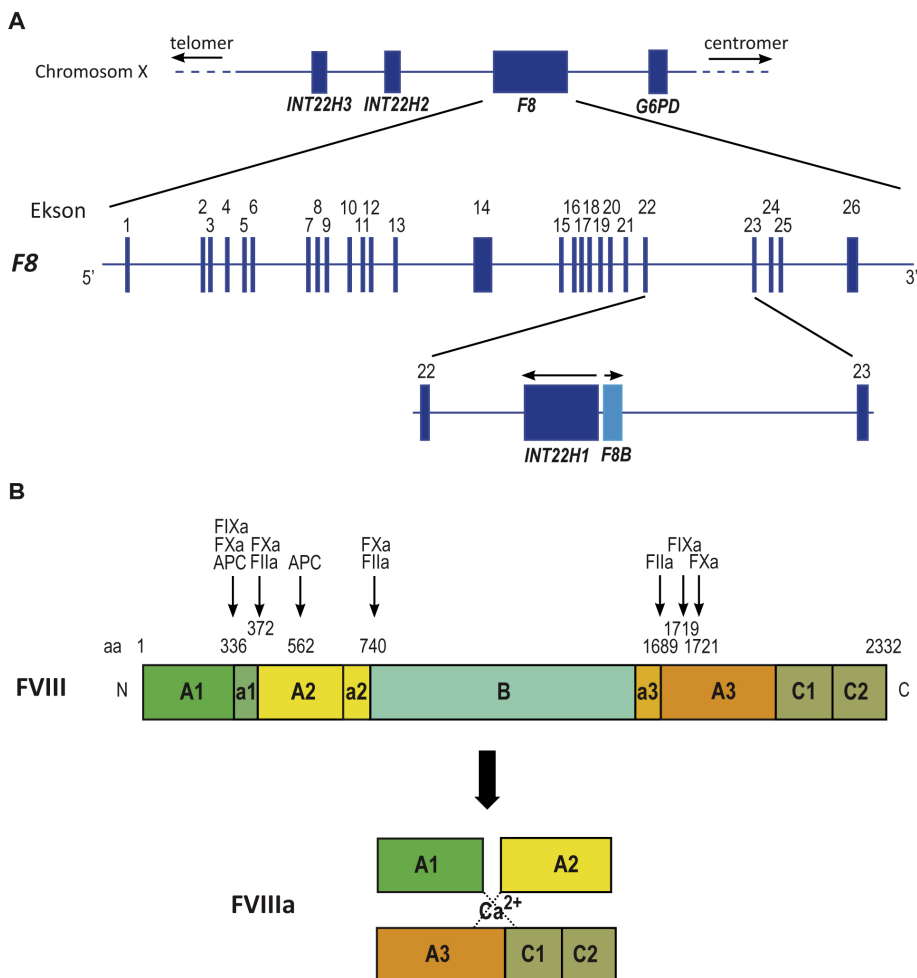
Gen kodujący czynnik VIII znajduje się na długim ramieniu chromosomu X (Xq28) i obejmuje 186 kpz. Sekwencje kodujące zlokalizowane są w 26 relatywnie krótkich eksonach przedzielonych dużymi intronami 14-23 kpz (ryc. 12.6). W obrębie intronu 22 położone są dwa inne geny. Jeden z nich *INT22H1* długości 2 kpz nie zawiera intronów i jest odczytywany w kierunku przeciwnym do genu czynnika VIII. Drugi z nich długości 2,5 kpz podlega transkrypcji w tym samym kierunku co gen czynnika VIII. Sekwencja *INT22H1* podlega dwukrotnej replikacji w obszarze położonym około 500 par zasad powyżej genu czynnika VIII w pobliżu zakończenia chromosomu X. Te dodatkowe kopie *INT22H1* leżą w odległości 100 kpz jedna od drugiej i nazywane są *INT22H2* (proksymalna) oraz *INT22H3* (dystalna). Te trzy sekwencje uczestniczą często w inwersji intronu 22, która jest związana z rozwojem ciężkiej postaci HA.

Produktem genu jest mRNA wielkości ~9 kz, z czego białko jest kodowane przez 7053 nukleotydów. Białko FVIII składa się z 2332 aminokwasów tworzących szereg funkcjonalnych domen A1, A2, B, A3, C1 i C2. Aktywna forma FVIII, czynnik VIIIa powstaje na wskutek cięcia trombiną (FIIa) lub czynnikiem Xa (FXa). Białko czynnika VIII cięte jest również przez czynnik IXa (FIXa) i aktywowane białko C (APC) w miejscach pokazanych na ryc. 12.6. Cięcie w pozycji 740 i 1721 nie ma wpływu na aktywność prokoagulacyjną FVIIIa.

W obrębie genu czynnika VIII zidentyfikowano wiele mutacji, z których najczęściej występują mutacje punktowe, delecje i inwersje. Cały czas identyfikowane są nowe mutacje, które umieszczane są w międzynarodowej bazie danych (<http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm>). W przybliżeniu u 40% chorych na hemofilię A obserwuje się wystąpienie inwersji w intronie 22 powstającej na skutek rekombinacji *INT22H1* z dwoma sekwencjami homologicznymi *INT22H2* i *INT22H3*. W wyniku tego dochodzi do inwersji eksonów 1-22 i przeniesienia ich ~500 kbp powyżej eksonu 23-26. W około 5% przypadków ciężkiej postaci HA występuje inwersja eksonu 1. Z uwagi na dużą wielkość genu czynnika VIII delecje występują w nim stosunkowo często i stanowią w przybliżeniu 5% wszystkich stwierdzonych dotąd mutacji. Zazwyczaj delecje te występują u chorych z ciężką postacią HA. Niektóre z nich są jednak związane z rozwojem umiarkowanej formy HA. Należą do nich delecja 156 bp w eksonie 22 oraz delecja 294 bp w eksonach 23 i 24. Częściowa aktywność FVIII zostaje zachowana, ponieważ zachowana zostaje ramka odczytu w trakcie składania eksonów. Pacjenci z dużymi delecjami mają skłonność do produkowania przeciwciał w stosunku do FVIII w odpowiedzi na terapię preparatami zawierającymi FVIII. Dzieje się tak u ~40% chorych z dużymi delecjami i ~60% chorych z nonsesowymi mutacjami punktowymi, lecz tylko u 15% chorych z mutacjami zmiany sensu. W przybliżeniu 50% pacjentów z HA ma mutacje punktowe zmieniające sens, powodujące przesunięcie ramki odczytu, insercje, duplikacje lub zmieniające miejsce składania mRNA. Mutacje zmiany sensu występują w obrębie całego genu kodującego FVIII.

W obrębie genu dla FVIII obecne są zewnątrzgenowe i wewnątrzgenowe regiony (markery) polimorficzne, które umożliwiają analizę haplotypów pomocną w analizie nosicielstwa i dziedziczenia. Wykaz tych polimorfizmów można znaleźć w bazie danych pod adresem:

<http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm>.



Ryc. 12.6. Gen *F8* oraz białko przez niego kodowane. **A.** Schemat genu *F8* z zaznaczonym miejscem położenia w obrębie eksonu 22 dwóch dodatkowych genów, *INT22H1* (*F8A*) oraz *F8B*. Strzałki pokazują kierunek transkrypcji. Powyżej schematu genu *F8* przedstawione jest położenie dwóch kopii *INT22H1* na chromosomie X względem położenia *F8*. *INT22H2* i *INT22H3* umiejscowione są w pozycji telomerowej względem *F8*. *G6PD* jest genem dehydrogenazy glukozy 6-fosforanowej. **B.** Rozmieszczenie domen w białku *FVIII*. Aktywacja *FVIII* następuje w wyniku ograniczonego cięcia (w miejscach zaznaczonych strzałkami) trombiną (*FIIa*), aktywowanym czynnikiem IX (*FIXa*), aktywowanym czynnikiem X (*FXa*) oraz aktywowanym białkiem C (*APC*) co powoduje degradację podjednostki B i powstanie aktywnego *FVIII* poprzez asocjację peptydu A1 i A2 (łańcuch ciężki) z peptydem A3-C1-C2 (łańcuch lekki) przy udziale jonów wapnia. Poniżej strzałek podane są numery aminokwasów

12.7.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych

Stwierdzenie obniżonej aktywności FVIII u kobiety zagrożonej nosicielstwem zazwyczaj jest potwierdzeniem nosicielstwa HA, lecz otrzymanie wartości prawidłowych aktywności FVIII nie wyklucza nosicielstwa. W takim przypadku testy molekularne pozostają jedyną opcją diagnostyczną. Znajomość mutacji u pacjenta może być użyteczna w ocenie ryzyka pojawienia się przeciwciał przeciw FVIII. Identyfikacja mutacji może być również pomocna w badaniu nosicielstwa w obrębie członków rodziny chorego. W przypadku ciąży nosicielskiej, diagnostyka prenatalna dostarcza użytecznych informacji pomocnych przy porodzie.

Laboratoria oferujące diagnostykę molekularną HA stosują analizę bezpośrednią (sekwencjonowanie, RT-PCR, hybrydyzacje z sondami do poszczególnych mutacji, PCR-RFLP, SSCP, analizę heterodupleksów, DHPLC) lub pośrednią (analiza sprzężeń polimorfizmów).

Obniżona aktywność FVIII po wykluczeniu choroby von Willebranda (vWD) i błędów przedlaboratoryjnych (niewłaściwe postępowanie z próbką) potwierdza definitywnie rozpoznanie kliniczne. W niektórych przypadkach obniżona aktywność FVIII może być wynikiem innych rzadkich chorób warunkowanych zmianami genetycznymi. Sytuację taką obserwuje się w przypadku choroby von Willebranda typu 2N oraz sprzężonego niedoboru czynnika V i VIII. Z tym ostatnim mamy do czynienia w sytuacji wystąpienia mutacji w obrębie *ERGIC53*. Gen ten koduje białko niezbędne do przeniesienia FVIII i FV z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego. W rezultacie obserwuje się obniżoną aktywność FVIII (na poziomie 15%) oraz FV (około 10%). Wykrycie obecności określonej mutacji determinuje genotyp probanta i może być wykorzystane do potwierdzenia nosicielstwa.

12.8. Choroba von Willebranda

Choroba von Willebranda (vWD) jest heterogenną grupą chorób autosomalnych spowodowanych niedoborem czynnika von Willebranda (vWF). vWD jest najczęstszą wrodzoną skazą krwotoczną u ludzi i występuje z częstością 1:250 urodzeń (wszystkie formy). Częstość występowania vWD o ciężkim przebiegu wynosi 1:8000 urodzeń. Pod względem rodzaju zmiany vWF poszczególne podtypy vWD można podzielić na te, które są spowodowane zmianami ilościowymi (typ I i III) oraz defektem jakościowym (typ II). Analiza rodzaju niedoboru vWF możliwa jest za pomocą badania stopnia obniżenia agregacji płytek krwi pod wpływem ristocetyny lub standardowego wzorca (szerszy opis w tomie I Diagnostyki Laboratoryjnej). W obrębie chorych na vWD obserwujemy zarówno fenotypy dominujące jak i recesywne, które klinicznie mogą być trudne do rozróżnienia.

12.8.1. Podłoże molekularne

Gen *VWF* obejmujący 180 kpz i zawierający 52 eksony położony jest w pobliżu końca krótkiego ramienia chromosomu 12 w pozycji p13.2. Na chromosomie 22 w pozycji q11.2 zlokalizowany jest nie podlegający ekspresji pseudogen o nieustalonej funkcji, który zawiera sekwencje homologiczne do eksonów 23-34 genu *VWF*. Białko vWF podlega biosyntezie w komórkach endotelialnych i megakariocytach jako pre-pro-peptyd. Pre-pro-vWF zbudowany jest z 2813 aminokwasów, w ramach których znajduje się 22-aminokwasowa sekwencja sygnałna, 741 aminokwasowy pro-peptyd oraz 2050 aminokwasowe białko właściwe zawierające szereg domen funkcjonalnych będących miejscami oddziaływania z innymi białkami (ryc. 12.7). Po usunięciu sekwencji sygnałnej pro-vWF dimeryzuje tworząc mostki dwusiarczkowe w C-końcowej części białka, a następnie przebiega dalsza polimeryzacja z wytworzeniem mostków siarczkowych od N-końca. W rezultacie powstają multimery białkowe o masach od 0,5 do 10 milionów Da. Dojrzały vWF przechowywany jest jako glikoproteina w ziarnistościach alfa płytek oraz ciałkach Weibel-Palade aparatu Golgiego komórek endotelialnych, z których jest wydzielany do osocza.

