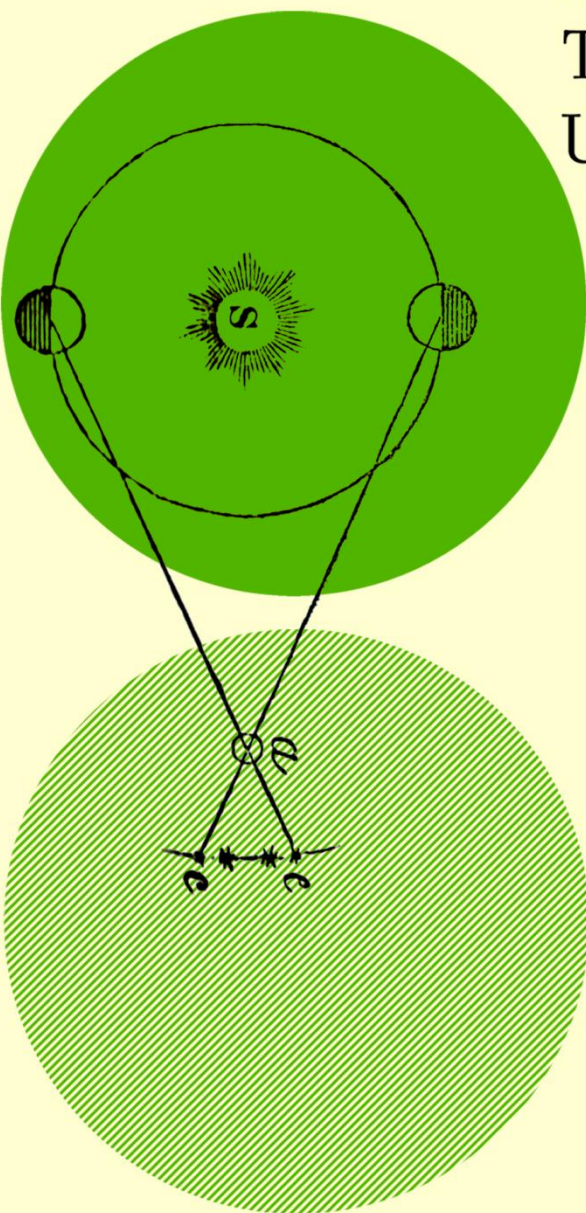


Zeszyty

NUMER 3 (2/2011)

Naukowe

Towarzystwa Doktorantów
Uniwersytetu Jagiellońskiego



Kraków 2011

Wydawnictwo
Naukowe
Uniwersytetu
Jagiellońskiego

RADA NAUKOWA

PROF. DR HAB. KAROL MUSIOŁ
REKTOR UNIwersYTETU Jagiellońskiego

PROF. DR HAB. ANDRZEJ MANIA
PROREKTOR UNIwersYTETU Jagiellońskiego DS. DYDAKTYKI

PROF. DR HAB. MARIA FLIS
DZIEKAN WYDZIAŁU FILOZOFICZNEGO UJ

PROF. DR HAB. BOGDAN SZLACHTA
DZIEKAN WYDZIAŁU STOSUNKÓW MIĘDZYNARODOWYCH I POLITYCZNYCH UJ

PROF. DR HAB. KATARZYNA KIEĆ-KONONOWICZ
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, UJ COLLEGIUM MEDICUM
KIEROWNIK STUDIÓW DOKTORANCKICH

PROF. DR HAB. JACEK SKŁADZIEŃ
WYDZIAŁ LEKARSKI, UJ COLLEGIUM MEDICUM
KIEROWNIK STUDIÓW DOKTORANCKICH

PROF. DR HAB. MARTA KUDELSKA
WYDZIAŁ FILOZOFICZNY UJ, PRODZIEKAN DS. STUDENCKICH

DR HAB. LESZEK SOSNOWSKI
WYDZIAŁ FILOZOFICZNY UJ

Zeszyty Naukowe

Towarzystwa Doktorantów
Uniwersytetu Jagiellońskiego
NUMER 3 (2/2011)

Nauki
Ścisłe



KRAKÓW 2011

Wydawca:
Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ
Ul. Straszewskiego 25/3
31-113 Kraków

Redaktor naczelna:
Paulina Tendera

Zastępca redaktor naczelnej:
Marcin Lubecki

Sekretarz redakcji:
Rafał Opulski

Redaktor prowadząca serii Nauk Ścisłych:
Anna Bogdali

Redaktorzy tomu:
Anna Bogdali, Paulina Koczurkiewicz

Recenzenci artykułów:
Prof. dr hab. Marek Sanak,
Dr hab. Tomasz Klupa,
Dr hab. Krzysztof Szczubiałka,
Dr Katarzyna Cyganek,
Dr Justyna Drukała,
Dr Wojciech Dyga,
Dr Agnieszka Grinn-Gofroń,
Dr Małgorzata Lenartowicz

Redakcja językowa i korekta:
Marcin Lubecki (red. prowadzący),
Katarzyna Migdał, Przemysław Tacik

Skład:
Marcin Lubecki

Projekt okładki:
Szymon Drobnia

© Copyright by Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ
All rights reserved
Wydanie I, Kraków 2011

ISSN 2082-3827

SPIS TREŚCI

BARTŁOMIEJ MATEJKO	5
NOWOCZESNE TECHNOLOGIE W TERAPII CUKRZYCY TYPU 1	
MAGDALENA SADYŚ, DOROTA MYSKOWSKA, MATTHEW SMITH.....	19
CHARAKTERYSTYKA BADAŃ AEROMYKOLOGICZNYCH I WSTĘPNY OPIS BADAŃ PROWADZONYCH W WORCESTER W WIELKIEJ BRYTANII W RA- MACH WSPÓŁPRACY WIELOOŚRODKOWEJ	
MARIA GROLIK	33
INŻYNIERIA TKANKOWA – NOWE NARZĘDZIE W REKONSTRUKCJI TKA- NEK	
PAWEŁ J. CHOMIAK, JACEK J. PIETRZYK.....	43
OMÓWIENIE PROBLEMU WŁAŚCIWEJ INTERPRETACJI WYNIKÓW KARIOTYPU MOLEKULARNEGO PRZY PRÓBIE IDENTYFIKACJI OB- SERWOWANYCH NIEZRÓWNOWAŻONYCH ABERRACJI CHROMOSO- MOWYCH U PACJENTÓW Z NIESPECYFICZNĄ NIEPEŁNOSPRAWNO- ŚCIĄ INTELEKTUALNĄ ORAZ ZESPOŁEM MNOGICH WAD WRODZO- NYCH	
PAWEŁ J. CHOMIAK, MAGDALENA JANECZKO	53
AN 11-YEAR-OLD BOY WITH DOWN SYNDROME PHENOTYPE AND PAR- TIAL DUPLICATION IN 21Q11.2-Q21 REGION	
INFORMACJE O AUTORACH.....	59

BARTŁOMIEJ MATEJKO

(UNIwersytet Jagielloński)

NOWOCZESNE TECHNOLOGIE W TERAPII CUKRZYCY TYPU 1

WPROWADZENIE

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2000 roku, dotyczących rozpowszechnienia cukrzycy, choroba ta dotyczy około 171 milionów ludzi na świecie, a prognozy na rok 2030 mówią o 366 mln chorych¹. W Polsce ok. 2,6 mln społeczeństwa choruje na cukrzycę, z czego prawdopodobnie ok. 50% to przypadki nierozpoznane i nieleczone². Cukrzycę definiuje się jako grupę chorób metabolicznych, która charakteryzuje się podwyższonym poziomem cukru we krwi, wynikającym z zaburzenia wydzielania lub działania insuliny³. 85% wszystkich chorych to przypadki cukrzycy typu 2, która powstaje jako efekt zarówno zmniejszenia wrażliwości tkanek na insulinę, jak i zaburzenia funkcji wydzielniczej komórek β wysp trzustkowych. 10% osób choruje na cukrzycę typu 1 (T1DM), która pojawia się na skutek autoimmunologicznej

¹ *Report of a WHO/IDF Consultation, Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia* Geneva 2006; D. Yach, D. Stuckler, K.D Brownell, *Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes*, "Nature Medicine" 2006, 1, Vol. 12.

² K. Korzeniowska, A. Jabłecka, *Cukrzyca (Część I)*, „Farmacja Współczesna” 2008, 1. 14 listopada – Światowy Dzień Walki z Cukrzycą. [Online]. Protokół dostępu: http://naukawpolsce.pap.pl/palio/html.run?_Instance=cms_naukapl.pap.pl&_PageID=1&s=szablon.depesza&dz=szablon.depesza&dep=367789&data=&lang=PL&_Checksum=1213615981 [10 sierpnia 2011].

³ *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its Complications. Report of WHO Consultations. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus*, WHO, Geneva 1999.

destrukcji komórek β wysp trzustkowych. Prowadzi ona do bezwzględnego niedoboru insuliny i konieczności podawania jej z zewnątrz. Występują również inne typy cukrzycy, takie jak cukrzyca ciążowa oraz cukrzyca o znanej etiologii wywołanej przez różne czynniki, tj. defekty genetyczne funkcji komórek β , defekty genetyczne działania insuliny, schorzenia zewnątrzwydzielniczej części trzustki, endokrynopatie, leki i substancje chemiczne, zakażenia oraz rzadkie postaci cukrzycy wywołane procesem immunologicznym⁴.

