

Kazimierz Kuliczkowski

Postęp w diagnostyce laboratoryjnej w hematologii

Studia Ecologiae et Bioethicae 8/2, 341-343

2010

Artykuł został opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach
dozwolonego użytku.

Postęp w diagnostyce laboratoryjnej w hematologii

Diagnostyka laboratoryjna w hematologii dotyczy kilku działów:

- chorób nowotworowych jak ostre i przewlekłe białaczki, chłoniaki, zespoły mielodysplastyczne, mieloproliferacyjne choroby nowotworowe;
- zaburzeń krzepnięcia;
- niedokrwistości.

Poniżej przedstawię jedynie przegląd najważniejszych badań diagnostycznych w hematologii w diagnostyce chorób nowotworowych i zaburzeń krzepnięcia w których to działach i jestem o tym przekonany, nastąpił największy postęp w ostatnich latach.

W ostatnich latach diagnostyka ostrych białaczek wiele się nie zmieniła, zawiera w sobie badanie fenotypowe, cytogenetyczne i badania molekularne. W diagnostyce ostrych białaczek poza badaniami fenotypowymi ważne są badania cytogenetyczne i molekularne pozwalające na prognozowanie i odpowiednie leczenie. Ważne jest też badanie choroby resztkowej głównie przy pomocy cytofluorymetrii przepływowej oraz badań molekularnych – RQ-PCR pozwalających na wyliczenie patologicznych zmian w szpiku i krwi obwodowej. Ważność badań cytogenetycznych i molekularnych znalazła swoje miejsce w nowej klasyfikacji białaczek wg WHO z 2008 r.

W chorobach mieloproliferacyjnych przybyło badanie pomagające w ich rozpoznawaniu a dotyczy to mutacji JAK2 V617F występującej głównie w czerwienicy prawdziwej a w mniejszym odsetku dotyczącej samoistnego włóknienia szpiku kostnego i nadpłytkowości samoistnej.

W przewlekłej białaczce szpikowej oprócz badania jakościowego chromosomu Filadelfia i genu fuzyjnego BCR-ABL, w leczeniu ważną rolę odgrywa ilościowe oznaczenie tego genu przy pomocy RQ-PCR.

W przewlekłej białaczce limfatycznej oprócz badań cytogenetycznych, wśród których do najczęstszych należą delecje 13q14 i 17p13, należą badania mutacji ciężkiego łańcucha immunoglobulin, oznaczanie ekspresji CD38, ZAP-70 a w surowicy CD23 i β 2-mikroglobuliny.

W chłoniakach również ważne jest poza badaniem fenotypowym komórek w preparacie histologicznym lub w pobranej z węzła chłonnego zawiesinie komórek, ważną rolę odgrywa badanie cytogenetyczne klasyczne, przy użyciu FISH a także badania molekularne.

W zespołach mielodysplastycznych w diagnostyce nadal ważne są badania immunofenotypowe, cytogenetyczne i molekularne.

Badania molekularne pozwalają na uściślenie zmian cytogenetycznych bądź stwierdzenie zmian genetycznych przy braku zmian cytogenetycznych. Badania przy pomocy FISH mają charakter pośredni pomiędzy cytogenetycznymi i molekularnymi, pozwalając na stwierdzenie obecności nieprawidłowych genów w chromosomach, szczególnie wtedy kiedy nie można uzyskać w hodowli chromosomów.

W trakcie intensywnych badań są takie metody jak mikromacierze DNA, białek, RNA, miRNA. W związku z tym można się spodziewać w najbliższych latach pojawienia się nowszych, precyzyjniejszych metod diagnostycznych w chorobach nowotworowych, wynikających z nabytych zaburzeń genetycznych i epigenetycznych, jak i bardziej sprawną diagnostykę chorób wrodzonych.

W diagnostyce skaz krwotocznych w badaniach przesiewowych nadal najczęstsze wykonywane badania to liczba płytek krwi i czas protrombinowy (PT) z 1935 roku i czas aktywacji częściowej tromboplastyny (czas kaolinowo – kefalinowy) (APTT) z 1953 roku. Czas protrombinowy powstał dla monitorowania stosowania kumaryn a test kaolinowo – kefalinowy dla monitorowania leczenia heparyną. Testy te w stosunku do krwotocznych skaz osoczowych mają charakter przesiewowy.