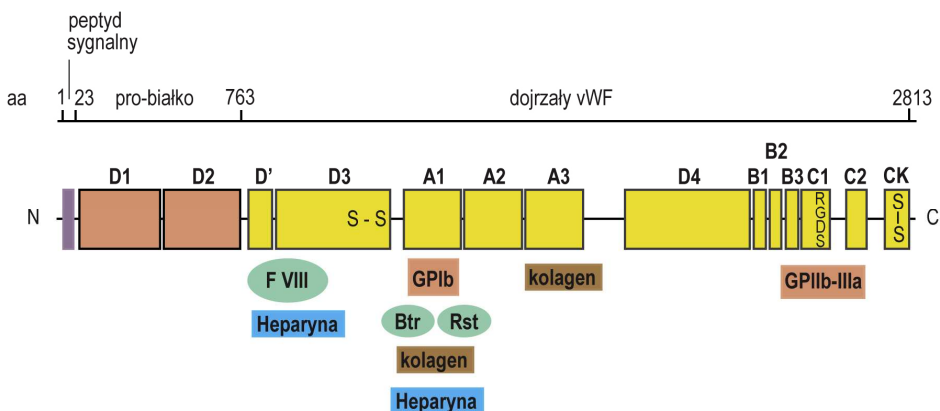
Do najczęściej spotykanych mutacji w genie *VWF*, które prowadzą do upośledzenia funkcji AWF, należą mutacje punktowe, insercje, delecje, mutacje w obrębie miejsc składania eksonów, mutacje nonsensowe i zmiany sensu. Wykaz tych zmian i zestawienie polimorfizmów dostępny jest pod adresem Komitetu Standaryzacji Naukowej Międzynarodowego Towarzystwa Zakrzepicy i Hemostazy; www.shef.ac.uk/vwf. Większość z dotychczas poznanych mutacji *VWF* związanych jest z typem 2 vWD, natomiast molekularne zmiany u chorych z najczęściej występującym typem 1 choroby są bardzo słabo poznane. W przypadku choroby typu 2 lokalizacja mutacji w obrębie *VWF* koreluje z podtypem choroby. Należy jednak zaznaczyć, że z uwagi na zmienną ekspresywność i niepełną penetrację wady genetycznej stopień nasilenia skazy krwotocznej u chorych z poszczególnymi typami vWD jest różny.

Typ 1 choroby von Willebranda

Typ 1 vWD stanowi w przybliżeniu 70-80%% wszystkich skaz krwotocznych związanych z defektami vWF i dziedziczony jest zazwyczaj w sposób autosomalny dominujący. W większości przypadków osoby z typem 1 choroby mają łagodne objawy kliniczne i charakteryzują się obniżonym poziomem osocznego antygeny vWF, zmniejszoną aktywacją ristocetyną, obniżoną aktywnością czynnika VIII i normalną dystrybucją multimetrów vWF.

U niektórych chorych na typ 1 vWD występują mutacje typu nonsens, zmiany ramki odczytu lub delecje podobne do tych, które występują u pacjentów z typem 3 choroby. W kilku przypadkach obserwowano mutacje zmieniające sens w sekwencji kodującej domenę D3. Zaobserwowano, że ciężkość przebiegu choroby typu 1 jest nasiloną u chorych z dwoma różnymi allelami zmutowanego

VWF. Współwystępowanie mutacji R854Q i R2535 związane jest z nasileniem objawów krwotocznych w porównaniu do chorych z pojedynczą zmianą obecną w obu allelach. Ponadto osoby będące heterozygotami dotknięte są tylko w niewielkim stopniu objawami skazy krwotocznej.



Ryc. 12.7. Rozmieszczenie domen funkcjonalnych w czynniku von Willebranda (vWF). Czynniki von Willebranda powstaje jako pre-pro-białko składające się z 2813 aminokwasów. Przekształcenie w dojrzałe białko następuje po odcięciu pierwszych 763 aminokwasów zawierających sekwencję sygnałną, oraz domeny D1 i D2. W końcowej domenie CK znajdują się reszty cysteinowe odpowiedzialne za tworzenie mostków dwusiarczkowych (S-S) podczas formowania dimerów vWF. W aparacie Golgiego dimery vWF polimeryzują przez tworzenie mostków dwusiarczkowych z udziałem cystein obecnych w domenie D3. W domenie C1 znajduje się sekwencja RGDS (arginina-glicyna-asparagina-seryna), która jest miejscem wiązania płytkowego receptora glikoproteiny GPIIb/IIIa. W domenie A1 znajduje się miejsce wiązania płytkowego receptora GPIb. W obrębie tej domeny znajdują się również miejsca wiązania botrocetyny (Btr), ristocetyny (Rst), kolagenu i heparyny. Heparyna jest również wiązana w obrębie domeny D3, gdzie również znajduje się miejsce oddziaływania z czynnikiem VIII (FVIII)

Typ 2 choroby von Willebranda

Typ 2 vWD charakteryzuje się zmianami jakościowymi vWF skutkującymi zmniejszoną stabilnością, upośledzoną funkcją i zmianą dystrybucji multimerów.

Podtyp 2A

Podtyp 2A stanowi ~75% wszystkich przypadków typu 2 vWD i jest spowodowany zmianami genetycznymi dziedziczącymi się w sposób autosomalny dominujący. Większość chorych z podtypem 2A vWD ma mutacje zmiany sensu (R1597W, R1597Q, R1579Y, S1506L) w obrębie sekwencji *VWD* kodującej domenę A2. Mutacje te powodują upośledzenie składania

multimetrów vWF, co skutkuje obecnością multimetrów o zmniejszonej wielkości zarówno w osoczu jak i płytkach. Niektóre z mutacji nie powodują zmian w składaniu i wydzielaniu normalnych multimetrów vWF, lecz determinują zwiększoną podatność na proteolityczną degradację, co powoduje spadek multimetrów wielkocząsteczkowych w osoczu, natomiast w płytkach nie obserwuje się zmian.

Podtyp 2B

Podtyp 2B stanowi ~20% wszystkich przypadków typu 2 vWD i jest spowodowany zmianami genetycznymi dziedziczącymi się w sposób autosomalny dominujący. U pacjentów z tym wariantem vWD obserwuje się średnio nasiloną lub umiarkowaną małopłytkowość, co jest czynnikiem różnicującym od podtypu 2A. Większość mutacji obserwowanych u pacjentów z typem 2B vWD ma mutacje zmiany sensu w obrębie domeny A1. Cztery z tych mutacji (R1306W, R1308C, V1316M, R1341Q) stanowią 90% wszystkich mutacji zidentyfikowanych u chorych z podtypem 2B. Mutacje w obrębie domeny A1 vWF powodują utratę miejsca regulatorowego, które normalnie hamuje wiązanie domeny A1 do płytkowego receptora GPIIb. W rezultacie w testach z ristocetyną obserwuje się agregację płytek już przy jej niższych stężeniach (patrz rozdział 5 tom II).

Podtyp 2M

W podtypie 2M vWD poziom antygenu vWF oraz dystrybucja multimetrów vWF jest normalna, natomiast odpowiedź na stymulację ristocetyną jest obniżona co odzwierciedla dysfunkcję multimetrów vWR. Czasami obserwuje się obecność pro-vWF lub ultra dużych multimetrów vWF. Mutacjami występującymi u chorych z podtypem 2M vWD są mutacje zmiany sensu występujące w obrębie domeny D3 (R1205H, Y1146C) oraz domeny A1 (G1324S, G1324A, E1359K, F1369I, I1425F). U niektórych chorych obserwuje się również delecje (Q119del1, K1408delK) w domenie A1. Mutacja R1205H występuje dość często w populacji europejskiej i często towarzyszy jej mutacja M740I.

Podtyp 2N

Chorzy na wersję 2N vWD charakteryzują się normalnym poziomem antygenu vWF, niezmienną odpowiedzią na ristocetynę oraz normalnym rozkładem multimetrów vWF. Objawy kliniczne podobne są do tych obserwowanych w łagodnej hemofilii A, lecz podtyp 2N choroby von Willebrada dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny. W jednym z międzynarodowych badań obejmujących 1198 chorych z łagodną hemofilią A zidentyfikowano 4,8% (58) przypadków wersji 2N vWD u osób z pierwotnie zdiagnozowaną hemofilią A. Odmiana 2N vWD spowodowana jest mutacjami (zmiany sensu) w domenach D'-D3, które zmieniają miejsce wiązania czynnika VIII. Wśród kilkunastu zidentyfikowanych mutacji trzy z nich (T791M, R816W, R854Q) spotykane są u 96% chorych.

Typ 3 choroby von Willebranda

Typ 3 choroby dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny i charakteryzuje się drastycznym obniżeniem poziomu antygeny vWF, niewielką odpowiedzią na stymulację ristocetyną i obniżoną aktywnością czynnika VIII (rozdział 5, tom II). Objawy kliniczne są cięższe niż u chorych z typem 1 vWD. Najczęstszymi mutacjami w typie 3 choroby są mutacje zmieniające ramkę odczytu, delecje i mutacje nonsensowe. Zazwyczaj pacjenci są heterozygotami w stosunku do danej mutacji, chociaż znane są przypadki wystąpienia tej samej mutacji w obu allelach. Wielkość fragmentów genu *VWF* podlegających delecji w typie 3 vWD jest różna od niewielkich fragmentów aż do utraty całego genu. U chorych homozygot delecyjnych genu vWF czasami obserwuje się występowanie alloprzeciwciał skierowanych przeciwko vWF. Obecność tych przeciwciał może skutkować opornością na terapię substytucyjną, oraz prowadzić do ciężkich reakcji anafilaktycznych po podaniu koncentratów vWF. W przypadku chorych na typ 3 vWD większość pacjentów ma dwie różne mutacje w każdym z alleli *VWF*, lecz znacząca część z nich ma rodziców bez objawów klinicznych choroby, co w znaczący sposób utrudnia poradnictwo genetyczne.

12.8.2. *Kliniczna użyteczność badań molekularnych*

Obecnie, największe znaczenie w wyborze leczenia i poradnictwie genetycznym ma oparte na diagnostyce molekularnej różnicowanie chorych z typem 2N vWD i chorych z łagodną hemofilią A. Obie grupy chorych charakteryzują się lekkim do średniego niedoborem aktywności czynnika VIII, czemu towarzyszy normalna odpowiedź w teście z ristocetyną i prawidłowy poziom antygeny vWF. W przypadku chorych z typem 2N vWD autosomalny charakter dziedziczenia i konieczność stosowania preparatów vWF, a nie koncentratów czynnika VIII, stanowi istotną różnicę. Oparte o diagnostykę molekularną różnicowanie typu 2A i 2B ma znaczący wpływ na postępowanie kliniczne z pacjentem. Chociaż pacjenci z podtypem 2A vWD mają różnego stopnia małopłytkowość, różnicowanie od podtypu 2B poprzez zliczanie płytek nie zawsze jest możliwe. Rozróżnienie między tymi dwoma podtypami vWD jest istotne ze względu na przeciwwskazanie stosowania wazopresyny u pacjentów z podtypem 2B u których jej podawanie może doprowadzić do pogłębienia małopłytkowości.

Ze względu na brak dobrze scharakteryzowanych zmian genetycznych u chorych z typem 1 vWD oraz łagodny fenotyp, diagnostyka molekularna w tej grupie pacjentów nie jest użyteczna. Natomiast, w typie 3 vWD charakteryzującym się ciężkim fenotypem i występowaniem dobrze scharakteryzowanych mutacji, wykrycie konkretnej zmiany genetycznej może być użyteczne w poradnictwie genetycznym i diagnostyce prenatalnej.

12.8.3. Dostępne analizy molekularne

Analiza DNA prowadzona w celu rozróżnienia typu 2N od łagodnej hemofilii oraz typu 2A od typu 2B vWD prowadzona jest w oparciu o analizę RFLP oraz sekwencjonowanie fragmentów genu vWF. Pośrednia diagnostyka VWD w oparciu o analizę sprzężeń jest również dostępna, lecz rzadko wykonywana i ograniczona jest z reguły do ciężkich przypadków typu 3 vWD. Obecnie analizy molekularne vWD nie są dostępne w rutynowych laboratoriach diagnostycznych, lecz można je wykonać w niektórych laboratoriach uniwersyteckich.

12.8.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Wykrycie homozygotycznej mutacji w domenie wiążącej czynnik VIII koreluje z obecnością podtypu 2N VWD. Jednak ze względu na to, że nie wszystkie mutacje *VWF* zostały dotąd poznane wynik negatywny badania określonych mutacji powinien być interpretowany z dużą ostrożnością, gdyż nie wyklucza obecności niezidentyfikowanej mutacji. W przypadku mutacji występujących w typie 2A i 2B większość z nich zlokalizowana jest w eksonie 28 *VWF*, lecz są również opisane przypadki szczytu krwotocznej typu 2, związanej z mutacjami w innym regionie genu *VWF*.