Cukrzyca jest jednym z głównych powodów inwalidztwa i przedwczesnej umieralności (6. miejsce pod względem przyczyn zgonów na świecie⁵). Dzieje się tak głównie w wyniku rozwoju makro- i mikroangiopatycznych powikłań cukrzycowych. Dzięki odpowiedniej edukacji pacjenta, wdrożeniu nowoczesnych metod leczenia oraz specjalistycznej opiece diabetologicznej można zapobiegać wystąpieniu tych powikłań. Rozwój inżynierii biomedycznej może znacząco przyczynić się do rozwoju terapii cukrzycy poprzez opracowywanie i wprowadzanie nowych technologii, które pomagają lekarzom diagnozować, leczyć i prognozować postępy choroby. W artykule omówione są najnowsze technologie podawania insuliny (głównie pompy insulinowe), pomiaru glikemii, a także programy i systemy informatyczne, które mają za zadanie pomóc lekarzowi w indywidualizacji leczenia cukrzycy oraz możliwości dalszego rozwoju tych technologii.

HISTORIA ROZWOJU TECHNOLOGII PODAŻY INSULINY

Przed odkryciem insuliny w 1922 roku przez Fredericka Bantinga i jego asystenta Charlesa Besta większość dzieci, u których zdiagnozowano cukrzycę, umierała w ciągu roku⁶. Od tego czasu postęp w medycynie przedłuża i podnosi standard życia pacjentów z cukrzycą. Początkowo insulina była izolowana z trzustek krów, świń lub łososi⁷. W 1978 roku naukowcy wykorzystali technologię rekombinacji DNA w celu zsyntetyzowania ludzkiej insuliny w bakterii *E.coli*. Obecnie na rynku dostępnych jest bardzo wiele preparatów insulinowych, które w coraz większym stopniu naśladują wydzielanie prawidłowo funkcjonujących komórek beta wysp trzustkowych. Znacznej zmianie uległy metody wstrzykiwania tych preparatów. Obecnie odchodzi się od wstrzykiwań insuliny za pomocą jednorazowych strzykawek. Coraz częściej zastępują je insulinowe

⁴ K. Korzeniowska, A. Jabłecka, op. cit.

⁵ Ibidem.

⁶ *The History of Diabetes*. [Online]. Protokół dostępu: www.diabeteshealth.com/read/2008/12/17/715/the-history-of-diabetes/ [10 sierpnia 2011].

⁷ D. Andreu, J. Bosch, J.M. Méndez, *Engineering Biomechanics of a Insulin Pumps and Artificial Pancreas*, "Applications of Engineering Mechanics in Medicine" 2005, GED – University of Puerto Rico, Mayagüez.

wstrzykiwacze typu „piór”. Są one wygodne, pozwalają precyzyjnie dawkować insulinę, posiadają wymienialny wkład. Jednakże różne rodzaje preparatów insulinowych wymagają używania różnych typów wstrzykiwaczy.

Iniekcje insuliny są niezbędne dla chorych na T1DM, ale mogą być źródłem lęku i urazów u pacjenta, dlatego rozwija się inne, mniej inwazyjne techniki egzogennej podaży insuliny. Do takich technik należą wstrzykiwacze ciśnieniowe. Mają one kształt wydłużonego walca z zamontowanym wysokoprężnym zbiornikiem gazu. Taki aparat funkcjonuje w ten sposób, że po naciśnięciu spustu odpowiednia ilość strumienia insuliny przenika przez skórę. Taki sposób podaży insuliny do organizmu jest mniej bolesny niż przebicie igłą skóry⁸.

Osobiste pompy insulinowe, o których szerzej będzie mowa w dalszej części artykułu, pozwalają na lepszą kontrolę metaboliczną oraz zmniejszenie częstości wkłuć. Pompa insulinowa to urządzenie, które w sposób ciągły podaje małe porcje insuliny. Została ona wynaleziona w latach 60. ubiegłego wieku. W erze miniaturyzacji urządzeń elektronicznych i szybkiego postępu technologicznego rozmiar pomp, podobnie jak i komputerów, uległ zmniejszeniu, dodano nowe funkcje, ulepszono oprogramowanie oraz unowocześniono zestawy infuzyjne⁹. Samokontrola glikemii również przeszła szereg technologicznych modyfikacji. W latach 60. ubiegłego wieku stosowano paski diagnostyczne do określenia zawartości cukru w moczu (po zanurzeniu w próbce moczu pole na pasku zmienia kolor w zależności od ilości glukozy). Pierwszy glukometr przenośny Ames (wagił aż 1,2 kg) powstał w 1969 roku¹⁰ i ta technologia jest stosowana do dnia dzisiejszego. Do badania poziomu cukru we krwi za pomocą glukometru należy nakłuć boczną część opuszek palców, a następnie przenieść krew na reaktywne pole paska testowego. Pod wpływem glukozy zachodzi reakcja chemiczna, która powoduje zmianę barwy paska lub zmianę natężenia mikropądu elektrycznego przechodzącego przez reaktywne pole paska po wprowadzeniu go do glukometru. Zmiany te są proporcjonalne do stężenia glukozy we krwi. Nowe technologie pozwoliły zmniejszyć rozmiary glukometru do wielkości telefonu komórkowego, może więc być noszony w kieszeni lub torebce. Współcześnie opracowano również prawie bezbolesny sposób pobierania krwi, działający na zasadzie próżniowej, o nazwie Ascensia Vaculance firmy Bayer. Dzięki niemu można pobierać krew standardowo nie tylko z opuszek palców, ale też np. z przedramienia, gdzie jest mniej zakończeń nerwowych. W ten sposób pomiar staje się praktycznie bezbolesny. Dodatkowo dużym ułatwieniem stosowania tej metody jest fakt, iż system nie wymaga kodowania glukometru,

⁸ *Instrumenty do podawania insuliny*. [Online]. Protokół dostępu: <http://diabetyk.pl/leczenie/insulinoterapia/2/skuteczne-i-bezpieczne-leczenie-insulina-cz-1.html> [10 sierpnia 2011].

⁹ *Materiały firmy Medtronic*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.pompy-medtronic.pl/o-medtronic/history.html> [10 września 2011].

¹⁰ *The History of Diabetes*, op. cit.; *Materiały reklamowe firmy Bayer*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.bayerdiabetes.pl/produkty/> [10 sierpnia 2011].

co stanowi pewną niedogodność w wykonywaniu pomiaru, o czym będzie mowa w dalszej części pracy¹¹.

W 1999 roku wprowadzono do codziennej praktyki lekarskiej system ciągłego monitorowania glikemii (CGMS), który dostarcza informacji o poziomie glukozy z okresu 3 dni. Transfer danych do komputera w gabinecie lekarskim pozwala na określenie wyjściowego profilu glikemii i monitoring skutków wprowadzenia i stosowania wybranej metody leczenia, co znacznie ułatwia dobór postępowania terapeutycznego. Natomiast w 2003 roku Medtronic Diabetes wprowadził system integrujący pompę insulinową i ciągły monitoring glikemii. W ramach tej bezprzewodowej technologii monitor automatycznie przysyła dane wartości glikemii do pompy insulinowej. Dodatkowo zastosowano również w pompie funkcje kalkulatora bolusa, tzw. Bolus Wizard, który tworzy propozycję odpowiedniej dawki insuliny dla pacjenta i śledzi ilość zużywanej przez organizm insuliny. Jednakże prace nad wszczepialnymi pompami mają jedynie charakter doświadczalny. Stanowią one kolejny krok na drodze do stworzenia układu pętli zamkniętej, czyli technologii, w której odczytana w czasie rzeczywistym glikemia po przekazaniu do mikroprocesora będzie dawać sygnał pompie do wydzielenia odpowiedniej ilości insuliny. CGMS jest znaczącym krokiem w kierunku zamknięcia pętli systemu dostarczającego insulinę. Taka technologia pozwalałaby w dużym stopniu na naśladowanie działania ludzkiej trzustki. Stworzenie takiego systemu będzie jednak wymagało zmierzenia się z takimi problemami, jak adsorpcja cząsteczek biologicznych na powierzchni sensora mającego kontakt z krwią i płynem tkankowym, zatykanie się cewnika podającego insulinę do jamy otrzewnowej oraz precypitacja insuliny w zbiorniku pompy. Trudność w opracowaniu sprawnie funkcjonującego systemu sprawia również zmienne zapotrzebowanie organizmu na insulinę, której nie mogą przewyżczyć obecnie proponowane algorytmy działania pomp w układzie zamkniętym.

W kontroli leczenia cukrzycy ważne jest również określenie stopnia realizacji zaleceń lekarskich. W tym celu opracowano w 1979 roku metodę pomiaru stężenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c)¹². Obecnie stała się ona parametrem długoterminowego wyrównania metabolicznego cukrzycy¹³. Frakcja hemoglobiny HbA1c powstaje poprzez przyłączenie cząsteczki glukozy obecnej we krwi do N-końcowej grupy aminowej łańcucha B globiny. Poziom HbA1c odzwierciedla stężenie glukozy we krwi w okresie 120 dni, które odpowiadają długości życia krwinek czerwonych. Dzięki temu podczas oznaczania poziomu glukozy otrzymuje się uśrednioną wartość poziomu glukozy z ostatnich 8-12 tygodni przed wykonaniem oznaczenia. Obniżenie wartości HbA1c o każdy 1% zmniejsza o 15% do 30% ryzyko wystąpienia późnych powikłań, takich jak choroby

¹¹ Ibidem.