W związku z pojawieniem się nowych leków hamujących cz. X lub trombinę pojawiły się nowe testy diagnostyczne dla monitorowania ich skuteczności. Są to głównie testy chromogenne, gdzie substratem dla enzymów procesu krzepnięcia są związki chemiczne o odpowiedniej budowie dla działania odpowiednich enzymów np. trombiny, cz. X czy plazminy. Dla monitorowania inhibitorów trombiny może służyć ekarynowy czas krzepnięcia (Ecarin clotting time – ECT) gdzie pod wpływem ekaryny, jadu węża, protrombina przechodzi w meizotrombinę na którą działają leki hamujące trombinę. Inny test monitorujący heparynę niefrakcjonowaną, drobnocząsteczkową, inhibitory cz. X i trombiny nazywa się czasem krzepnięcia indukowanym przez protrombinazę (PICT – prothrombinase induced clotting time). Tutaj główną rolę odgrywa jak węża *Daboia russelli* (RVV-V), który aktywuje cz. V. Jad tego węża – RVV może aktywować cz. X i jest używany w testach badających inhibitory tego czynnika.

Kolejna grupa to „udoskonalone PT i APTT testy generacji trombiny przy pomocy których można badać inhibitory cz. X i trombiny. Należą do nich test krzepnięcia zewnętrznego (EXCA – extrinsic coagulation activity), test krzepnięcia wewnętrznego (INCA – intrinsic coagulation activity assay) i test krzepnięcia po rekalcyfikacji (RECA – recalcified coagulation activity assay). W testach tych używa się barwnych substratów zamiast fibrynogenu, w EXCA stosuje się czynnik tkankowy (TF) w znacznie mniejszym stężeniu niż w teście PT a w INCA z kolei dla aktywacji krzepnięcia stosuje się niewielką dawkę tlenku krzemu jako

czynnik kontaktu z chlorkiem wapnia. W teście rekalkyfikacji nie ma żadnego czynnika kontaktu poza ścianą próbówki polistyrolowej.

Fibrynogen można oznaczać przy pomocy dwóch nowych testów: FIFTA (Fibrinogen Function Turbidimetric Assay) i FIATA (Fibrinogen Antigen Turbidimetric Assay). W pierwszym teście występuje niska aktywność trombiny w rekalkyfikowanym osoczu – 0,2IU/ml odpowiadająca osoczu prawidłowemu. Jedną część osocza cytrynianowego miesza się z odczynnikiem FIFTA: 0,3IU/ml trombiny, 0,4mg/ml polibrenu, 6% albuminy ludzkiej i PBS. W teście FIATA fibrynogen i białka fibrynopodobne są precypitowane przy pomocy antybiotyku wankomycyny.

Pojawił się nowy globalny test dla oznaczania fibrynolizy – FIPA (Fibrinolysis Parameters Assay). 10 części cytrynianowego osocza jest inkubowane z odczynnikiem FIPA: 100 IU/ml urokinazy, 6mM kwasu traneksemowego, 6% ludzkiej albuminy i PBS. Po 10 min. reakcja zostaje zatrzymana przy pomocy argininy, a powstałą plazminę bada się przy pomocy barwnego substratu zamiast fibrynogenu.

Oprócz ww testów, które wymagają czasu dla wykonania w laboratorium pojawiły się urządzenia, którymi można wykonywać testy przy łóżku chorego przez co zyskuje się na czasie a przez to szybsze i kompletne postępowanie terapeutyczne. Zazwyczaj wykonują je anestezjolodzy a w niektórych wypadkach wykonywane są w blisko położonym laboratorium. Badania te noszą nazwę angielską POCT (Point of Care Testing) czyli testy w miejscu opieki nad pacjentem. Do badań, które można wykonywać należą: PT, INR, APTT, aktywowany czas krzepnięcia (ACT – Activated Clotting Time), zmodyfikowany TT, badania przy pomocy TEG® (tromboelastografii) i ROTEM® (rotacyjnej tromboelastometrii), badania funkcji płytek krwi i oznaczanie D-dimerów.

Bibliografia

- Swierdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W.: WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissue. IARC 2008.
- Greer J.P., Foerster J., Rodgers G.M., Paraskevas F., Glader B., Arber D.A., Means T.M., *Wintrobe's Clinical Hematology, 12th edition, 2008.*
- Stief T.W., Otto S., Renz H., The intrinsic coagulation activity assay. *Blood Coag & Fibrinolysis* 17: 369-378, 2006.
- Stief T.W., Wiczerzak A., Renz, H., Influence of coagulation factors on extrinsic thrombin generation. *Blood Coag & Fibrinolysis* 18: 105-112, 2007.
- Stief T.W.: Innovative tests of plasmatic hemostasis. *Labmedicine* 39: 225.230, 2008.
- Castellone D.D., Van Cott E.M., Laboratory monitoring of new anticoagulants. *Am J Hematol* 85: 185-187, 2010.
- Perry D.J., Fitzmaurice D.A., Kitchen S., Mackie I.J., Mallett S.: Point-of-care testing in haemostasis. *Brit J Haematol* 150: 501-514, 2010.