12.9. Trombofilia

Trombofilia, czyli skłonność do choroby zakrzepowo-zatorowej (ChZZ) jest wieloczynnikowym wrodzonym lub nabytym zespołem chorobowym. Genetycznie uwarunkowana skłonność do ChZZ dziedziczona jest w sposób autosomalny dominujący i w Polsce dotyka w przybliżeniu 8% populacji. W ~85% przypadków wrodzone stany prozakrzepowe spowodowane są mutacją Leiden (G1691A) w genie czynnika V (~63%), lub mutacją G20210A w genie protrombiny (~22%). Pozostałe ~12% przypadków wrodzonej trombofilii spowodowane są niedoborami białka C i S oraz antytrombiny. Opis diagnostyki laboratoryjnej trombofilii można znaleźć w rozdziale 9 tomu I Diagnostyki Laboratoryjnej oraz rozdziale 5 tomu II.

12.9.1. Podłoże molekularne

12.9.1.1. Mutacja Leiden czynnika V

Czynnik V (proakceleryna) jest glikoproteiną (300 kDa) kodowaną przez gen położony na chromosomie 1 w pozycji q23. Proakceleryna po aktywacji

ulega przemianie do akceleryny (czynnik Va), która jako kofaktor czynnika Xa przy współdziałaniu fosfolipidów tworzy kompleks – protrombinazę, warunkującą przekształcenie protrombiny do trombiny. Trombina powoduje przekształcenie fibrynogenu w fibrynę tworzącą sieć włókien skrzepu. Aktywność prozakrzepowa trombiny zostaje zahamowana przez wiązanie z trombomoduliną. Powstały kompleks trombina-trombomodulina aktywuje białko C, które w obecności białka S proteolitycznie degraduje aktywny czynnik V (FVa). Początkowo aktywne białko C (APC) przecina czynnik Va w pozycji 506, gdzie znajduje się arginina, co wywołuje zmianę konformacji i pełną ekspozycję pozostałych miejsc cięcia FV w pozycji R306 i R679 (ryc. 12.8).

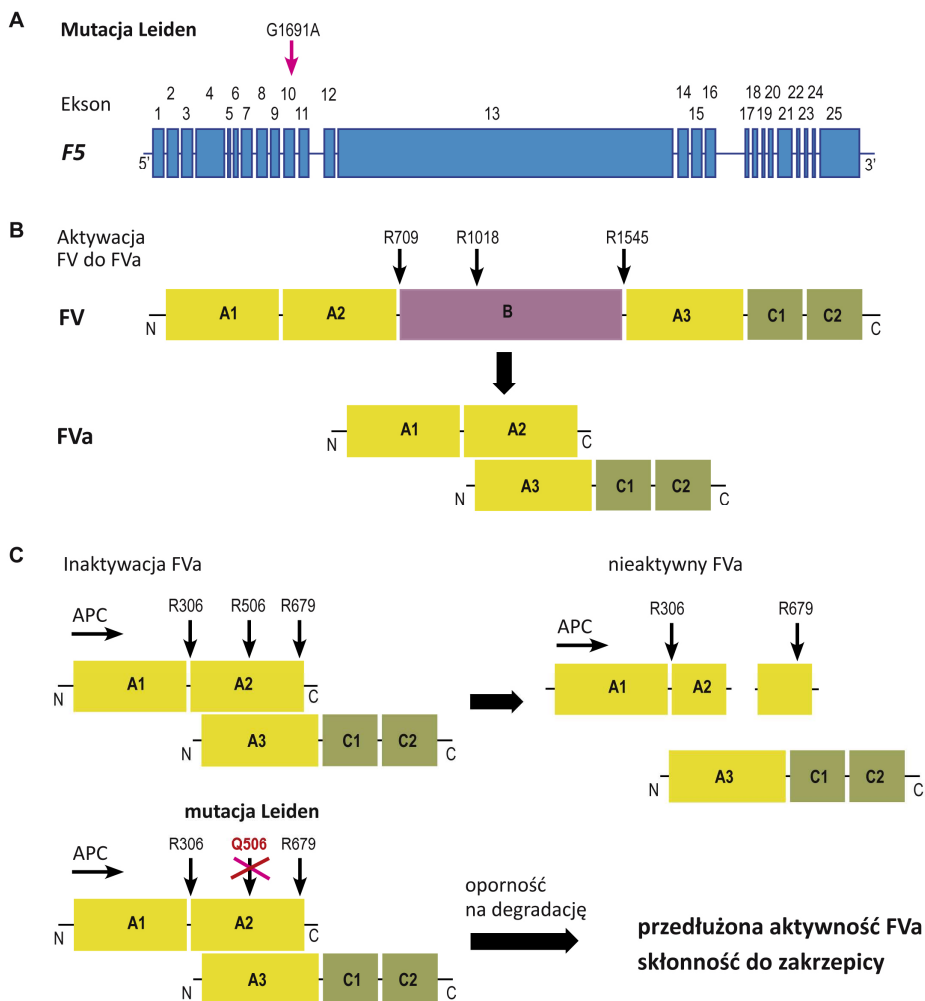
W obrębie genu kodującego FV zidentyfikowano dotąd szereg mutacji, z których większość powoduje obniżenie aktywności prozakrzepowej czynnika V. Jedną wśród tych mutacji, mutacja Leiden (nazwa miasta, gdzie mutację odkryto) powoduje skutek odwrotny, tj. zwiększa okres półtrwania FV. Mutacja Leiden zachodzi w eksonie 10 genu *FV* i polega na zamianie guaniny w pozycji 1691 do adeniny co powoduje, że w białku FV w pozycji 506 zamiast argininy znajduje się glutamina. Podstawienie Q w pozycji 506 niszczy miejsce cięcia rozpoznawane przez APC, co prowadzi do przedłużenia produkcji trombiny i zahamowania fibrynolizy.

Częstość występowania alella *FV* Leiden w populacji polskiej wynosi ~5%. W Europie najniższą częstotliwość występowania nosicieli mutacji Leiden obserwuje się w obszarach południowych (~2%), a największą na północy (15% w Szwecji). Częstotliwość nosicieli mutacji Leiden maleje w miarę przesuwania się z zachodu Europy na wschód poprzez Azję, Australię, Afrykę do Ameryki, gdzie wśród natywnych mieszkańców Ameryki Północnej wynosi ona 0,45%.

W przypadku wystąpienia mutacji Leiden w jednym allelu ryzyko powstania zakrzepów w łożysku żylnym wzrasta ~ 4-6-krotnie podczas, gdy u homozygot *FV* Leiden ryzyko to jest 40-krotnie większe.

12.9.1.2. Mutacja G20210A w protrombinie

Mutacja G20210A w protrombinie (Pt) jest stosunkowo często występującym polimorfizmem, który dotyczy końcowego nukleotydu 3'-regionu genu nie podlegającego translacji. W konsekwencji dochodzi do wzmocnienia sygnału cięcia (AAUAAA), zwiększonej poliadenylacji mRNA, jego akumulacji (zwiększony okres półtrwania) co łącznie prowadzi do zwiększonej syntezy białka Pt.



Ryc. 12.8. Gen *F5* oraz białko przez niego kodowane. **A.** Schemat genu *F5* z zaznaczonym miejscem wystąpienia mutacji Leiden w eksonie 10. **B.** Rozmieszczenie podjednostek w prebiałku FV. Aktywacja FV następuje w wyniku ograniczonego cięcia trombiną i FXa (w miejscach zaznaczonych strzałkami) co powoduje degradację podjednostki B i powstanie aktywnego FVa poprzez niekowalencyjną asocjację peptydu A1-A2 (łańcuch ciężki) z peptydem A3-C1-C2 (łańcuch lekki). Podjednostka C2 jest niezbędna do wiązania FVa z fosfolipidami błon komórkowych. **C.** Inaktywacja czynnika Va polega na proteolitycznej degradacji przez aktywowane białko A (APC). Początkowo APC nie wiąże peptydów w miejscu występowania argininy w pozycji 506, co powoduje zmianę konformacji białka i odsłonięcie pozostałych miejsc cięcia tj. R306 i R679 (zaznaczone strzałkami). Mutacja Leiden skutkuje zamianą argininy na glutaminę w pozycji 506, co niszczy miejsce cięcia APC

Zależności te zostały potwierdzone w badaniach rodzin u których członków stwierdzono występowanie tego polimorfizmu. Poziom osoczowej protrombiny

jest głównym czynnikiem determinującym osoczowy potencjał do produkcji trombiny. Produkcja trombiny w osoczu jest zwiększona zarówno u heterozygot jak i homozygotycznych nosicieli mutacji Pt G20210A. Ponadto podwyższony poziom protrombiny w osoczu hamuje APC-zależną inaktywację czynnika Va, co skutkuje wzrostem produkcji trombiny.

Średnia częstość występowania nosicielstwa mutacji Pt G20210A w populacji europejskiej wynosi 2%, przy czym jest ona niższa w regionach północnych (~1,7%), a wyższa na południu Europy (3%).

12.9.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych

Obecność mutacji Leiden w większości przypadków przebiega bezobjawowo, lecz u niektórych osób (~10% przypadków) obserwuje się objawy zakrzepicy żyłnej, skłonność do zatorowości płucnej, wielokrotne poronienia samoistne lub inne komplikacje ciąży. Wśród chorych na zakrzepicę częstość występowania mutacji Leiden wynosi 12-21%. Obserwuje się, że heterozygotyczni nosiciele mutacji Leiden mają 8-krotnie zwiększone ryzyko wystąpienia choroby zakrzepowo-zatorowej (ChZZ), podczas gdy dla homozygot ryzyko to zwiększa się 80-100-krotnie. Występowanie mutacji Pt G20210A jest związane z 2-3-krotnie wyższym ryzykiem rozwoju ChZZ i chociaż wzrasta ono u homozygot mutacja ta jest względnie słabym czynnikiem ryzyka. Ryzyko ChZZ znacząco wzrasta jednak u heterozygot posiadających mutację Leiden i Pt G20210A. Kliniczne i genetyczne czynniki ryzyka ChZZ oddziałują na siebie prowadząc do wzrostu zagrożenia rozwojem choroby. I tak, u kobiet będących heterozygotycznymi nosicielkami mutacji Leiden i przyjmujących doustne środki antykoncepcyjne ryzyko wystąpienia zakrzepicy wzrasta 30-krotnie, otrzymujących zastępczą terapię hormonalną wzrasta 7-16-krotnie, będących w ciąży wzrasta 7-16-krotnie. Kobiety nosicielki mutacji Pt G20210A przyjmujące doustne środki antykoncepcyjnymają ~16-krotnie zwiększone ryzyko wystąpienia zakrzepicy żył głębokich lub zatorowości płucnej i 150-krotnie zwiększone ryzyko wystąpienia zakrzepicy żył w mózgu. Osoby z mutacją Leiden poddane zabiegom chirurgicznym w większym stopniu zagrożone są ChZZ niż pacjenci bez zmian genetycznych.

Badanie DNA w celu wykrycia mutacji Leiden jest zalecane dla pacjentów:

- z historią nawracających przypadków zakrzepicy
- z odnotowanym przypadkiem zakrzepicy przed 50 rokiem życia
- z przypadkiem zakrzepicy niewspółwystępującej z klinicznymi czynnikami ryzyka
- z zakrzepicą żyły o nietypowej lokalizacji (krezka, wątroba, mózg)
- z historią rodzinnych przypadków zakrzepicy oraz zakrzepicą występującą u bliskiego członka rodziny przed 50 rokiem życia
- z zakrzepicą związaną z okresem ciąży, położeniem, przyjmujących doustne środki antykoncepcyjne lub zastępczą terapię hormonalną

- z niespodziewanymi poronieniami w drugim i trzecim trymestrze
- ze stwierdzonymi zmianami genetycznymi (mutacja Leiden, Pt G20210A) u członków najbliższej rodziny

12.9.3. Dostępne analizy molekularne

Bezpośrednia analiza DNA w celu wykrycia mutacji Leiden oraz Pt G20210A oparta jest w zasadzie na tych samych metodach obejmujących amplifikację fragmentu DNA w miejscu występowania mutacji za pomocą PCR, i następczym trawieniu enzymami restrykcyjnymi (PCR-RFLP), PCR specyficznego względem allelu (AS-PCR), RT-PCR z sondami fluorescencyjnymi które hybrydują, bądź do miejsca zawierającego mutację lub tylko do niezmutowanego DNA. Na rynku dostępne są również gotowe testy które mogą być wykorzystywane w rutynowych laboratoriach analitycznych.