¹² *The History of Diabetes*, op. cit.

¹³ G. Dzida, T. Koblik, *Co oznacza dobre wyrównanie metaboliczne cukrzycy – więcej pytań niż odpowiedzi. Praca pogładowa*, „Via Medica” 2008.

oczu, tkanki nerwowej czy układu sercowo-naczyniowego¹⁴. W Polsce zalecenia dotyczące wyrównania cukrzycy są podawane co roku przez Polskie Towarzystwo Diabetologiczne (PTD).

OSOBISTA POMPA INSULINOWA

Obecnie około 250 tys. ludzi na całym świecie jest leczonych przy użyciu pomp insulinowych¹⁵. Pompa insulinowa jest najlepszym urządzeniem pozwalającym na podawanie egzogennej insuliny w taki sposób, aby jej podaż odpowiadała fizjologicznemu zapotrzebowaniu organizmu na ten hormon. Leczenie wielokrotnymi wstrzyknięciami insuliny jest znacznie mniej skuteczne w porównaniu z efektami, jakie otrzymuje się w przypadku stosowania pomp insulinowych. Brak możliwości optymalizacji terapii cukrzycy przy zastosowaniu metody wielokrotnych wstrzyknięć insuliny na dobę wynika zarówno z braku możliwości odzwierciedlenia bazalnego, międzyposiłkowego poziomu wydzielania insuliny, jak i z nieoptymalnego, okołoposiłkowego dawkowania tego hormonu. Jest to wynikiem dużej zmienności zależnej od sposobu i miejsca wstrzyknięcia (ważna jest wielkość dawki, struktura tkanki podskórnej, jej ciepłota, stosowanie masażu) oraz występowania zmiennego osobniczego zapotrzebowania na insulinę (konieczna jest znajomość nie tylko okołoposiłkowego stężenia insuliny, ale też stałego, podstawowego stężenia insuliny). Dodatkowo kinetyka działania niektórych preparatów insulinowych jest zmienna nawet u tego samego pacjenta¹⁶. W związku z powyższymi trudnościami metoda intensywnej insulinoterapii polegająca na wielokrotnych wstrzyknięciach nie zawsze pozwala na optymalne wyrównanie cukrzycy.

Korzyści, jakie daje stosowanie pompy insulinowej, są następujące:

- dzięki ciągłemu podawaniu insuliny zostaje lepiej odzwierciedlony jej fizjologiczny poziom;
- pozwala na bardziej precyzyjne dawkowanie insuliny;
- zapewnia lepsze wchłanianie hormonu (zmniejszenie dobowego zapotrzebowania o 10 %¹⁷);

¹⁴ American Diabetes Association: *Standards of Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus*, "Diabetes Care" 2002, 25 (1).

¹⁵ *Terapia z użyciem pompy insulinowej*. [Online]. Protokół dostępu: www.accu-check.pl/zrozumieccukrzyce/terapiainsulinowej.html [10 sierpnia 2011].

¹⁶ *Krytyczna ocena leczenia cukrzycy pompami osobistymi (CSII) w Polsce i na świecie*. [Online]. Protokół dostępu: http://www.medycynametaboliczna.pl/index.php?okno=7&id=60&art_type=11 [10 sierpnia 2011].

¹⁷ J. Sieradzki, *Cukrzyca – Kompendium*, Via Medica, Gdańsk 2009.

- pozwala na prostsze dostosowanie dawkowania insuliny w zależności od sytuacji (infekcja, intensywny wzrost organizmu w okresie dojrzewania, zmiany hormonalne zachodzące w organizmie, zwiększona aktywność fizyczna);
- dzięki zastosowaniu odpowiedniego rodzaju bolusa możliwe jest dostosowanie podaży insuliny w zależności od tempa wchłaniania spożywanego posiłku;
- redukuje wahania glikemii oraz stabilizuje poziom HbA1c;
- redukuje ilość ukłuć (jedno na ok. trzy dni);
- pozwala na większą swobodę spożywanych posiłków, wzrost komfortu życia;
- pozwala na dokładniejszą kontrolę metaboliczną, zwłaszcza w okresie ciąży.

Jednakże pompa insulinowa nie jest pozbawiona wad, do których zalicza się:

- brak tkankowego depozytu insuliny i tym samym możliwość wystąpienia hiperglikemii oraz kwasicy ketonowej (np. w sytuacji awarii pompy, wyczerpania baterii, zablokowania wkłucia – obecnie wszystkie te sytuacje zabezpieczone są przez system alarmów pompy);
- wysoka cena;
- zmiany w powłokach w miejscu instalacji wkłucia (zapalne, alergiczne).

Warunkiem sprawnego stosowania pompy jest wysoki poziom wykształcenia pacjenta oraz możliwość kontaktu z ośrodkiem diabetologicznym prowadzącym terapię. Ten rodzaj leczenia jest zalecany każdemu choremu na cukrzycę typu 1, który akceptuje taką formę terapii¹⁸. W 2009 roku Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ) zaczął finansować zakupy pomp insulinowych i wkłuć dla dzieci i młodzieży do 18. roku życia, a w 2011 roku przedłużono czas refundacji do 26. roku życia. W ten sposób NFZ prawdopodobnie przyczyni się do upowszechnienia tego rodzaju terapii. Pompy insulinowe są szczególnie wskazane w przypadku kobiet w ciąży, kiedy szczególnie istotne staje się idealne wyrównanie metaboliczne. Z zakupem pomp insulinowych związana jest działalność „Wielkiej Orkiestry Świątecznej Pomocy” (WOŚP), która od lat wspiera tę inicjatywę. Od początku działalności nabyła ponad 3000 pomp, w tym ok. 270 dla kobiet w ciąży¹⁹.

¹⁸ Supplement 1. ADA Clinical Practice Recommendations 2000, “Diabetes Care” 23 (suppl.).

¹⁹ *Ogólnopolski program leczenia pompami insulinowymi dzieci z cukrzycą*. [Online]. Protokół dostępu: http://www.wosp.org.pl/medycyna/pompy_insulinowe_cukrzyca [10 sierpnia 2011].

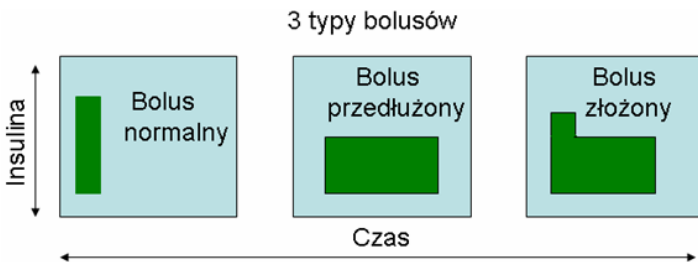
ZASADA DZIAŁANIA POMPY INSULINOWEJ

Pompa poruszana jest przez silnik mechaniczny zasilany baterią. Jest ona wymienialna lub jednorazowa o długim okresie działania. Silnik służy do wypychania tłoka strzykawki umieszczonej wewnątrz pompy – w strzykawce znajduje się insulina, która poprzez dren dostaje się do tkanki podskórnej.

U osoby, która nie jest chora na cukrzycę, trzustka regularnie uwalnia niewielkie ilości insuliny do organizmu w celu regulowania poziomu glukozy. Kiedy spożywa się posiłek, trzustka uwalnia dodatkową ilość insuliny, aby obniżyć poziom glukozy we krwi. Terapia pompowa najlepiej naśladuje ten fizjologiczny sposób wyrzutu insuliny. Za pomocą pompy insulinowej programuje się tzw. podstawowy wlew insuliny (baza), który z reguły stanowi 0,5-2,0 jednostek insuliny na godzinę. Większe zapotrzebowanie obserwuje się przed śniwtem oraz wieczorem. Pompa posiada również funkcję czasowej zmiany bazy, której używa się w sytuacji zmiany zapotrzebowania na insulinę, gdy nie jest to związane ze spożywaniem posiłku, np. przy infekcji, wysiłku fizycznym, przedłużającej się hiperglikemii. Używanie tej funkcji pozwala na lepsze doinsulinowanie organizmu, pozwala w łagodny sposób pokonać hiperglikemię i zapobiega powstaniu kwasicy ketonowej.

Każdy posiłek wymaga podania dodatkowej dawki insuliny, tzw. bolusa. Pompy insulinowe posiadają trzy rodzaje bolusów posiłkowych, czyli trzy różne formy podawania insuliny. W przypadku spożywania węglowodanów całość insuliny podawana jest od razu (tzw. bolus normalny). W przypadku spożycia posiłku białkowo-tłuszczowego podawanie insuliny rozłożone jest w czasie na kilka godzin (tzw. *bolus square*, przedłużony), co odzwierciedla profil jelitowego wchłaniania tego rodzaju pokarmu. W przypadku posiłku złożonego, np. węglowodanowo-białkowo-tłuszczowego, bolus ma charakter dwuetapowy, część insuliny podawana jest natychmiast, część w formie przedłużonej (tzw. *bolus dual*, złożony) (Rys. 1.).

Rys. 1. Trzy rodzaje bolusów: normalny, przedłużony i złożony



Źródło: Opracowanie własne.

Niestety, pompa sama nie zadecyduje o ilości insuliny, jaką należy podać organizmowi na zjedzony posiłek. Konieczne jest działanie pacjenta; punktem wyjścia do podjęcia decyzji nt. dawki insuliny są zalecenia diabetologa, ale chory powinien wprowadzić indywidualną korektę. Istotne jest więc częste kontrolowanie poziomu cukru we krwi i okresowe przygotowanie profilu glikemii.