12.9.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Niezależnie od wyniku badania DNA (-/-, -/+, +/+) w kierunku obecności mutacji Leiden lub Pt G20210A pacjenci z pierwszym przypadkiem zakrzepicy lub zatoru płucnego powinni być traktowani według standardowej procedury. Badania kliniczne nie potwierdziły dotąd pozytywnego efektu dożywnotnego stosowania antykoagulantów po pierwszym epizodzie zakrzepicy u pacjentów z mutacją Leiden, dlatego bezterminowe stosowanie leków przeciwzakrzepowych powinno być wprowadzane w oparciu o analizę innych czynników klinicznych. Bezterminowe stosowanie antykoagulantów może być zalecane u pacjentów z mutacją Leiden i samoistną zakrzepicą, lub zakrzepicą zagrażającą życiu, u pacjentów z kilkoma wrodzonymi genetycznymi zmianami warunkującymi trombofilię, lub pacjentów z długotrwałe działającymi innymi klinicznymi czynnikami ryzyka (choroba nowotworowa, poważne zaburzenia neurologiczne, obecność przeciwciał antyfosfolipidowych). Pacjenci z wrodzoną trombofilią tak jak każdy inny pacjent z nawracającymi przypadkami zakrzepicy powinni otrzymywać leki przeciwzakrzepowe bezterminowo. Obecność mutacji Leiden u kobiet z wcześniejszymi przypadkami samoistnej zakrzepicy wskazuje na konieczność stosowania antykoagulantów podczas ciąży oraz w okresie sześciu miesięcy po porodzie. Postępowanie takie nie jest zalecane do rutynowego stosowania u ciężarnych kobiet z mutacją Leiden bez wcześniejszych epizodów zakrzepicy.

12.10. Wrodzony rak piersi i jajnika

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem u kobiet. W Polsce rocznie (dane z 2004 roku) rozpoznawanych jest w przybliżeniu 12 000 nowych zachorowań oraz notuje się ~ 5 000 zgonów chorych na raka piersi. Choroba ta dotyka również mężczyzn lecz stanowią oni ułamek procenta (~0,9%) chorych. Rak piersi jest wieloczynnikową chorobą rozwijającą się w wyniku wzajemnego oddziaływania czynników środowiskowych i genetycznych. W większości przypadków dostępne analizy molekularne nie mogą stanowić podstawy do oceny stopnia zagrożenia rozwojem choroby. Istnieje jednak niewielka grupa chorych (5-20%) u których rak piersi ma charakter dziedziczny i rozwija się w wyniku przekazywania potomstwu zmian genetycznych charakteryzujących się wysoką penetracją.

12.10.1. Podłoże molekularne

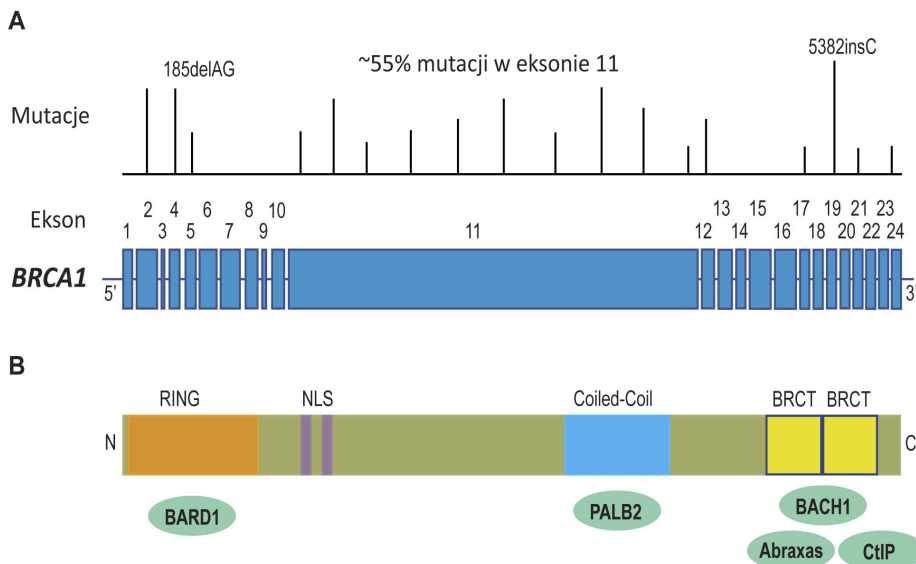
Wśród wszystkich raków piersi których rozwój zdeterminowany jest dziedzicznymi zmianami genetycznymi około 60% przypadków jest spowodowany mutacjami w obrębie genu *BRCA1* i/lub *BRCA2*. Zmiany genetyczne w obrębie *BRCA1* i *BRCA2* dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący. Pozostały odsetek nowotworów rozwija się na skutek wysokiej genetycznej predyspozycji, lecz konkretny gen warunkujący tą predyspozycję (hipotetyczny "*BRCAX*") nie został dotąd zidentyfikowany.

Tabela 12.5. Geny, których dziedziczone mutacje zwiększają ryzyko rozwoju raka piersi

Geny	Ryzyko rozwoju raka piersi
<i>BRCA1</i> (17q21) <i>BRCA2</i> (13q12.3) <i>TP53</i> (17p13.1)	10-20-krotny wzrost ryzyka
<i>CHEK2</i> (22q12.1) <i>ATM</i> (11q22.3) <i>CDH1</i> (16q22.1) <i>PTEN</i> (10q23.31) <i>BRIP/FANCF</i> (17q22) <i>PALB2/FANCL</i> (16p12)	2-4-krotny wzrost ryzyka
<i>FANCA</i> (16q24.3) <i>FANCE</i> (6p22-21)	~2-krotny wzrost ryzyka

Badania ostatnich lat wskazują, że dziedziczna predyspozycja do rozwoju raka piersi związana jest raczej z mutacjami w obrębie szeregu genów

generujących mniejsze lub większe ryzyko rozwoju nowotworu (tabela 12.5). Ponadto w pojedynczych przypadkach dziedziczny rak piersi może być jednym z komponentów wielonarządowych zespołów nowotworowych (zespół Li-Fraumeni, choroba Cowdena, zespół Peutz-Jeghers, zespół Bannayan-Riley-Rivalcaba, zespół Lyncha).



Ryc. 12.9. Gen *BRCA1* oraz białko przez niego kodowane. **A.** Schemat genu *BRCA1* (tylko eksony) z zaznaczonymi miejscami najczęściej zachodzących mutacji. Wysokość linii oddaje częstość występowania danej mutacji. **B.** Rozmieszczenie domen funkcjonalnych w białku *BRCA1*. Domena RING jest miejscem wiązania białka BARD1, które tworzy heterodimer BRCA1-BARD1 o aktywności ligazy ubiquitynowej (E3). W nieobecności BARD1 lub upośledzonego wiązania do domeny RING białko *BRCA1* jest niestabilne i podlega szybkiej degradacji. Domena NLS zawiera sekwencję aminokwasową warunkującą przemieszczenie *BRCA1* do jądra komórkowego. Domena *coiled-coil* (struktura zaplecionej α -helisy) jest miejscem wiązania białka PALB2, które jest elementem łącznikowym w tworzeniu kompleksu z BRCA2. Kompleks BRCA1-PALB2-BRCA2 jest niezbędny w naprawie podwójnych pęknięć DNA w procesie homologicznej rekombinacji. Domeny BRCT są miejscami wiązania ufosforylowanych białek przenoszących *BRCA1* do miejsca pęknięć DNA. Białka Abraxas wiążąc się do domeny BRCT tworzą miejsce adaptorowe do przyłączenia pozostałych białek superkompleksu (RAP80, MRE11, NBS, RAD50). Białko CtIP oddziałując z domeną BRCT umożliwia przyłączenie białka MRN. Wiązanie ufosforylowanego białka BACH1 (helikaza) do domeny BRCT jest konieczne do wytworzenia kompleksu BRCA1-BACH1-TOPBP1 niezbędnego do przejścia komórki przez fazę S cyklu komórkowego.

Gen *BRCA1* zlokalizowany jest na chromosomie 17 w obrębie prążka q21 i składa się z 24 eksonów. Produktem genu jest mRNA wielkości 7,8 kZ kodujący

białko składające się z 1863 aminokwasów tworzących szereg funkcjonalnych domen (ryc. 12.9). Domeny te warunkują multifunkcjonalność białka BRCA1 (jest składową wielu superkompleksów białkowych), które uczestniczy w naprawie DNA, kontroli cyklu komórkowego, pewnych modyfikacjach potranslacyjnych (ubikwitynacja), przebudowie chromatyny, regulacji ekspresji niektórych genów (np. genu receptora estrogenowego).

Najwięcej mutacji w genie *BRCA1* zidentyfikowano w obrębie eksonu 11 (55%). Pozostałe mutacje powstają w różnych miejscach wzdłuż całego genu (ryc. 12.9). Najczęstszymi mutacjami *BRCA1* są delecje adenozyliny i guanozyliny w pozycji 185 (185delAG) oraz insercja cytozyny w pozycji 5382 (5382insC). Te dwie mutacje stanowią około 10% wszystkich mutacji. W populacji polskiej poza 5382insC często obserwuje się również mutacje C61G i 4153delA. Większość mutacji powoduje powstanie skróconej formy białka BRCA1 pozbawionej istotnych pod względem funkcjonalnym domen BRCT. Ponadto często obserwuje się mutacje typu zmiana sensu co prowadzi do powstania białka o nieprawidłowej strukturze domeny BRCT. Doświadczenia na myszkach pokazały, że utrata domeny BRCT w białku BRCA1 powoduje rozwój nowotworu.

Gen *BRCA2* zlokalizowany jest na chromosomie 13 w obrębie prążka q12 i składa się z 27 eksonów. Produktem genu jest mRNA o wielkości 10,4 kb kodujący białko składające się z 3418 aminokwasów. W obrębie białka BRCA2 można wyodrębnić szereg domen funkcjonalnych (ryc. 12.10). Dzięki tym domenom białko BRCA2 jest w stanie oddziaływać z białkami (RAD51, PALB2, DWC1) biorącymi udział w naprawie DNA (naprawa podwójnych pęknięć DNA w procesie homologicznej rekombinacji), cytokinezie i mejozie.

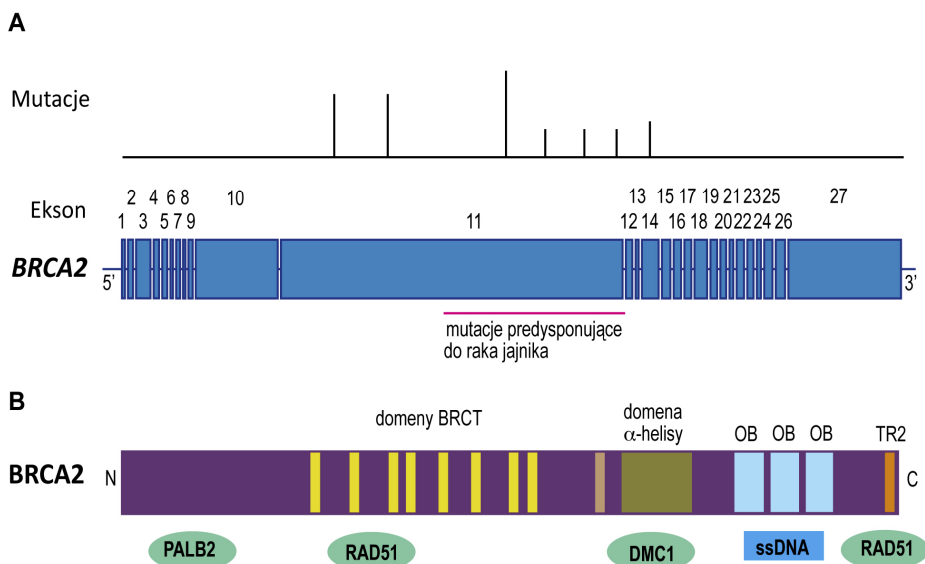
Mutacje w genie *BRCA2* występują w różnych miejscach rozrzuconych wzdłuż całego genu (ryc. 12.10). W populacji polskiej większość z opisanych mutacji występuje w pierwszych 11 eksonach *BRCA2*. Niektóre rodzaje mutacji występujące w określonych regionach *BRCA2* związane są z określonym typem nowotworu. Rozwój raka jajnika jest związany z mutacjami zmiany sensu występującymi w 3.3 kb regionie eksonu 11 *BRCA2* (region predyspozycji do raka jajnika, ryc. 12.10). U osób z tego typem mutacji ryzyko rozwoju raka jajnika jest większe niż raka piersi.

Uważa się, że utrata funkcji białek BRCA1 i BRCA2 w stanach przedrakowych w następstwie mutacji ich genów upośledza komórkowy aparat naprawczy DNA prowadząc do niestabilności genetycznej i nagromadzenia się dodatkowych mutacji indukujących rozwój nowotworu.

12.10.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych

Mutacje genu *BRCA1* i *BRCA2* są silnie związane z wczesnym rozwojem raka piersi. U nosicieli mutacji *BRCA1* obserwuje się 50-80% ryzyko rozwoju raka piersi oraz ~45% ryzyko rozwoju raka jajnika. Wielkość tego ryzyka

wzrasta wraz z wiekiem (tabela 12.6). Zaobserwowano także, że stopień zagrożenia rozwojem raka piersi zależy również od rodzaju mutacji i jej lokalizacji w genie. W populacji polskiej obserwuje się 2-krotnie wyższe ryzyko zachorowania na raka piersi u nosicieli mutacji 5382insC w porównaniu do osób z delecją 4153delA. Ryzyko rozwoju raka piersi u nosicieli mutacji *BRCA1* jest modyfikowane przez inne czynniki genetyczne i czynniki środowiskowe.



Ryc. 12.10. Gen *BRCA2* oraz białko przez niego kodowane. **A.** Schemat genu *BRCA2* (tylko eksony) z zaznaczonymi miejscami najczęściej występujących mutacji. Wysokość linii oddaje częstość występowania danej mutacji. **B.** Rozmieszczenie domen funkcjonalnych w białku *BRCA2*. Obszar na N końcu białka obejmujący 40 aminokwasów jest miejscem wiązania białka PALB2. Osiem domen BRCT i region TR2 są miejscami wiązania białka RAD51 niezbędnego w naprawie podwójnych pęknięć DNA w procesie rekombinacji homologicznej (HR). Przemieszczenie RAD51 do miejsca pęknięcia DNA jest zależne od *BRCA2*. Domena TR2 odgrywa również istotną rolę w stabilizacji nukleoproteinowego kompleksu powstającego podczas HR. Domeny OB (ang. oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold) mają budowę β-beczki o topologii klucza greckiego przykrytej α-helisą i są regionem białka *BRCA2* wiążącym pojedynczą nić DNA (ssDNA). Udział *BRCA2* w mejozie zależy od wiązania w obrębie domeny α-helisy białka DMC1

Zaobserwowano, że u nosicieli mutacji 5382insC w *BRCA1* zagrożenie rakiem piersi jest znacząco niższe jeżeli występuje u nich polimorfizm 135G>C genu *RAD51*. Z kolei ryzyko rozwoju raka jajnika jest ponad 2-krotnie wyższe u nosicieli mutacji *BRCA1* u których występuje jeden lub więcej rzadkich alleli *HRAS1-VNTR*. W populacji polskiej mutacje w obrębie *BRCA2* prawdopodobnie

niewiele zwiększają ryzyko zachorowania na raka piersi u kobiet, lecz mają istotny związek z rozwojem raka jajnika. Wystąpienie mutacji *BRCA2* u mężczyzn związane jest z 5-7% ryzykiem rozwoju raka piersi. Ponadto mutacje *BRCA2* wykrywane są często u chorych z innymi typami nowotworów takimi jak, rak żołądka, rak jelita grubego, rak gruczołu krokowego, rak trzustki.

Tabela 12.6. Wpływ wieku na wielkość ryzyka rozwoju raka piersi i jajnika w polskiej populacji nosicieli mutacji *BRCA1*

Wiek (lata)	Skumulowane ryzyko rozwoju raka (%)	
	piersi	jajnika
<30	2	1
40	6	4
50	43	13
60	56	25
70	72	37
80	74	48

Raki piersi i jajnika rozwijające się w wyniku dziedziczenia mutacji *BRCA1* wykazują szereg charakterystycznych cech klinicznych. W przypadku raków piersi *BRCA1* zależnych średni wiek pacjenta w momencie wykrycia choroby wynosi <50 lat, a raków jajnika jest to około 55 lat. U 32% nosicielek zmutowanego *BRCA1* obserwuje się obustronny rak piersi. Cechą charakterystyczną *BRCA1* zależnych raków piersi jest szybki rozrost guza, który u ponad 90% pacjentek w momencie rozpoznania wykazuje stopień G3 zróżnicowania. Często są to raki rdzeniaste, atypowe rdzeniaste lub przewodowe nie posiadające receptorów estrogenowych (ER⁻). Wśród wszystkich raków ER⁻raki *BRCA1* zależne stanowią ~15%.

Raki piersi związane z mutacjami *BRCA2* diagnozowane są u kobiet zazwyczaj w 52, a u mężczyzn w 53 roku życia. Średni wiek zachorowań na raki jajnika związane z mutacjami *BRCA2* wynosi 62 lata.

Stwierdzenie mutacji *BRCA1* lub *BRCA2* jest przesłanką do zwiększenia częstości badań kontrolnych u nosicieli tych zmian, i/lub zastosowania chemoprewencji. Oba te postępowania mają jednak ograniczoną skuteczność. Znaczący spadek śmiertelności u nosicielek mutacji *BRCA* obserwuje się u pacjentek poddanych profilaktycznej mastektomii i/lub ooforektomii. Sam zabieg ooforektomii w tej grupie pacjentek zmniejsza nie tylko ryzyko zachorowania na raka jajnika, lecz również obniża ryzyko rozwoju raka piersi.

12.10.3. Dostępne analizy molekularne

Najczęstszymi metodami stosowanymi do przeszukiwania genów *BRCA* w celu wykrycia mutacji są metody oparte o analizę Southerna, analizę polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP), analizę heterodupleksów (HA), wysokosprawną chromatografię cieczową w warunkach denaturujących (DHPLC), lub kompleksowy PCR. Ze względu na rozkład mutacji w genie *BRCA1* w populacji polskiej (tabela 12.7) efektywną metodą wykrywania nosicieli tych mutacji jest metoda kompleksowego PCR bazująca na wykrywaniu mutacji 5382insC, C61G i 4153delA.

Tabela 12.7. Mutacje w genie *BRCA1* najczęściej występujące w populacji polskiej

Mutacja	Ekson	Częstość (%)
5382insC	20	34
C61G	5	16
4153delA	11	6
5370C/T	20	2
3819del5	11	1,5
794delT	11	1
185delAG	2	0,5
2985del5	11	0,5
5149del4	17	0,5

W przypadku genu *BRCA2* jak dotąd nie opisano dla populacji polskiej tzw. „efektu założyciela”, dlatego u każdego pacjenta trzeba wykrywać mutacje indywidualne, występujące w obrębie jednej rodziny. Złotym standardem w tym przypadku jest sekwencjonowanie DNA, które niestety jest metodą kosztowną. Pewne obniżenie kosztów można osiągnąć ograniczając początkowy skrining do fragmentu genu *BRCA2* ponieważ w populacji polskiej większość z dotąd wykrywanych mutacji w rodzinach z agregacją raków jajnika i żołądka występuje w pierwszych 11 eksonach.

12.10.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Większość mutacji w obrębie genów *BRCA* wykrywanych w drodze sekwencjonowania to delecje. Wszystkie one są związane z utratą funkcji genu i klinicznymi objawami raka piersi i jajnika, za wyjątkiem tych, które związane są ze skróceniem białka BRCA1 o mniej niż 10 aminokwasów od C-końca oraz skróceniem białka BRCA2 o mniej niż 110 aminokwasów od C-końca. Głównym problemem interpretacyjnym klinicznego znaczenia zmian w sekwencji genu *BRCA* są mutacje zmiany sensu, mutacje zachodzące w obrębie intronów, mutacje znoszące kodon stop, mutacje indukujące sygnał stop i

prowadzące do skrócenia białka BRCA1 i BRCA2 w pozycjach dystalnych do aminokwasów odpowiednio 1853 i 3308.

Trzeba zaznaczyć, że fałszywie dodatni wynik testu (przy specyficzności <100) stanowi największe zagrożenie, gdyż w wielu przypadkach jest podstawą do profilaktycznych zabiegów chirurgicznych jajnika i piersi o nieodwracalnych skutkach. Dużo częściej spotykane są wyniki fałszywie ujemne, które w przypadku potwierdzonych obciążeń rodzinnych powinno się traktować z dużą dozą ostrożności.

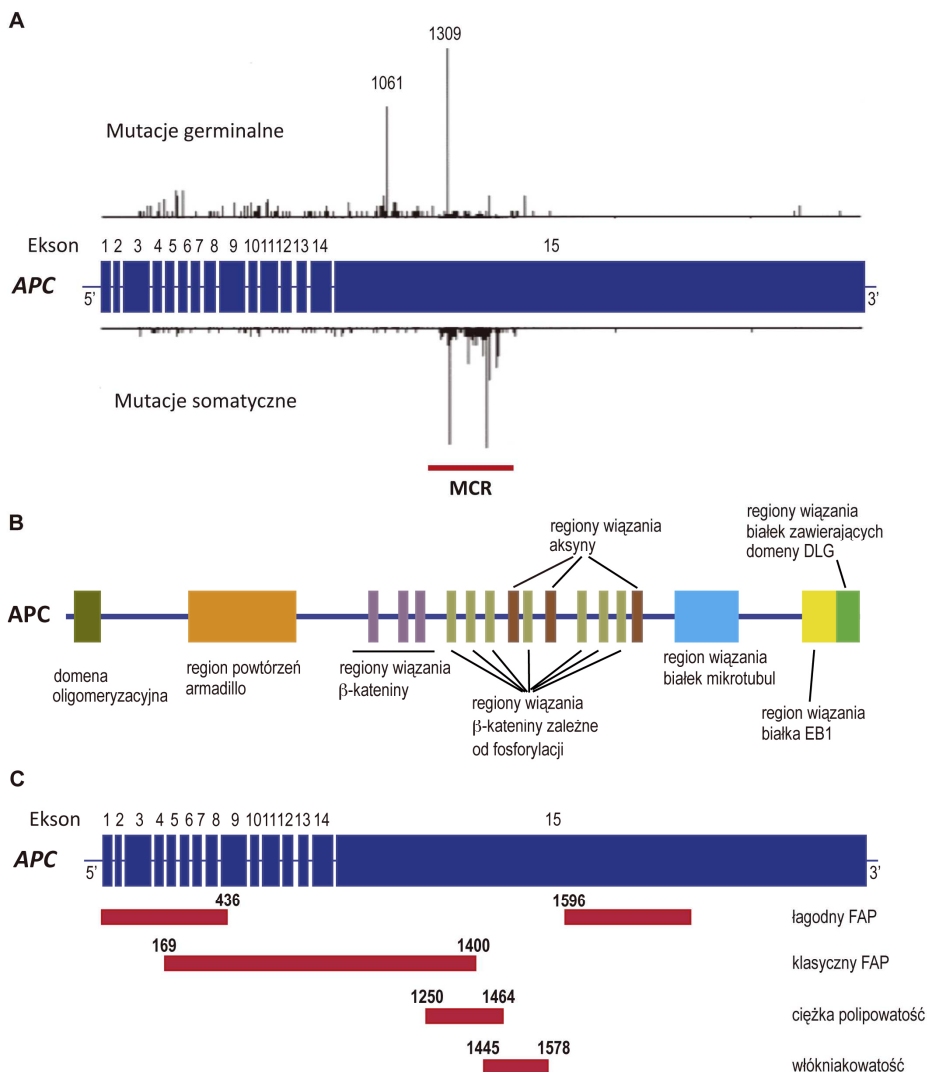
12.11. Wrodzona polipowatość jelita grubego

Wrodzona polipowatość jelita grubego (rodzinna polipowatość gruczolakowata jelit, FAP) jest chorobą dziedziczną w sposób autosomalny dominujący. FAP charakteryzuje się powstawaniem wielu setek a nawet tysięcy polipów w błonie śluzowej jelita grubego w okresie dzieciństwa i wczesnego dojrzewania. U 50% chorych mnogie polipy pojawiają się przed ukończeniem 16 roku życia, a 95% chorych ma polipy w wieku 35 lat. U nieleczonych pacjentów z FAP nieuchronnie dochodzi do rozwoju raka jelita grubego, który jest diagnozowany zazwyczaj w wieku 39 lat. Choroba występuje z częstością 1 na ~10 000 urodzeń i stanowi ~1% wszystkich nowotworów jelita grubego.