Aby ułatwić szacowanie dawki insuliny potrzebnej na posiłek (bolusa posiłkowego) lub insuliny potrzebnej na korektę, stworzono funkcję kalkulatora bolusa. Pozwala ona określić ilość insuliny aktywnej obecnej w organizmie na podstawie wcześniejszych ustawień wskaźników insulinowych. Pacjent jedynie wprowadza aktualną glikemię oraz zawartość węglowodanową planowanego posiłku, a pompa sama przeliczy potrzebną do podania dawkę insuliny. Ustawienia tej funkcji, tak jak w poprzednim wypadku, wymagają od pacjenta aktywnego podejścia do terapii. Niestety, dotychczas opracowana funkcja nie uwzględnia zróżnicowanego składu posiłku ani jego indeksu glikemicznego. Stosowanie tej funkcji ułatwia leczenie pacjentom, jest także bardzo pomocne dla lekarza prowadzącego. Lekarz dzięki odczytaniu danych z pompy posiada między innymi informacje o wielkości spożytego posiłku, podanej dawce insuliny i tym samym może zaproponować odpowiednie kroki terapeutyczne i korektę ustawień pompy. Terapia pompowa jest bezpieczniejsza od innych metod leczenia m.in. z uwagi na możliwość ustawienia w niej różnych alarmów, które informują pacjenta o potencjalnym niebezpieczeństwie (alarm pominięcia bolusa związanego z posiłkiem, przypomnienie o potrzebie sprawdzenia poziomu glukozy we krwi, przypomnienie o zmiany miejsca wkłucia itp.). Dzięki tym informacjom pacjent może odpowiednio zareagować i uniknąć np. hipoglikemii.

Pompa insulinowa ułatwia leczenie także sportowcom, stosuje ją m.in. Michał Jeliński, znany polski wioślarz, 4-krotny mistrz świata (2005, 2006, 2007, 2009), mistrz olimpijski z IO w Pekinie. Mimo poważnej choroby, jaką jest cukrzyca, realizuje on swoje postanowienia i osiąga najwyższe trofea. Dzieli się także zdobytym doświadczeniem na temat problemów związanych z wysiłkiem fizycznym przy stosowaniu terapii pompowej za pośrednictwem internetu²⁰.

ALTERNATYWNE DROGI PODAWANIA INSULINY

Podawanie doustne insuliny nie jest nadal możliwe z uwagi na procesy trawienne zachodzące w układzie pokarmowym. Jednakże podejmuje się próby otoczenia insuliny pochodnymi kwasu fumarowego, który stanowi rodzaj kapsuły umożliwiającej wchłanianie insuliny dopiero w dalszych odcinkach jelita²¹. Obecnie na zaawansowanym poziomie prowadzone są badania wziewnej podaży

²⁰ *Diabetycy Opanowali Krakowski Rynek!* [Online]. Protokół dostępu: <http://www.marsz.moja-cukrzyca.org/> [19 stycznia 2010].

²¹ J. Sieradzki, op. cit.

insuliny. Jej inhalacja jest możliwa dzięki istnieniu dużej powierzchni pęcherzyków płucnych, ich bardzo dobrego ukrwienia oraz dużej przepuszczalności. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą zarejestrowanego w Unii Europejskiej preparatu Exubera. Jako proszek umieszcza się go w poręcznym inhalatorze i rozprasza w formie chmury aerozolowej, a następnie wykonuje się pojedynczy, głęboki wdech. Wadą tej techniki jest potrzeba podania 10 razy większej dawki hormonu w porównaniu z innymi stosowanymi metodami, aby osiągnąć wyrównanie metaboliczne²².

SYSTEM CIĄGŁEGO MONITOROWANIA GLIKEMII (CGMS)

Skuteczne leczenie cukrzycy nie jest możliwe bez bieżącej oceny glikemii. Większość pomiarów służących ocenie wyrównania cukrzycy dokonywana jest za pomocą glukometrów. Dzięki pomiarom glukometrycznym otrzymujemy informacje o poziomie glukozy w danym momencie. Jednakże nie posiadamy informacji, jak glikemia zmieniała się między pomiarami. Dopiero wprowadzenie systemu ciągłego monitorowania glikemii (CGMS) pozwoliło śledzić zmiany glikemii 24 godziny na dobę. System dokonuje 288 pomiarów glikemii w płynie śródtkankowym tkanki podskórnej w dzień i w nocy. System ten daje pacjentowi możliwość natychmiastowej interwencji, gdyż aktualna glikemia wyświetlana jest na ekranie urządzenia. Pacjent wraz z lekarzem mogą przeanalizować dane zapisane w pamięci systemu monitorującego, co daje możliwość znalezienia nieuświadomionych hiper- lub hipoglikemii, pozwala zrozumieć zależność między codzienną aktywnością a poziomem glikemii i może mieć duży wpływ na poprawę stylu życia pacjenta poprzez lepszą samokontrolę²³. Dzięki systemowi CGMS możliwe stało się określenie tempa zmian poziomu glukozy (trendu) oraz przewidywanie kierunku tych zmian, czego nie można było określić po jednokrotnym, punktowym pomiarze poziomu cukru.

ZASADA DZIAŁANIA SYSTEMU CGM

Updike i Hicks w 1967 roku udowodnili, że podczas utleniania glukozy do kwasu glukozowego przez enzym oksydazę glukozową²⁴ może być indukowany sygnał elektryczny. Warstwy membran zawierające enzym, który reaguje z glukozą, są umieszczone na elektrodzie (sensorze zlokalizowanym w tkance podskórnej) i przenoszą informacje przez chemiczne lub elektryczne mediatory

²² Ibidem.

²³ J. Ludvigsson, E. Isacson, *Clinical use of glucose sensors in the treatment of diabetes in children and adolescents*, "Pract. Diab. Int." 2003, 20 (1).

²⁴ S.J. Updike, G.P. Hicks, *The enzyme electrode*, "Nature" 1967, 214.

do nadajnika. Sygnały te są proporcjonalne do stężenia glukozy. Najbardziej krytycznym elementem kontrolnym skutecznej pracy sensora jest jego kalibracja (ma ona na celu „przetworzenie” sygnału elektrycznego z sensora na wartość glikemii), którą należy wykonać, gdy poziom glukozy jest ustabilizowany. Kalibrację wykonuje się poprzez porównanie wyniku CGMS z pomiarem glikemii we krwi włosniczkowej pobieranej z opuszek palca. Poprawną pracę sensora utrudniają jednak zakłócenia pojawiające się np. po jego założeniu, które mają związek ze zmianami poziomu cukru spowodowanymi procesami naprawczymi i regeneracyjnymi tkanki. Czasami sensor nie pokazuje danych z powodu pojawienia się wewnętrznych algorytmów, które mówią o tym, że dane mogą być niepoprawne lub niebezpieczne do pokazania. CGMS może oprócz cukrzycy znaleźć zastosowanie w przypadku monitorowania metabolizmu najlepszych sportowców, żołnierzy, pilotów czy astronautów²⁵. W przyszłości ulepszone zostaną algorytmy szacujące poziom glukozy i położony zostanie większy nacisk na szkolenie pacjentów i klinicystów, aby potrafili lepiej zinterpretować uzyskane dane.

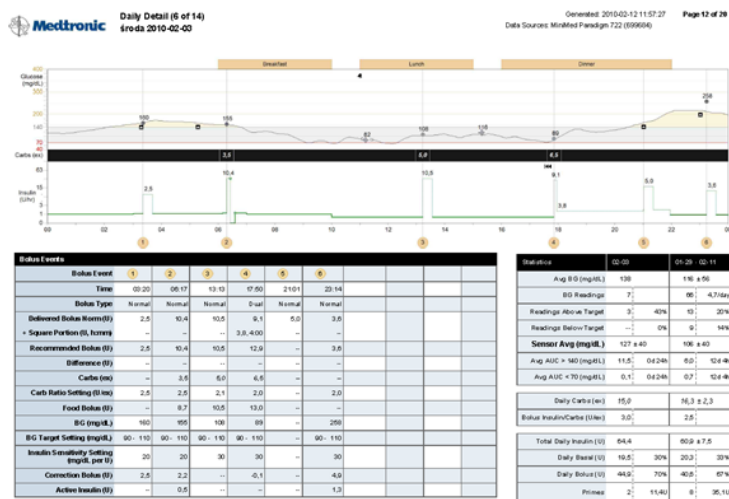
SYSTEMY INFORMATYCZNE I TELEMEDYCYNĄ

CGMS pozwala przechowywać w pamięci urządzenia dane z 14 dni, dzięki czemu można je później przenieść do komputera i za pomocą odpowiedniego oprogramowania przetworzyć, a w rezultacie uzyskać czytelne raporty i wykresy uwzględniające analizę statystyczną (Rys. 2.)²⁶. W przyszłości wskazania CGMS będą mogły być wyświetlane na ekranie nawigacji samochodowej, a informacja o niedocukrzeniu przesyłana będzie do bliskich za pomocą telefonu komórkowego z lokalizacją GPS.

²⁵ J. Brauker, *Continuous Glucose Sensing: Future Technology Developments*, “Diabetes Technology & Therapeutics” June 2009, 11.

²⁶ J. Tatoń, A. Czech, M. Bernas, *Diabetologia kliniczna*, PZWL, Warszawa 2008.