12.11.1. Podłoże molekularne

FAP rozwija się wskutek mutacji w genie *APC* położonym na chromosomie 5 w regionie q21 i zbudowanym z 15 eksonów zawierających 8538 pz (ryc. 12.11.A). Ekson 15 *APC* jest wyjątkowy ponieważ zawiera ~77% sekwencji kodującej (6579 pz) białko. Białko APC składa się z 2843 aminokwasów i jest multifunkcjonalną proteiną zawierającą wiele domen odpowiedzialnych za oddziaływanie z innymi białkami (ryc. 12.11.B). Jedną z funkcji białka APC jest hamowanie cyklu komórkowego określonych rodzajów komórek (w tym enterocytów). Zachodzi to w drodze inhibicji szlaku sygnałowania białek Wnt. Obecność białka APC w komórce niezbędna jest do wyłączenia kaskady sygnalizacyjnej od receptora (Fzd) białka Wnt do jądra komórkowego. APC łącząc się z kluczowym komponentem tego szlaku sygnalizacji β -kateniną powoduje unieczynnienie i jej degradację w proteosomie. Brak funkcjonalnego białka APC w komórce skutkuje akumulacją β -kateniny, wzrostem ekspresji szeregu genów i zwiększonym poziomem białek warunkujących progresję cyklu komórkowego i czynników transkrypcyjnych (c-myc, cyklina D1, Tcf-1, CD44). Aby doszło do zachwiania kontroli cyklu komórkowego zależnego od Wnt obie kopie genu *APC* muszą ulec inaktywacji, ponieważ komórki zawierające jeden zmutowany allel *APC* produkują ilość białka APC wystarczającą do normalnego funkcjonowania. Komórki

homozygotyczne względem mutacji *APC* proliferują ze zwiększoną szybkością i tworzą polipy.



Ryc. 12.11. Gen *APC* i jego produkt białkowy. **A.** Schemat genu *APC* (tylko eksony) z zaznaczonymi miejscami najczęściej zachodzących mutacji germinalnych i somatycznych. Wysokość linii oddaje częstość występowania danej mutacji, liczby nad nimi określają numer kodonu. MCR jest regionem *APC* gdzie mutacje zdarzają się najczęściej. **B.** Rozmieszczenie domen funkcjonalnych w białku *APC*, które warunkują jego funkcje poprzez oddziaływanie z białkami uczestniczącymi w procesach komórkowych. **C.** Związek między genotypem a fenotypem. Obszary występowania mutacji charakterystycznych dla poszczególnych przebiegów FAP zaznaczone są w postaci czerwonych linii opisanych numerami granicznych kodonów

Większość ze znanych mutacji *APC* (~95%) powoduje powstanie niekompletnego i niefunkcjonalnego białka APC. Przeważająca ilość przebadanych pacjentów i ich rodzin (~80%) posiada mutacje powodujące skrócenie białka APC. Najczęściej dochodzi do zmian w obrębie domeny wiążącej β -kateninę lub jej całkowitej utraty. Wśród mutacji powodujących skrócenie białka APC najczęściej obserwuje się delecje (55%), mutacje nonsensowe (30%) i małe insercje (6%). Dotychczas opisano kilkaset różnych mutacji w obrębie *APC*. Obszarem gdzie częstotliwość mutacji jest największa jest fragment MCR (ang. mutational cluster region) 5' eksonu 15 w obrębie którego kodony 1061 i 1309 podlegają najczęściej mutacji (ryc. 12.11.A).

12.11.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych

Testy genetyczne są podstawą prawidłowej opieki nad chorymi z FAP i członkami ich rodzin. Analiza DNA pozwala na ustalenie genotypu występującego w obrębie rodziny i wskazuje na konieczność przeprowadzania testów u członków rodzin wysokiego ryzyka nie wykazujących objawów choroby. Wczesne wykrycie FAP umożliwia interwencję, która ograniczy ryzyko rozwoju raka jelita grubego. Identyfikacja członków rodzin wysokiego ryzyka, u których nie ma wrodzonych mutacji *APC* pomaga w diagnostyce FAP i ogranicza konieczność stosowania badań endoskopowych u tych osób przyczyniając się do ograniczenia kosztów.

Mutacje *APC* są wykrywane rzadziej u chorych z polipowatością jelit, którzy pochodzą z rodzin bez FAP, niż u chorych pochodzących z rodzin wysokiego ryzyka genetycznego. Dzieci osoby z mutacją *APC* mają 50% szansę odziedziczenia rodzicielskiej mutacji i powinny móc być poddane analizie genetycznej w wieku młodzieńczym. Osoby bez zmian w genie *APC* będące potomkami rodzica z mutacją *APC* nie potrzebują częstszych, niż członkowie ogólnej populacji, badań kontrolnych w kierunku wykrycia raka jelita grubego.

Identyfikacja określonych zmian w obrębie genu *APC* może dostarczyć informacji pomocnych w określeniu klinicznego fenotypu i rodzaju monitorowania pacjenta. Mutacje związane z klasycznym przebiegiem FAP są znajdujące w obszarze od kodonu 168 do 1400 (ryc. 12.11.C). U chorych z mutacjami skracającymi białko występującymi między kodonami 1430 i 1578 częściej dochodzi do wystąpienia objawów pozajelitowych (włókniakowatość naciekowa, kostniak, torbiele gruczołów łojowych skóry, zmiany w uzębieniu). U osób z mutacjami w kodonach 1250-1464 obserwuje się zwiększoną częstość występowania gruczolaków oraz pojawianie się nowotworu jelita grubego w młodszym wieku.

U chorych z lekkimi objawami FAP (mniejsza liczba polipów, łagodny przebieg choroby), mutacje znajdują się w trzech głównych regionach *APC*. Pierwszym regionem jest obszar 5' rozciągający się do kodonu 157 w eksonie 4 *APC*. Drugi region obejmuje obszar alternatywnego składania w eksonie 9, a

trzeci region rozciąga się w 3' końcu genu *APC* poza kodonem 1595 w eksonie 15. U chorych z lekkim fenotypem FAP mutacje powodujące zmianę N-końca białka APC związane są z dużą różnorodnością liczby polipów oraz większymi zmianami chorobowymi w górnym odcinku jelit niż u chorych z mutacjami w eksonie 9 lub w 3' regionie genu *APC*.

12.11.3. Dostępne analizy molekularne

Częstym testem wykonywanym w kierunku potwierdzenia FAP jest test (analiza Western) oceniający obecność i wielkość białka APC. Użyteczność analizy białka APC wynika z częstości występowania zmienionego białka APC u chorych z klasycznym fenotypem FAP oraz z tego, że mutacje powodujące zmniejszenie wielkości białka APC prawie zawsze powodują utratę jego funkcji. Ujemną stroną tej analizy jest brak możliwości detekcji zmian w końcowych fragmentach 3' i 5' *APC*, brak informacji o mutacjach zachodzących w regionach niekodujących oraz brak możliwości identyfikacji konkretnej mutacji odpowiedzialnej za rozwój FAP w obrębie danej rodziny.

Analiza dziedziczenia markerów sprzężonych jest testem pomocnym do wykrycia nosicieli FAP w obrębie rodziny chorego pod warunkiem wystarczającej liczby członków rodziny chorego od których można pobrać DNA. W przypadku wystarczającej liczby uczestników tego testu jest on użyteczny w przypadku 90-95% rodzin. Analiza sprzężeń nie jest użyteczna dla chorych z mutacjami powstałymi *de novo*.

Dla identyfikacji nieznanymi mutacji sekwencjonowanie DNA pozwala na analizę regionów kodujących oraz fragmentów intronów je flankujących. Sekwencjonowanie DNA może jednak nie wykryć mutacji rearanżacyjnych, dużych insercji lub delecji lub mutacji zmieniających poziom ekspresji genu. Testami pomocnymi w takich przypadkach są analizy z wykorzystaniem hybrydyzacji z sondami swoistymi do określonej sekwencji (hybrydyzacja ASO), analizy polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP), analizy heterodupleksów (HA), wysokosprawnej chromatografii cieczowej w warunkach denaturujących (DHPLC). Do wykrycia dużych rearanżacji używana jest reakcja PCR, która pozwala amplifikować poszczególne eksony *APC*.

12.11.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Czułość i dokładność testu genetycznego zależy od użytej metody. Najczęściej stosowanymi testami diagnostycznymi do wykrywania mutacji *APC* jest analiza wielkości białka, analiza sprzężeń, sekwencjonowanie i hybrydyzacja ASO. Analiza wielkości białka APC pozwala wykryć mutację u ~80% rodzin z FAP. Kiedy połączona jest z innymi metodami np. takimi jak SSCP procent wykrytych mutacji wzrasta do 90%. Wykrywanie nosicieli

specyficznego haplotypu za pomocą analizy sprzężeń w rodzinach z FAP jest możliwe z 95-99% dokładnością. Czulość wykrywania mutacji *APC* za pomocą sekwencjonowania DNA wynosi 90-99%.

Nie wszyscy chorzy którzy pod względem klinicznym są identyfikowani jako pacjenci z FAP mają mutacje *APC*. U około 30% rodzin z FAP nie udaje się znaleźć mutacji *APC*. Sytuacja ta może wynikać z mutacji do której dochodzi poza regionem genu i która powoduje redukcję ekspresji *APC*, lub rozwój FAP związany jest z mutacjami w obrębie innych genów predysponujących do FAP takich jak *MUTYH* (znanym również jako *MYH*). Gen *MUTYH* koduje białko zaangażowane w naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Wiele osób z polipowatością jelit negatywnych pod względem mutacji *APC* może mieć autosomalną recesywną chorobę spowodowaną wrodzonymi mutacjami w obrębie genu *MUTYH*. U około 30% pacjentów z 15-100 polipami obserwuje się mutacje w obu kopiach *MUTYH*. Dlatego często razem z genem *APC* u pacjentów z FAP analizuje się również gen *MUTYH*.

12.12. Dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego (zespół Lyncha)

Dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego (HNPCC) jest najczęściej występującym zespołem predyspozycji do raka jelita grubego. Choroba ta jest dziedziczona w sposób autosomalny dominujący. Szacuje się, że HNPCC stanowi w przybliżeniu 5% wszystkich raków jelita grubego jednak ze względu na prawdopodobne niedoszacowanie wynikające z trudności precyzyjnej diagnozy procent ten może być znacznie wyższy. Ponadto ze względu na niepełną penetrację (~90%) duża część rodzin obciążonych HNPCC może pozostać nierozpoznana. Wśród charakterystycznych cech klinicznych HNPCC należy wymienić, wczesny wiek wystąpienia choroby (<45 r.ż.), rodzinne skupienie chorych (rodzinna agregacja), wieloogniskowość guza, prawostronna lokalizacja guza, transmisja pionowa zmutowanego genu (występowanie choroby w kolejnych pokoleniach), zwiększona częstość występowania wśród krewnych chorego raków jelita cienkiego, dróg moczowych i raków trzonu macicy. Należy zaznaczyć również, że nazwa „dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego” jest myląca, ponieważ u wielu nosicieli zmutowanych genów dochodzi do rozwoju polipów, lecz w liczbie nie większej niż 100.

12.12.1. Podłoże molekularne

Rzeczywisty HNPCC (zespół Lyncha) jest związany z mutacjami występującymi w obrębie genów naprawy błędnie sparowanych zasad DNA. Naprawa błędnie sparowanych zasad (*Mismatch repair* – MMR) jest jednym z mechanizmów warunkujących naprawę błędów w DNA powstałych w trakcie replikacji. MMR aby była skuteczna wymaga skoordynowanego działania szeregu białek. Miejsca

deformacji helisy DNA powstałe na skutek błędnego sparowania zasad, będącego wynikiem mutacji insercyjnej lub delecyjnej są rozpoznawane i wiązane przez hetero dimer MutS składający się z białka MSH2 i jednego z białek MSH6 lub MSH3. Każdy z tych dimerów rozpoznaje specyficzną zmianę. Dimer MSH2/MSH3 wiąże się do DNA w miejscu wystąpienia deformacji spowodowanej insercją lub delecją, a kompleks MSH2/MSH6 łączy się w miejscu powstania pętli wynikającej z niewłaściwego parowania pojedynczej zasady. Związany z DNA hetero dimer MutS jest rozpoznawany przez kolejny kompleks białkowy o nazwie MutL, który warunkuje dalszą naprawę DNA. MutL jest heterodimerem składającym się z białka MLH1 i białka PMS2 lub MLH3 (czasami PMS1). Heterodimer MLH1/PMS2 jest odpowiedzialny za rozpoznanie nowo zszyntetyzowanej nici DNA oraz warunkuje właściwe oddziaływanie między kompleksem rozpoznającym błąd w DNA i pozostałymi białkami naprawczymi. Rola kompleksu MLH1/MLH3 jest mniej istotna w procesie naprawy.

W znaczącej liczbie przypadków HNPCC obserwuje się mutacje w obrębie genów naprawy błędnie sparowanych zasad. U nosicieli zmutowanych genów proces MMR przebiega fenotypowo normalnie, chociaż każda komórka somatyczna zawiera jedną kopię genu MMR normalną i jedną zawierającą mutację specyficzną dla danej rodziny z HNPCC. Osoby będące heterozygotami są jednak narażone na utratę normalnego allelu w wyniku masywnych zmian chromosomalnych powstałych w wyniku delecji, lub innych mutacji somatycznych. Inaktywacja obu kopii genu prowadzi do niewydolności procesu naprawy DNA i powstania fenotypu hipermutacyjnego przejawiającego się we wroście zmian w obrębie pojedynczych zasad i delecji oraz insercji w obrębie *loci* mikrosatelitarnych (niestabilność mikrosatelitarna). Ten fenotyp nie jest powodowany wzrostem ilości błędów podczas replikacji DNA, ale wynika z upośledzenia systemu naprawy DNA. Takie komórki są podatne na akumulację mutacji w obrębie onkogenów i genów supresorowych, co łącznie przyczynia się do klonalnej ekspansji i akceleracji procesu nowotworzenia.

U chorych z HNPCC oraz członków ich rodzin zidentyfikowano dotąd kilkaset różnych mutacji w obrębie genów *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2* oraz *MLH3*. Najczęściej mutacje obserwowane są w genie *MLH1* (~50%) zlokalizowanym na chromosomie 3, oraz genach *MSH2* (~20%) i *MSH6* (10%) położonych na chromosomie 2. Należy zaznaczyć, że u znaczącej części chorych z klinicznymi objawami HNPCC oraz członków ich rodzin nie udaje się wykryć mutacji w obrębie genów MMR. Może to znaczyć, że mutacje innych niezidentyfikowanych genów również mogą skutkować fenotypem HNPCC. Z uwagi na występowanie dwóch grup chorych z klinicznymi objawami HNPCC z których jedna może być zidentyfikowana za pomocą występowania mutacji w obrębie genów MMR, a druga w oparciu o objawy kliniczne wprowadzono dla określenia tej pierwszej grupy odrębną nazwę tj. zespół Lyncha (choroba Lyncha). Według tej nomenklatury chorzy z zespołem Lyncha to chorzy z mutacjami w genach MMR obecnymi w komórkach nowotworowych i mutacją

germinalną w jednym z genów MMR. Wynika z tego, że nie wszyscy pacjenci z klinicznymi objawami HNPCC będą mieć zespół (chorobę) Lyncha, oraz nie wszyscy pacjenci z chorobą Lyncha będą spełniać kryteria pozwalające na zaszerogowanie do zespołu HNPCC. W Polsce u pacjentów z chorobą Lyncha najczęściej znajduje się mutacje w obrębie genu *MSH2* i *MLH1* (~90%). Większość mutacji genu *MSH2* to mutacje zmieniające ramkę odczytu (60%) lub mutacje nonsensowe (20%), a genu *MLH1* to mutacje zmieniające sens kodonu (30%) i mutacje zmiany ramki odczytu (40%).

12.12.2. Kliniczna użyteczność badań molekularnych

Wykonanie analizy DNA (izolowane z leukocytów) w kierunku wykrycia mutacji w genach MMR u chorych i członków ich rodzin jest zalecane jeżeli spełniają kryteria wskazujące na możliwość wystąpienia HNPCC oraz po wykluczeniu FAP. Wykrycie mutacji germinalnej stanowi genetyczne potwierdzenie choroby Lyncha i jest niezwykle istotne dla dalszego postępowania z chorym i członkami jego rodziny. Identyfikacja mutacji specyficznej (markerowej) dla rodziny chorego pozwala na wykluczenie ~50% członków rodziny z grupy podwyższonego ryzyka ponadto stanowi podstawę do rozważenia przeprowadzenia radykalnych zabiegów chirurgicznych (kolektomia, profilaktyczna histerektomia i owariektomia) u zdiagnozowanych nosicieli mutacji.

Podstawą do wyprzedzających radykalnych zabiegów chirurgicznych stanowią odpowiednio częste badania kontrolne pozwalające na wykrycie ognisk rakowych we wczesnym stadium. U nosicieli mutacji germinalnych w *MLH1*, *MSH2*, lub *MSH6* powinno się po ukończeniu 20-25 roku życia przeprowadzać kolonoskopię nie rzadziej niż raz na trzy lata. Obserwuje się, że badania kontrolne prowadzone w odstępie trzech lat u członków rodzin chorych na HNPCC zapobiegają zgonom z powodu raka jelita grubego i obniżają ogólną śmiertelność w tych rodzinach o 65%. Ze względu jednak na przyspieszony proces nowotworzenia u tych chorych zalecane jest częstsze wykonywanie pełnej kolonoskopii (nawet corocznie).

12.12.3. Dostępne analizy molekularne

Analiza immunohistochemiczna (IHCh) tkanki rakowej dla oceny poziomu białek *MSH2*, *MLH1* i *MSH6* jest stosunkowo tanim i szybkim testem skriningowym pozwalającym ocenić stopień upośledzenia ich ekspresji.

Innym testem przesiewowym jest analiza niestabilności mikrosatelitarnej (MSI). Dla przeprowadzenia tej analizy potrzebna jest tkanka rakowa oraz zdrowa tkanka pacjenta. Analizę tę można wykonać pozyskując materiał nawet ze skrawków parafinowych w których tylko 50% stanowią komórki rakowe. Zazwyczaj badanie oparte jest o analizę 5 mikrosatelitarnych *loci* zbudowanych

z mononukleotydowych i dinukleotydowych powtórzeń. Dobór tych *loci* dokonuje się w oparciu o obserwacje wskazujące, że mutacje genu *MSH6* są głównie związane z niestabilnością markerów mononukleotydowych, natomiast mutacje *MLH1*, *MSH2*, lub *PMS2* objawiają się wyraźną niestabilnością powtórzeń mono- i dinukleotydowych. W oparciu o analizę MSI nowotwory można podzielić na trzy kategorie: MSI-H (o wysokiej niestabilności mikrosatelitarnej), MSI-L (o niskiej niestabilności mikrosatelitarnej) i MSS (o stabilnych markerach).

Mutacje występujące w genach MMR rozrzucone są losowo wzdłuż poszczególnych genów dlatego identyfikacja konkretnej zmiany genetycznej jest procesem czasochłonnym i kosztownym. Pierwszym krokiem jest badanie przesiewowe w celu zidentyfikowania miejsca występowania mutacji z wykorzystaniem hybrydyzacji Southerna, metod opartych o analizę polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP), analizę ruchliwości podczas elektroforezy w warunkach denaturujących (DGGE) oraz przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w warunkach denaturujących (DHPLC). Użyteczną metodą przesiewową jest również zmodyfikowana reakcja PCR polegająca na zależnej od ligacji amplifikacji sond (MLPA) umożliwiająca jednoczesną ocenę kilkudziesięciu sekwencji. Wykrywalność regionów DNA gdzie występuje mutacja za pomocą tych metod przesiewowych jest zazwyczaj niższa niż 100% i sięga w zależności od metody 80-90%. Końcowym etapem analizy jest sekwencjonowanie wyselekcjonowanych fragmentów DNA w celu identyfikacji konkretnej mutacji.

12.12.4. Interpretacja wyników testów molekularnych

Obraz uzyskany z analizy IHCh pokazujący komórki rakowe wybarwione negatywnie na tle pozytywnie wybarwionych komórek nie rakowych (limfocyty, normalne komórki epitelialne) jest interpretowany jak brak ekspresji danego białka. Brak konkretnego białka MMR związany jest prawdopodobnie z mutacją genu kodującego to białko, lecz nie jest to oczywiste, ponieważ utrata jednego białka może powodować brak innego białka, którego gen nie jest zmutowany. Obserwuje się, że brakowi ekspresji białka MSH2 towarzyszy również brak białka MSH6, a utrata ekspresji MLH1 związana jest z brakiem PMS2. Możliwa jest jednak utrata MSH6 i PMS2 bez zmiany ekspresji MSH2 i MLH1. W praktyce utrata ekspresji tylko MSH2, tylko MSH6 lub tylko PMS2 jest silnym wskazaniem na obecność mutacji germinalnych w odpowiadającym genie. Trzeba jednak pamiętać, że za pomocą analizy IHCh nie można rozróżnić mutacji germinalnej od somatycznej. Ponadto w rakach sporadycznych z hipermetylowanym promotorem *MLH1* również obserwuje się brak białka MLH1 (i PMS2) i nie jest to wynikiem dziedziczonej mutacji germinalnej.

Występowanie niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) jest fenotypowym odzwierciedleniem zmian genetycznych w MMR i wskazaniem do dalszych

analiz molekularnych. Wiadomo, że mutacje w obrębie genów MMR związane są z wystąpieniem MSI-H, natomiast raki charakteryzujące się MSI-L i MSS nie wykazują zmian w obrębie genów MMR. Z uwagi na fakt, że niestabilność mikrosatelitarna jest obserwowana u wszystkich pacjentów z chorobą Lyncha, zlecenie analiz DNA u pacjentów nie wykazujących fenotypu mutatorowego (stabilne sekwencje mikrosatelitarne) w kierunku analizy genów MMR jest bezcelowe.

Wszystkie zmiany genetyczne są potencjalnie szkodliwe, jednak w odróżnieniu do mutacji przesuwających ramkę odczytu, nonsensowych czy delecji (stanowiących większość mutacji w genach MMR) patogenność mutacji zmiany sensu jest trudna do oszacowania.

12.13. Wrodzona niedoczynność tarczycy

Wrodzona niedoczynność tarczycy (CH) jest najczęstszym wrodzonym zaburzeniem endokrynologicznym występującym z częstością 1:5000 żywych urodzeń. Stan ten jest spowodowany wadliwym rozwojem gruczołu tarczowego (~80% przypadków) lub zaburzeniami biosyntezy hormonów tarczycowych (~20% przypadków). W wyniku upośledzenia funkcji tarczycy dochodzi do ciężkich zaburzeń rozwojowych (niedorozwój umysłowy, deformacje kostne, niedobory wzrostu), którym można zapobiec, jeżeli odpowiednio wcześnie wdrożone zostanie leczenie substytucyjne. Wczesne wykrycie zaburzenia funkcji tarczycy jest możliwe dzięki powszechnym badaniom przesiewowym noworodków we krwi których oznaczany jest poziom hormonu tyreotropowego (tyreotropina, TSH). Dokładny opis diagnostyki laboratoryjnej chorób tarczycy można znaleźć w rozdziale 10.3 tomu 1 Diagnostyki laboratoryjnej.

12.13.1. Podłoże molekularne

Wrodzona hipotyreoza jest spowodowana najczęściej zaburzeniem organogenezy gruczołu tarczowego (*Thyroid Dysgenesis* – TD), w wyniku czego u około 40% tych pacjentów stwierdza się brak tarczycy, a w pozostałej grupie (~40%) notuje się różnego stopnia niedorozwój gruczołu często z przemieszczeniem. W niewielkiej liczbie przypadków (~10%) obserwuje się występowanie wola lub morfologicznie normalnego gruczołu tarczowego. Większość przypadków CH wynikająca z wad rozwojowych gruczołu tarczowego to przypadki spontaniczne chociaż około 2% to defekty dziedziczne w obrębie rodzin ryzyka genetycznego. Pod względem fenotypowym pacjentów z CH związaną z TD można podzielić na tych, u których poza hipotyreozą nie występują inne patologie (NSCH), oraz grupę chorych z współwystępującymi patologiami w obrębie innych narządów (SCH). Jak dotąd podłoże molekularne TD jest słabo poznane.

Tabela 12.8. Mutacje genu *TSHR* występujące u chorych z wrodzoną hipotyreozą i towarzyszące im kliniczne fenotypy

Mutacje	Obraz USG	Scyntygrafia	TSH (krotność wartości normalnych)	Wolna tyroksyna (T ₄)*
[326G→A] +[1637G→A]	bz	bz	23	norma
[484C→G] +[484C→G]	bz	bz	17	norma
	bz	-	2	norma
	bz	-	3	norma
[484C→G] +[500T→A]	-	bz	8	norma
	-	-	13	norma
	-	-	9	norma
[484C→G] +[1798T→C]	hipoplazja	bz	10	norma
[IVS5-1G→A] +[IVS5-1G→A]	duża hipoplazja	brak wychwytu	130	<30%
	duża hipoplazja	brak wychwytu	140	<30%
	hipoplazja	brak wychwytu	20	50%
[928C→T] +[928C→T]	bz	bz	15	norma
	bz	bz	15	norma
[1430C→T] +[1430C→T]	hipoplazja	obniżony wychwyty	20	poniżej limitu detekcji
[1825C→T] +[1825C→T]	hipoplazja	brak wychwytu	>17	15%
	-	-	>17	50%
	hipoplazja	brak wychwytu	>17	40%
	-	brak wychwytu	>17	60%
	-	-	>17	30%
	-	brak wychwytu	>17	10%

Mutacje podano dla obydwu alleli. Poziome wiersze odnoszą się do członków rodzin, u których wykryto tą samą mutację: - brak danych; bz – brak zmian; * procent dolnego poziomu normy.