Rys. 2. Przykładowe tabele i wykresy z programu CareLink Professional



Źródło: Opracowanie własne.

Dane zgromadzone na pompie/monitorze glikemii pozwalają lekarzowi na analizę dawkowania insuliny i korektę wlewu podstawowego. Dają także informacje o korzystaniu z bazy tymczasowej, bolusów złożonych, ilości spożywanych wymienników i korzystaniu z funkcji kalkulatora bolusa. Zgromadzone dane mogą posłużyć do tworzenia baz, a także mogą być dalej obrabiane naukowo i statystycznie. Dostępne oprogramowanie umożliwia dokonanie retrospektywnej analizy wyników oraz pozwala na długoterminową optymalizację wyników leczenia. Pacjent sam również ma możliwość odczytania wyników z pompy i internetowej prezentacji najistotniejszych danych, które można wydrukować lub przesłać np. drogą elektroniczną lekarzowi prowadzącemu. W przyszłości być może wizyty chorych leczonych pompami będą się odbywały za pomocą internetu i wideokonferencji z lekarzem, który widząc dane z pompy, będzie mógł modyfikować aktualną terapię.

NOWINKI TECHNOLOGICZNE

W 2009 roku w USA weszła na rynek najmniejsza i najlżejsza na świecie pompa insulinowa „Solo” firmy Mendingo. Pompa jest zintegrowana z drenem, co pozwoliło na wyeliminowanie wkłucia. Steruje się nią za pomocą urządzenia wielkości telefonu komórkowego²⁷. W 2010 roku firma Medtronic wprowadziła

²⁷ Nowa mikropompa insulinowa Solo. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.pompiarze.pl/pompy-insulinowe/nowa-mikro-pompa-insulinowa-solo/> [10 sierpnia 2011].

na polski rynek nową pompę „Paradigm VEO”. Jest to połączenie terapii za pomocą pompy insulinowej i stałego monitorowania poziomu glukozy (CGM). Posiada ona funkcję, dzięki której możliwe jest automatyczne wstrzymanie dopływu insuliny (hipoblokada). Funkcja ta zwiększa ochronę przed potencjalnymi epizodami ciężkiego niedocukrzenia, szczególnie podczas snu lub w sytuacji, kiedy pacjent nie ma możliwości reakcji. Jeśli czujnik Systemu „Paradigm VEO” wykáže u pacjenta obniżenie poziomu glukozy poniżej wyznaczonego progu, pompa wysyła alarm. Jeśli pacjent nie podejmie żadnego działania, urządzenie automatycznie wstrzymuje dopływ insuliny nawet do dwóch godzin. Po dwóch godzinach podaż insuliny zostanie wznowiona²⁸. Wprowadzono również do pompy system alarmów ostrzegawczych, np. że za 5, 10, 15, 25 minut wskazywane stężenie glukozy przekroczy zaprogramowany próg lub też alarm tempa zmian stężenia glukozy, informujący, że poziom glikemii gwałtownie się zmienia – spada lub rośnie. Powyższe alarmy stanowią system chroniący pacjenta przed niebezpieczeństwem hipo- lub hiperglikemii²⁹. System został nagrodzony przez Polskie Stowarzyszenie Diabetyków nagrodą „Kryształowego Kolibra” w kategorii Urządzenie Roku³⁰.

PODSUMOWANIE

Odkąd insulina po raz pierwszy ocaliła życie małego chłopca Leonarda Thomsona, co miało miejsce 90 lat temu, medyczne „nowinki” ułatwiają życie chorym na cukrzycę. Wydaje się, iż porównywalnym krokiem milowym w leczeniu cukrzycy byłoby stworzenie pompy insulinowej w pełni automatycznie podającej insulinę, zwalniającej pacjenta z konieczności stałego pamiętania o chorobie. Wiele zostało jeszcze do zrobienia, aby osiągnąć ten cel, dlatego rozwój inżynierii biomedycznej w kierunku tworzenia nowych rozwiązań podaż insuliny egzogennej wydaje się niezbędny, aby poprawić jakość leczenia, a w rezultacie komfort życia chorych na cukrzycę typu 1.

²⁸ D.B. Keenan, R. Cartaya, J.J. Mastrototaro, *The pathway to the closed-loop artificial pancreas: research and commercial perspectives*, „Pediatr. Endocrinol. Rev.” 2010, Aug. 7, Suppl. 3.

²⁹ *System Ciągłego Monitorowania Glikemii – Guardian®*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.pompy-medtronic.pl/informacje-o-produktac/system-ciaglego-monitorowania-glikemii-guardian/index.html> [09 sierpnia 2011].

³⁰ *Światowy Dzień Cukrzycy*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.pompy-medtronic.pl/dla-was/swiatowy-dzien-cukrzycy.html> [10 sierpnia 2011].

ABSTRACT

Diabetes is a group of metabolic diseases characterised by impaired insulin secretion or action affecting about 200 million people around the world. Type 1 diabetes, recognised in approximately 10% of all cases of diabetes, is an auto-immune disease leading to complete destruction of pancreatic beta cells producing insulin. Therefore, insulin must be delivered from outside. The article discusses the progress that has been made on the technology of insulin delivery in recent years, as well as on measuring the glucose level and the glucose level software which is helping the diabetologist to take the right therapeutic decision.

BIBLIOGRAFIA

1. 14 listopada – Światowy Dzień Walki z Cukrzycą. [Online]. Protokół dostępu: http://naukawpolsce.pap.pl/palio/html.run?_Instance=cms_naukapl.pap.pl&_PageID=1&s=szabl-on.depesza&dz=szabl-on.depesza&dep=367789&data=&lang=PL&_Checksum=1213615981 [10 sierpnia 2011].
2. American Diabetes Association: *Standards of Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus*, "Diabetes Care" 2002, 25 (1).
3. Andreu D., Bosch J., Méndez J.M., *Engineering Biomechanics of a Insulin Pumps and Artificial Pancreas*, "Applications of Engineering Mechanics in Medicine" 2005, GED – University of Puerto Rico, Mayagüez.
4. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its Complications. Report of WHO Consultations. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus*, WHO, Geneva 1999.
5. Yach D., Stuckler D., Brownell K.D., *Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes*, "Nature Medicine" 2006, 1, Vol. 12.
6. *Diabetycy opanowali krakowski rynek*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.marsz.mojacukrzyca.org/> [10 sierpnia 2011].
7. Dzida G., Koblik T., *Co oznacza dobre wyrównanie metaboliczne cukrzycy – więcej pytań niż odpowiedzi. Praca pogładowa*, Via Medica 2008.
8. *Instrumenty do podawania insuliny*. [Online]. Protokół dostępu: <http://diabetyk.pl/leczenie/insulinoterapia/2/skuteczne-i-bezpieczne-leczenie-insulina-cz-1.html> [10 sierpień 2011].
9. Brauker J., *Continuous Glucose Sensing: Future Technology Developments*, "Diabetes Technology & Therapeutics" June 2009, 11.
10. Keenan D.B., Cartaya R., Mastrototaro J.J., *The pathway to the closed-loop artificial pancreas: research and commercial perspectives*, "Pediatr. Endocrinol. Rev." 2010, Aug, 7, Suppl. 3.
11. Korzeniowska K., Jablecka A., *Cukrzyca (Część I)*, „Farmacja Współczesna” 2008, 1.
12. *Krytyczna ocena leczenia cukrzycy pompami osobistymi (CSII) w Polsce i na świecie*. [Online]. Protokół dostępu: http://www.medycynametaboliczna.pl/index.php?okno=7&id=60&art_type=11 [10 sierpnia 2011].
13. Ludvigsson J., Isacson E., *Clinical use of glucose sensors in the treatment of diabetes in children and adolescents*, "Pract. Diab. Int." 2003, 20 (1).
14. *Materiały firmy Medtronic*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.pompy-medtronic.pl/o-medtronic/history.html> [10 września 2011].
15. *Materiały reklamowe firmy Bayer*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.bayerdiabetes.pl/produkty/> [10 sierpnia 2011].
16. *Nowa mikropompa insulinowa Solo*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.pompiarze.pl/pompy-insulinowe/nowa-mikro-pompa-insulinowa-solo/> [10 sierpnia 2011].

17. *Ogólnopolski program leczenia pompami insulinowymi dzieci z cukrzycą*. [Online]. Protokół dostępu: http://www.wosp.org.pl/medycyna/pompy_insulinowe_cukrzyca [10 sierpnia 2011].
18. *Report of a WHO/IDF Consultation, Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia*, Geneva 2006.
19. Sieradzki J., *Cukrzyca – Kompendium*, Via Medica, Gdańsk 2009.
20. *Supplement 1. ADA Clinical Practice Recommendations 2000*, “Diabetes Care” 23 (suppl.).
21. *System Ciągłego Monitorowania Glikemii – Guardian®*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.pompy-medtronic.pl/informacje-o-produktac/system-ciaglego-monitorowania-glikemii---guardian/index.html> [9 sierpnia 2011].
22. *Światowy Dzień Cukrzycy*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.pompy-medtronic.pl/dla-was/swiatowy-dzien-cukrzycy.html> [10 sierpnia 2011].
23. Tatoń J., Czech A., Bernas M., *Diabetologia kliniczna*, PZWL, Warszawa 2008.
24. *Terapia z użyciem pompy insulinowej*. [Online]. Protokół dostępu: www.accu-chek.pl/zrozumieccukrzyce/terapiainsulinowej.html [10 sierpnia 2011].
25. *The History of Diabetes*. [Online]. Protokół dostępu: www.diabeteshealth.com/read/2008/12/17/715/the-history-of-diabetes/ [10 sierpnia 2011].
26. Updike S.J., Hicks G.P., *The enzyme electrode*, “Nature” 1967, 214.

Bartłomiej Matejko, e-mail: b.matejko@yahoo.com

MAGDALENA SADYŚ, DOROTA MYSZKOWSKA, MATTHEW SMITH

(UNIVERSITY OF WORCESTER, MEDICAL UNIVERSITY OF VIENNA¹)

CHARAKTERYSTYKA BADAŃ AEROMYKOLOGICZNYCH
I WSTĘPNY OPIS BADAŃ PROWADZONYCH
W WORCESTER W WIELKIEJ BRYTANII
W RAMACH WSPÓŁPRACY WIELOOŚRODKOWEJ

WPROWADZENIE

W dzisiejszych czasach wiele uwagi poświęca się jakości powietrza, którym oddychamy na co dzień. Większość raportów dotyczących stanu środowiska naturalnego ograniczona jest jednak do wykazania skażenia chemicznego, w ramach którego mierzony jest poziom m.in. tlenków węgla, siarki, azotu. Równie niebezpieczne dla naszego zdrowia jest zanieczyszczenie biologiczne, które wywołuje między innymi choroby układu oddechowego. Za głównych sprawców astmy, alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa i nadwrażliwości płuc uznaje się alergenne ziarna pyłku oraz alergenne zarodniki grzybów. Nauką zajmującą się biologicznymi cząstkami materii występującymi w powietrzu jest aerobiologia (niekiedy dzielona na aeropalinologię oraz aeromikologię)². Przedmiotem badań aerobiologii jest nie tylko określenie źródła pochodzenia poszczególnych cząstek materii, ale również wszystkich procesów, którym podlegają, czyli uwalnianie do atmosfery, dyspersja i sedymentacja³.

¹ University of Worcester, National Pollen and Aerobiology Research Unit; Medical University of Vienna, Department of Oto-Rhino-Laryngology.

² S.N. Agashe, E. Caulton, *Pollen and spores. Applications with special emphasis on aerobiology and allergy*, Enfield 2009, s. 168.

³ J. Lacey, *Whither Aerobiology?*, [w] *Recent trends in aerobiology, allergy and immunology*, ed. S.N. Agashe, Oxford 1994, s. 31-42.

Zarodniki grzybów są produkowane w wyniku rozmnażania płciowego i/lub bezpłciowego celem kolonizacji środowiska⁴. Ponad 80 rodzajów zarodników grzybów wywołuje choroby układu oddechowego, m.in. alergiczny nieżyt nosa czy astmę⁵, które nie tylko znacząco obniżają jakość życia, ale również skutkują stratami ekonomicznymi (zmniejszona wydajność pracy uczulonych pracowników, wydłużony okres chorobowy)⁶. Oszacowano, że od 20 do 30% osób cierpiących na astmę oraz aż do 6% całej populacji ludzkiej wykazuje wrażliwość na alergeny grzybów⁷. Prognozowanie koncentracji zarodników grzybów w powietrzu odgrywa kluczową rolę przy ustaleniu okresu leczenia profilaktycznego oraz utrzymaniu zastosowanego leczenia. Dzięki prognozowaniu stężeń alergenów możliwe jest również planowanie zajęć w taki sposób, aby uniknąć bezpośredniej ekspozycji na podwyższone stężenia zarodników grzybów w powietrzu.

MONITORING AEROMIKOLOGICZNY

W początkowych etapach rozwoju aerobiologii stosowano metodę hodowli na różnych podłożach, aby dowiedzieć się, jakiego rodzaju grzyby występują w powietrzu oraz w jakich stężeniach. Metoda ta posiadała wiele wad; wyłącznie żywe zarodniki grzybów zdolne są wykiełkować na pożywce, chociaż martwe zarodniki również posiadają szkodliwe alergeny, tym samym otrzymane wyniki są znacznie zaniżone. Niektóre grzyby rosną szybciej, inne wolniej i przez to ich obecność może zostać zamaskowana. Kolejnymi wadami są: selektywność danej pożywki, niemożliwość określenia koncentracji zarodników grzybów w 1 m³ powietrza, faworyzacja cięższych zarodników grzybów, które znacznie szybciej sedymentują⁸.

Obecnie powszechnie wykorzystuje się urządzenie pomiarowe skonstruowane przez Hirsta w 1952 r. (Rys. 1)⁹. Pułapka, którą można umieścić na środku pola uprawnego lub na dachu budynku, działa w taki sposób, że cząstki materii są zasysane wraz z powietrzem z prędkością 10 l na minutę i osadzają się na taśmie pokrytej lepką substancją (najczęściej silikonem lub mieszaniną wazeliny z woskiem). Taśma przymocowana jest do bębna, który porusza się z prędkością

⁴ B. Simon-Nobbe, U. Denk et al., *The spectrum of fungal allergy*, "International Archives of Allergy and Immunobiology" 2008, nr 145, s. 58-86.

⁵ W.E. Horner, A. Helbling et al., *Fungal allergens*, "Clinical Microbiology Reviews" 1995, nr 8, s. 161-179.

⁶ J. Bousquet, P. van Cauwenberge et al., *Allergic rhinitis and its impact on asthma*, "Journal of Allergy and Clinical Immunology" 2001, nr 108, s. S147-S334.

⁷ V.P. Kurup, H.-D. Shen et al., *Respiratory fungal allergy*, "Microbes and Infection" 2000, nr 2, s. 1101-1110.

⁸ P.H. Gregory, *The microbiology of the atmosphere*, London 1961, s. 92.

⁹ J.M. Hirst, *An automatic volumetric spore trap*, "Annals of Applied Biology" 1952, nr 39, s. 257-265.

2 mm na godzinę i podlega wymianie raz w tygodniu o tej samej porze. Taśmę należy następnie pociąć na odcinki odpowiadające 24-godzinny okresom oraz wybarwić na szkiełku mikroskopowym¹⁰.



Rys. 1. Pułapka Hirsta
(Fot. M. Sadyś)

Kolejnym etapem jest liczenie poszczególnych zarodników grzybów przy użyciu mikroskopu świetlnego; najczęściej stosowanym powiększeniem jest 10x40. Zarodniki mogą być liczone wzdłuż jednego poziomego centralnego pasa, wzdłuż 12 pasów pionowych lub z określonej liczby pól wybranych losowo. Pierwsza metoda pozwala na uzyskanie wyników godzinnych i dobowych, druga dwugodzinnych i dobowych, natomiast trzecia wyłącznie dobowych. Otrzymaną liczbę zarodników grzybów należy przemnożyć przez czynnik korekcyjny (który zależy od rodzaju stosowanego powiększenia, szerokości pola widzenia pod danym powiększeniem oraz powierzchni badanego preparatu mikroskopowego); stężenie zarodników grzybów wyraża się jako liczbę zarodników grzybów w 1 m³ powietrza.

Identyfikacja niektórych taksonów bywa czasem kłopotliwa, ponieważ różnice pomiędzy poszczególnymi rodzajami są niezbyt wyraźne, np. pomiędzy *Alternaria* spp. a *Drechslera* spp. czy *Alternaria* spp. a *Ulocladium* spp., toteż niezbędne jest doświadczenie oraz precyzja przy identyfikowaniu poszczególnych rodzajów grzybów.

¹⁰ E. Caulton, M. Lacey et al., *Airborne Pollens and Spores: A guide to Trapping and Counting*, Harpenden 1995, s. 1-60.

FORMY PROGNOZOWANIA STĘŻENIA ZARODNIKÓW GRZYBÓW

Kalendarz zarodnikowy jest najprostszą formą prognozy i przedstawia stężenie alergennych zarodników grzybów w powietrzu w poszczególnych miesiącach. Może zostać skonstruowany już po upływie jednego roku badań. Zebranie danych przez dłuższy okres czasu, np. przez 10, 20 lat, umożliwi wyliczenie średnich stężeń koncentracji zarodników grzybów w powietrzu, a tym samym uniknięcie błędnych wniosków, jeśli dany rok był wyjątkowo ciepły bądź mokry. Kalendarz może być wykorzystany wyłącznie na potrzeby lokalne. Monitoring aeromikologiczny oraz konstrukcję kalendarza zarodnikowego zaleca się szczególnie w przypadku obszarów gęsto zaludnionych.

Bardziej zaawansowaną formą prognozy są modele matematyczne, które obligują badacza do prowadzenia obserwacji przez kilka lat. Do analizy danych stosuje się różnorodne metody statystyczne, jak np. analizę szeregów czasowych czy sztuczne drzewa neuronowe. Umożliwiają one nie tylko wykrycie zależności pomiędzy stężeniem zarodników grzybów w powietrzu a czynnikami meteorologicznymi, ale również po dodaniu samych wartości parametrów meteorologicznych do modelu pozwalają prognozować stężenia alergenów dla kilku najbliższych dni.