U niektórych pacjentów z NSCH (2-4%) obserwuje się występowanie mutacji w obrębie genu dla receptora TSH, które dziedziczone są w sposób autosomalny recesywny. Gen *TSHR* obejmujący ponad 60 kbp położony jest na chromosomie 14 w regionie q31 i zbudowany jest z 10 eksonów. Eksony 1-9 i początkowa część dziesiątego eksonu kodują domeny zewnątrzkomórkowe receptora, natomiast część wewnątrzkomórkowa oraz siedem przezłonowych domen kodowana jest przez ekson dziesiąty. Receptor TSH zlokalizowany jest na powierzchni komórek tarczycy i wiążąc TSH wydzielane przez przysadkę aktywuje białko $G\alpha$, co indukuje wzrost wewnątrzkomórkowego cAMP. W pełni funkcjonalny receptor TSH jest niezbędny do prawidłowego rozwoju i funkcji gruczołu tarczowego. Dotychczas opisano szereg mutacji punktowych w genie *TSHR* oraz kilka delecji. Zmiany te prowadzą do braku białka, powstania białka o obniżonej wrażliwości na TSH, lub białka całkowicie nieaktywnego.

Tabela 12.9. Znane mutacje w genie *PAX8* i towarzyszące im kliniczne fenotypy

Mutacje	Obraz USG	Scyntygrafia	TSH (krotność wartości normalnych)	Wolna tyroksyna (T_4)*
[91C→T]	duża hipoplazja	wychwyty obniżony	37	70%
	brak gruczołu	-	-	-
[92G→A]	hipoplazja	-	>33	35%
[119→C]	hipoplazja	brak wychwyty	33	80%
	bz	-	3	80%
[170G→A]	duża hipoplazja	-	20	<30%
	duża hipoplazja	-	-	-
[185T→G]	duża hipoplazja	-	28	60%
	hipoplazja	-	-	40%
	lekka hipoplazja	-	29	norma
[322C→T]	hipoplazja	-	7	norma

Poziome wiersze odnoszą się do członków rodzin, u których wykryto tą samą mutację: - brak danych; bz – brak zmian; *procent dolnego poziomu normy.

W związku z tym stopień upośledzenia rozwoju i funkcji tarczycy zależy od rodzaju mutacji w *TSHR* (tabela 12.8). Obserwacje pacjentów z mutacjami w

genie dla *TSHR* wskazują, że pod względem fenotypowym można podzielić ich na trzy grupy:

- chorzy z pełną kompensacją oporności na TSH
- chorzy z częściową kompensacją oporności na TSH
- chorzy z całkowitym brakiem kompensacji oporności na TSH

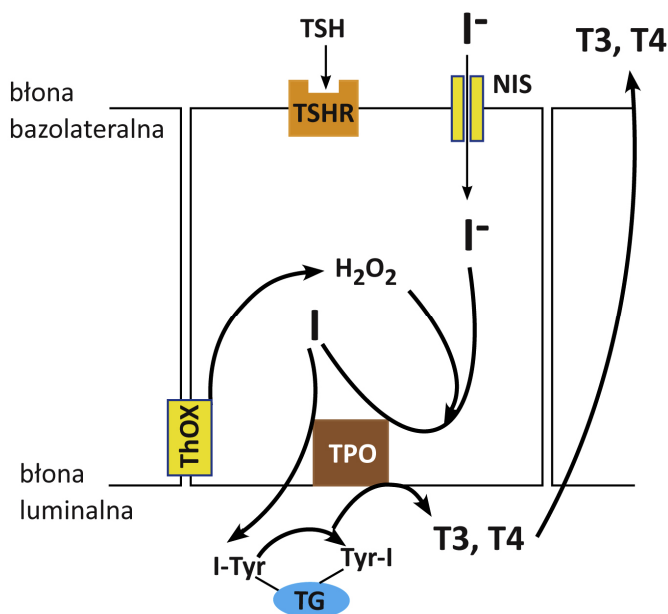
Jak wspomniano powyżej zaburzenie organogenezy gruczołu tarczowego występuje nie tylko w wyniku mutacji w genie *TSHR*, ale również może mieć związek z mutacjami w obrębie innych genów. Wśród pacjentów z CH wynikającą z wad rozwojowych gruczołu tarczowego najczęściej obserwuje się mutacje genów *NKX2.1*, *NKX2.5*, *FOXE1*, i *PAX8* kodujących czynniki transkrypcyjne, które regulują ekspresję genów kluczowych na poszczególnych etapach morfogenezy. Mutacjom tym poza hipotyreoza towarzyszą również patologie występujące w obrębie innych narządów. Rodzaj tych patologii zależy od genu i rodzaju mutacji. Mutacje zmiany sensu (170G→A, 194C→T) wykryte w genie *FOXE8* związane są z brakiem gruczołu tarczowego oraz towarzyszącym rozczepem podniebienia, syndromem nastroszonych włosów oraz atrezią nozdrzy tylnych.

Mutacje genu *PAX8* obserwuje się zarówno w sporadycznych TD jak i przypadkach rodzinnych. Jak dotąd wszyscy chorzy u których wykryto mutacje *PAX8* są heterozygotami, a mutacje w obrębie rodzin dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący. Obserwowany fenotyp zależy od rodzaju mutacji (tabela 12.9). Białkowy produkt genu *NKX2.1* odgrywa kluczową rolę nie tylko w rozwoju gruczołu tarczowego, ale również płuc i mózgu, dlatego inaktywujących homozygotycznych mutacji nie obserwuje się u żywych noworodków. Wszyscy pacjenci, u których wykrywa się mutacje (najczęściej delecje) w obrębie *NKX2.1*, poza hipotyreoza, posiadają różnego rodzaju patologie neurologiczne oraz układu oddechowego.

Wrodzona niedoczynność tarczycy wynikająca z mutacji w obrębie genów kodujących białka uczestniczące w biosyntezie hormonów tarczycowych jest często związana z występowaniem wola i stanowi niewielki procent (~10%) wszystkich przypadków. Niezbędny w procesie biosyntezy hormonów tarczycowych jod (w postaci jodku) jest transportowany z krwi do tyreocytów w symporcie z sodem przez kanał NIS. Wewnątrz komórek tarczycy jon jodkowy jest substratem szeregu reakcji prowadzących do powstania hormonów tarczycowych (organifikacja) (ryc. 12.12).

Pierwszym etapem przemian jonu jodkowego jest utlenianie przez nadtlenek wodoru (H_2O_2) wytwarzany przez kompleks oksydazy NADPH (ThOX). Utleniony jon jodkowy w reakcji katalizowanej przez peroksydazę tarczycową (TPO) reaguje z resztami tyrozynowymi tyreoglobuliny (TG) prowadząc do powstania monoiodotyrozyny (MIT) i diiodotyrozyny (DIT). Kolejnymi etapami organifikacji jodu zależnymi od TPO są reakcje sprzęgania w wyniku których powstaje 3,5,3'-trójiodotyronina (T3) oraz 3,5,3',5'-tetraiodotyronina (T4). Aktywność TPO jest również niezbędna w procesie proteolizy TG, podczas której uwalniane są cząsteczki T3 i T4 oraz inne jodopochodne tyrozyny.

Niewydolność jakiegokolwiek z tych procesów będąca np. następstwem mutacji genów kodujących białka uczestniczące w tych przemianach prowadzi do dyshormonogenezy i hipotyreozy.



Ryc.12.12. Etapy biosyntezy hormonów tarczycowych w komórkach tarczycy. Wiązanie hormonu tyreotropowego (TSH) do receptora (TSHR) stymuluje napływ jonu jodkowego (I⁻) do komórki przez transporter NIS. W komórce jon jodkowy jest utleniany przez nadtlenek wodoru (H₂O₂) produkowany przez oksydazę NADPH (ThOX) i wiązany przez reszty tyrozynowe (Tyr) tyreoglobuliny (TG). Sprzężanie jodotyrozyn prowadzi do powstania trijodotyroniny (T₃) i tetrajodotyroniny (T₄, tyroksyny). Peroksydaza tarczycowa (TPO) katalizuje utlenianie I⁻, wiązanie I⁻ do reszt tyrozynowych TG, sprzężanie jodotyrozyn i uwalnianie T₃ i T₄

Gen *TPO* jest położony na chromosomie 2 w *locus* p25 i obejmuje region 150 kpz. Mutacje w obrębie tego genu powodujące powstanie nieaktywnego białka są najczęstszą przyczyną dyshormonogenezy i wrodzonej niedoczynności tarczycy. Większość mutacji zachodzących w eksonie 17 genu *TPO* powoduje powstanie nieaktywnego białka, co w połączeniu z współwystępującą często izodisomią prowadzi do całkowitego braku aktywności TPO.

Tyreoglobulina jest białkiem syntetyzowanym wyłącznie w komórkach tarczycy. Gen *TG* jest położony na chromosomie 8 w pozycji q24 i zawiera ponad 300 kpz. Sekwencja kodująca zawarta jest w 42 eksonach z których każdy z wyjątkiem eksonu 9 (1101 pz) i 10 (588 pz) jest wielkości ~200 pz. Mutacje w obrębie genu *TG* związane są z wrodzoną niedoczynnością tarczycy o różnym

stopniu nasilenia od umiarkowanego do ciężkiego. Towarzyszy temu obniżony poziom TG w surowicy oraz obecność nienormalnych jodoprotein, a zwłaszcza jodowanej albuminy. W moczu tych pacjentów obserwuje się obecność niskocząsteczkowych jodowanych peptydów.

Transporter NIS jest integralnym białkiem błonowym zawierającym 12 przezbłonowych domen, które jest obecne nie tylko w komórkach tarczycy ale również w komórkach nabłonkowych szeregu innych narządów (ślinianki, żołądek, jelito grube, jajniki, łożysko, skóra). Gen *NIS* położony jest na chromosomie 19 i zbudowany jest z 15 eksonów. Mutacje w tym genie (dziedziczone w sposób autosomalny recesywny) powodują upośledzenie wychwytu jodu przez komórki tarczycy i często chociaż nie zawsze u chorych obserwuje się wole. Niektóre mutacje (Q267E, S515X) powodują upośledzenie procesu translokacji białka do błony plazmatycznej. Pod względem fenotypowym pacjenci z mutacjami *NIS* wykazują hipotyreozę o różnym nasileniu od całkowicie skompensowanej do ciężkiej niewydolności. Stopień niewydolności gruczołu tarczowego u tych pacjentów często zależy od poziomu jodu w pożywieniu. Suplementacja jodu często jest wystarczająca i nie ma konieczności podawania tym chorym hormonu tarczycy.

W komórkach tarczycy H_2O_2 niezbędne do aktywności TPO generowane jest przez oksydazy NADPH kodowane przez dwa geny *DUOX1* i *DUOX2* (dawna nazwa *THOX1* i *THOX2*). Geny te znajdują się na chromosomie 15 w regionie q15.3 w położeniu przeciwnym, dlatego ich transkrypcja przebiega w przeciwnych kierunkach. Gen *DUOX1* obejmuje 36 kpz i zawiera 35 eksonów, a gen *DUOX2* obejmuje 22 kpz i zbudowany jest z 34 eksonów (pierwsze dwa eksony w obu genach są niekodujące). Oba geny podlegają ekspresji nie tylko w tyreocytach lecz również w komórkach epitelialnych szeregu innych narządów (jądra, łożysko, serce, nerki, płuca, skóra). W komórkach tarczycy ekspresja *DUOX2* jest od 1,5 do 5 razy wyższa niż *DOUX1*. U pacjentów z wrodzoną niewydolnością tarczycy obserwuje się mutacje w obrębie genu *DUOX2*. Dotychczas zidentyfikowano 20 mutacji w *DUOX2*, z których 8 występuje w regionie kodującym domenę o aktywności peroksydazowej, 11 w obszarze kodującym dużą pętlę cytoplazmatyczną zawierającą motywy EF oraz 1 w obszarze kodującym drugą pętlę wewnątrzkomórkową. Mutacje te obejmują zmianę sensu (n=8), mutacje nonsensowe (n=6), mutacje zmiany ramki odczytu (n=5) oraz jedną mutację zmiany miejsca alternatywnego składania. Kliniczny fenotyp mutacji *DUOX2* jest różny nawet u pacjentów posiadających tą samą mutację. Uważa się, że czynniki środowiskowe mogą mieć wpływ na obserwowany fenotyp. Jakkolwiek wszystkie przypadki wrodzonej niedoczynności tarczycy związane z mutacjami *DUOX2* wymagają podawania tyroksyny, to u niektórych pacjentów z czasem (zazwyczaj po około 7 latach) dochodzi do kompensacji i podawanie T4 może być przerwane.