CHARAKTERYSTYKA BADAŃ PROWADZONYCH W WORCESTER

Kalendarze zarodnikowe wizualnie przedstawiają sezonowe wariacje stężeń zarodników grzybów w powietrzu oraz są uznawane za najprostszą formę prognozy. Dotychczas w Wielkiej Brytanii opracowano kalendarze zarodnikowe dla Cardiff¹¹, Derby¹² oraz Worcester¹³, a w Polsce dla Krakowa¹⁴ i Rzeszowa¹⁵. Kalendarz dla Worcester został przygotowany na podstawie danych zebranych w 2005 roku i wymaga dalszego opracowania. Projekt badawczy zatytułowany *Rozwój modeli prognostycznych do przewidywania stężeń alergennych zarodników grzybów (Alternaria spp., Cladosporium spp., Ganoderma spp. i Didymella spp.) dla Worcester w Wielkiej Brytanii* został oficjalnie rozpoczęty we wrześniu

¹¹ M. Richards, *Seasonal periodicity in atmospheric mould spore concentrations*, "Acta Allergologica" 1954, nr 7, s. 357-366; H.A. Hyde, *Atmospheric pollen and spores in relation to allergy*, "Clinical Allergy" 1972, nr 2, s. 153-179.

¹² *Spore calendar*. [Online]. Protokół dostępu: http://www.maara.org/index.php?page=spores_calendar, Derby [2 marca 2011]

¹³ I. Bustos Delgado, B. Adams-Groom et al., *A fungal spore calendar Worcester, West Midlands, UK*, [w:] 8th International Congress on Aerobiology, Neuchâtel 2006, s. 210.

¹⁴ D. Stępańska, *Koncentracje zarodników wybranych taksonów grzybów w powietrzu na tle elementów pogodowych w Krakowie w latach 1997-1999*, Praca doktorska, Archiwum Instytutu Botaniki UJ, Kraków 2004, s. 1-145.

¹⁵ I. Kasprzyk, B. Rzepowska et al., *Fungal spores in the atmosphere of Rzeszów (South-East Poland)*, "Annals of Agricultural and Environmental Medicine" 2004, nr 11, s. 285-289.

2010 r. na Uniwersytecie w Worcester i cały czas trwa analiza preparatów mikroskopowych. Informacja dotycząca fluktuacji stężeń dobowych wspomnianych powyżej alergennych zarodników grzybów odgrywa kluczową rolę w przypadku osób cierpiących na astmę, które pragną uniknąć ekspozycji w ściśle określonych godzinach.

Alternaria spp. (Rys. 2.) i *Cladosporium* spp. (Rys. 3.) są uznawane za najbardziej alergenne rodzaje grzybów¹⁶, które łącznie mogą stanowić aż do 93% całkowitej liczby zarodników grzybów w powietrzu¹⁷. Zarodniki *Ganoderma* spp. (Rys. 4.) oraz *Didymella* spp. (Rys. 5.) są równie często monitorowane w niektórych miejscach z powodu wysokiej koncentracji w powietrzu oraz szkodliwych właściwości¹⁸. Wybrane grzyby wymagają odmiennych warunków pogodowych, podczas których uwalniane są zarodniki, stąd też mogą one zostać zaklasyfikowane jako „suche” (*Alternaria* spp. i *Cladosporium* spp.) oraz „mokre” (*Ganoderma* spp. i *Didymella* spp.). Pojęcia „suche zarodniki” oraz „mokre zarodniki” są umowne, chociaż powszechnie stosowane.

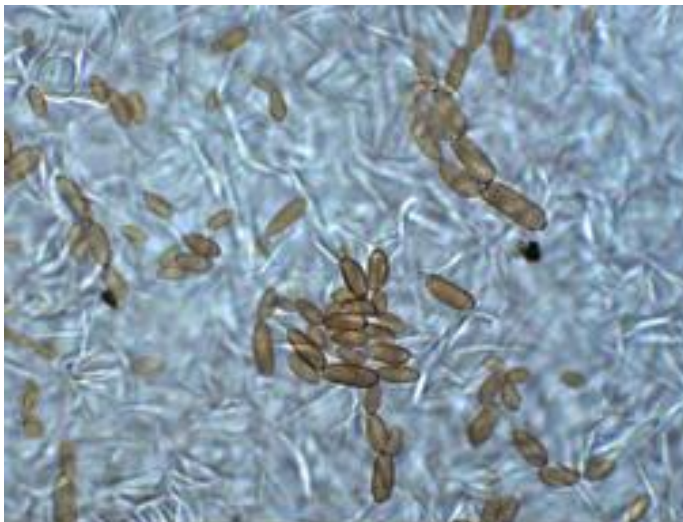


Rys. 2. Alergenne zarodniki grzybów *Alternaria* spp. (powiększenie 400x)
(Fot. M. Sadyś)

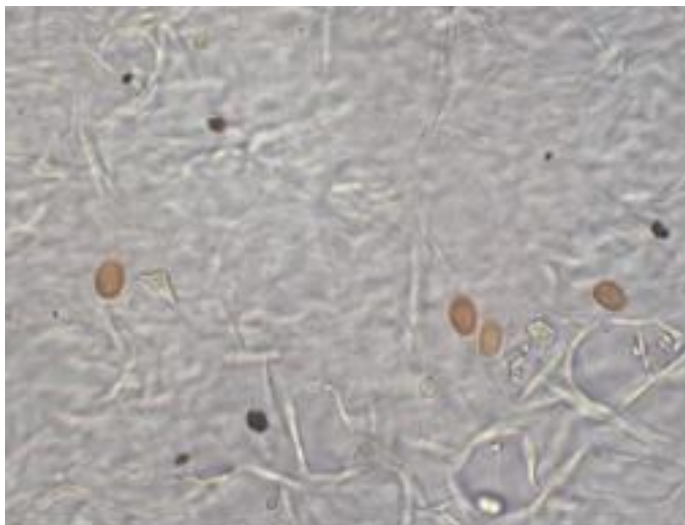
¹⁶ J. Lacey, *Fungi and Actinomycetes as Allergens*, [w:] *Allergy and Allergic Diseases*, ed. A.B. Kay, Oxford 1997, s. 858–886.

¹⁷ E. Ataygul, S. Celenk et al., *Allergenic fungal spore concentrations in the atmosphere of Bursa, Turkey*, “Journal of Biological & Environmental Sciences” 2007, nr 1 (2), s. 73-79.

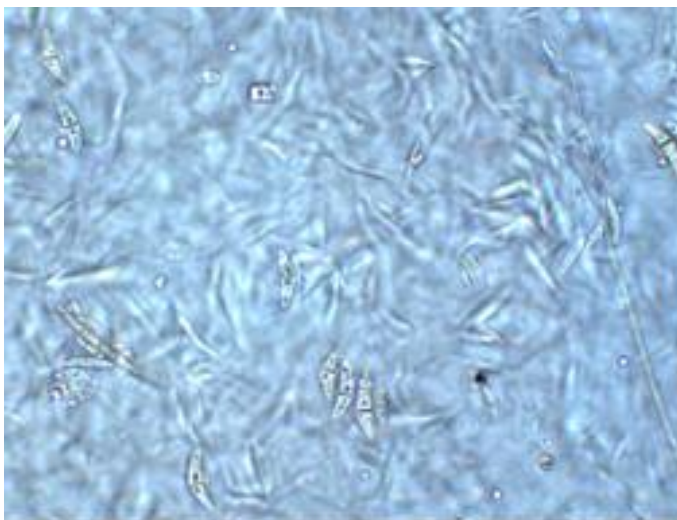
¹⁸ S.M. Tarlo, B. Bell et al., *Human sensitization to Ganoderma antigen*, “Journal of Allergy and Clinical Immunology” 1979, nr 64, s. 43-49; J.M. Corden and W.M. Millington, *Didymella ascospores in Derby*, “Grana” 1994, nr 33, s. 104-107.



Rys. 3. Alergenne zarodniki grzybów *Cladosporium* spp. (powiększenie 400x)
(Fot. M. Sadyś)



Rys. 4. Alergenne zarodniki grzybów *Ganoderma* spp. (powiększenie 400x)
(Fot. M. Sadyś)



Rys. 5. Alergenne zarodniki grzybów *Didymella* spp. (powiększenie 400x)
(Fot. M. Sadyś)

Informacja dotycząca fluktuacji stężeń dobowych wspomnianych powyżej alergennych zarodników grzybów pozwala zrozumieć, jakie czynniki mają wpływ na liczbę zarodników grzybów w powietrzu, i tym samym wesprzeć konstrukcję modeli prognostycznych. Jak dotąd tylko jedno badanie o takim charakterze zostało przeprowadzone w Wielkiej Brytanii, chociaż było ono ograniczone wyłącznie do *Alternaria* spp. i szczegółowa analiza wartości dobowych czynników meteorologicznych nie została uwzględniona¹⁹. Stąd też niezwykle istotne jest poszerzenie badań o inne rodzaje alergennych zarodników grzybów, jak również o szczegółową analizę czynników meteorologicznych, które wywierają wpływ na wysokość stężeń zarodników grzybów.

Pewna liczba matematycznych modeli prognostycznych została skonstruowana dla alergennych zarodników grzybów na świecie; cztery modele stworzono dla *Alternaria* spp.²⁰, trzy modele dla *Cladosporium* spp.²¹, jeden dla *Ga-*

¹⁹ Eaedem, *The long-term trends and seasonal variation of the aeroallergen Alternaria in Derby, UK*, "Aerobiologia" 2001, nr 17, s. 127-136.

²⁰ A. Damialis and D. Gioulekas, *Airborne allergenic fungal spores and meteorological factors in Greece: forecasting possibilities*, "Grana" 2006, nr 45, s. 122-129; A. Grinn-Gofroń, A. Strzelczak, *Artificial neural network models of relationships between Alternaria spores and meteorological factors in Szczecin (Poland)*, "International Journal of Biometeorology" 2008a, nr 52, s. 859-868; C. de Linares, J. Belmonte et al., *Dispersal patterns of Alternaria conidia in Spain*, "Agricultural and Forest Meteorology" 2004, nr 150, s. 1491-1500; O. Escuredo, M.C. Seijo et al., *Effects of meteorological factors on the levels of Alternaria spores on a potato crop*, "International Journal of Biometeorology" 2011, nr 55, s. 243-252.

noderma spp.²², a dla *Didymella* spp. jak dotąd nie sporządzono żadnego modelu. Większość badań nad stężeniem zarodników grzybów zawężona jest do analizy danych z jednego punktu pomiarowego, rzadziej oparte są one na porównaniu stężeń zarodników grzybów z kilku miejsc pomiarowych, lecz usytuowanych w obrębie tego samego regionu²³. Do dnia dzisiejszego miały miejsce tylko dwa badania, w których porównano koncentracje zarodników *Alternaria* spp. i *Didymella* spp. na szczeblu międzynarodowym²⁴. Zgodnie z wiedzą autorów przeprowadzone zostało tylko jedno badanie, gdzie stężenie zarodników grzybów zestawiono ze stężeniem alergenów grzybów w powietrzu²⁵. Jednakże stężenie zarodników grzybów zmierzono za pomocą metody hodowli na podłożach, która nie wykazuje właściwego poziomu zanieczyszczenia powietrza, ponieważ nie wszystkie rodzaje grzybów są zdolne rozwinąć się na wybranych pożywkach. Ponadto nie tylko żywe zarodniki zawierają szkodliwe dla ludzi alergeny.

CELE PRACY

Głównym celem pracy jest rozwój modeli prognostycznych do przewidywania stężeń alergennych zarodników grzybów (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Ganoderma* spp. i *Didymella* spp.) dla Worcester w Wielkiej Brytanii, który jest możliwy do osiągnięcia dzięki danym o stężeniach alergennych zarodników grzybów pochodzącym z kilku miejsc pomiarowych w Anglii i Polsce oraz dzięki realizacji następujących pomniejszych celów:

²¹ A. Damialis and D. Gioulekas, op. cit., s. 122-129; E. Stephen, A.E. Raftery et al., *Forecasting spore concentrations: a time series approach*, "International Journal of Biometeorology" 1990, nr 34, s. 87-89; A. Grinn-Gofroń, A. Strzelczak, *Artificial neural network models of relationships between Cladosporium spores and meteorological factors in Szczecin (Poland)*, "Grana" 2008b, nr 47, s. 305-315.

²² Eaedem, *The effects of meteorological factors on the occurrence of Ganoderma sp. spores in the air*, "International Journal of Biometeorology" 2011, nr 55, s. 235-241.

²³ T. Mitakakis, E.K. Ong et al., *Incidence of Cladosporium, Alternaria and total fungal spores in the atmosphere of Melbourne (Australia) over three years*, "Aerobiologia" 1997, nr 13, s. 83-90; F. Infante, F. Alba et al., *A comparative study of the incidence of Alternaria conidia in the atmosphere of five Spanish cities*, "Polen" 1999, nr 10, s. 5-13.

²⁴ J.M. Corden, D. Stępańska et al., *Seasonal variation in Alternaria spore concentrations in three European cities, Derby, UK, Cracow and Poznan in Poland (1995-2002)*, [w:] 3rd Symposium on Aerobiology, Worcester 2003, s. 19; J.M. Corden and D. Stępańska, *Alternaria and Didymella spore concentrations in Derby UK and Cracow Poland – can these fungal spores concentration have a role in thunderstorm asthma*, [w:] 8th International Congress on Aerobiology, Neuchâtel 2006, s. 102.

²⁵ B. Flückiger, T. Koller et al., *Comparison of airborne spore concentrations and fungal allergen content*, "Aerobiologia" 2000, nr 16, s. 393-396.

1. analiza dobowych, dziennych oraz sezonowych wariacji stężeń alergenowych zarodników grzybów w odniesieniu do czynników meteorologicznych; uzyskane informacje stanowić będą podstawę konstrukcji modeli prognostycznych;
2. aktualizacja kalendarza zarodnikowego dla Worcester, który został zapoczątkowany w 2005 r.²⁶;
3. porównanie wyników stężeń alergenowych zarodników grzybów oraz czynników meteorologicznych otrzymanych z Krakowa, Poznania i Szczecina celem przeprowadzenia analizy wariacji przestrzennych w koncentracji zarodników grzybów;
4. konstrukcja modeli prognostycznych z wyprzedzeniem do pięciu dni dla każdego z analizowanych taksonów (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Ganoderma* spp. i *Didymella* spp.). Jeśli podobieństwa w dystrybucji stężeń zarodników grzybów zostaną odnalezione, podjęta będzie próba konstrukcji modeli dla grup taksonów (tj. „suchych” oraz „mokrych” zarodników grzybów);
5. analiza związku zależności pomiędzy stężeniem zarodników *Alternaria* spp. oraz *Cladosporium* spp. w powietrzu a stężeniem alergenów grzybowych w powietrzu celem ustalenia, czy koncentracja alergenów odpowiada liczbie zarodników w powietrzu.

CHARAKTERYSTYKA STOSOWANYCH METOD BADAWCZYCH

Uniwersytet w Worcester był jednym z miejsc monitoringowych w ramach europejskiego projektu badawczego HIALINE, którego głównym zadaniem był pomiar trzech najważniejszych alergenów roślinnych (Bet v 1, Phl p 5 oraz Ole e 1). Filtry zawierające alergeny zostały zebrane w latach 2009-2011 (od marca do sierpnia). Metodyka badań zobowiązywała uczestników projektu do przechowywania kilku kopii zapasowych każdej próbki. Instytut jest w posiadaniu przeciwciał dla dwóch taksonów: *Alternaria* spp. oraz *Cladosporium* spp., stąd istnieje możliwość poddania zapasowych próbek dodatkowej analizie. „Kanapkowy” typ ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) zostanie zastosowany zgodnie z zaleceniami ustalonymi dla projektu HIALINE, chociaż metoda wymagać będzie odpowiedniej walidacji.

Monitoring alergenowych zarodników grzybów prowadzony jest jednocześnie w Worcester (od 2005 r.), Krakowie (od 1991 r.), Poznaniu (od 2000 r.) oraz Szczecinie (od 2004 r.) przy użyciu pułapki Hirsta przymocowanej do dachu budynków uniwersyteckich. Wszystkie ośrodki naukowe prowadzą równocześnie pomiar czynników meteorologicznych. Preparaty mikroskopowe ze wszystkich miejsc pomiarowych są już zebrane i stężenia zarodników grzybów są zna-

²⁶ I. Bustos Delgado, B. Adams-Groom et al., op. cit., s. 210.

ne, z wyjątkiem Worcester, gdzie dostępne są wyłącznie dane z 2005 r. Pozostałe preparaty mikroskopowe z lat 2006-2010 wymagają przeliczenia przy użyciu mikroskopu świetlnego. Na potrzeby niniejszych badań stosuje się powiększenie 10x40. Zarodniki 21 rodzajów grzybów liczy się wzdłuż jednego centralnego pasa, osobno dla każdej godziny²⁷. Zależności pomiędzy stężeniem zarodników grzybów a czynnikami meteorologicznymi zostaną przeanalizowane za pomocą takich technik, jak korelacje czy analizy składowych głównych. Wyniki stanowiąc będą podstawę teoretyczną, na bazie której zostaną opracowane modele prognostyczne. Modele prognostyczne zostaną skonstruowane przy użyciu różnorodnych metod: analizy regresyjnej²⁸, analizy szeregów czasowych (np. model autoregresyjny ze średnią krocząca oraz model autoregresyjny skalkowany ze średnią ruchomą krocząca)²⁹, techniki inteligencji obliczeniowej, jak na przykład sztuczne sieci neuronowe³⁰. Zastaną również przetestowane inne metody, które czasami są wykorzystywane w rolnictwie, tj. modele sporulacji³¹, model dni korzystnych (P-Days), model kumulacyjny niekorzystnych dni (DD), model wilgotności względnej wraz z przerwanyimi okresami opadów (IWP)³². Otrzymane wyniki zostaną poddane ocenie, tzn. modele, które wykazą się najwyższą sprawdzalnością, zostaną wykorzystane do prognozowania stężeń alergennych zarodników grzybów w przyszłości przez National Pollen and Aerobiology Research Unit w Worcester.

PODSUMOWANIE

Jak dotąd żaden model matematyczny nie został sporządzony do prognozowania stężeń alergennych zarodników *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Ganoderma* spp. i *Didymella* spp. w Wielkiej Brytanii. Niniejszy projekt podejmuje próbę rozwinięcia tego typu modeli celem uzupełnienia luki w badaniach

²⁷ D. Stępańska, J. Wołek, *The estimation of fungal spore concentrations using two counting methods*, "Acta Agrobotanica" 2009, nr 62, s. 117-123.

²⁸ M. Hjelmroos, *Relationship between airborne fungal spore presence and weather variables*, "Grana" 1993, nr 32, s. 40-47.

²⁹ O. Escuredo, M.C. Seijo et al., op. cit., s. 243-252; E. Stephen, A.E. Raftery, op. cit., s. 122-129; F.J. Rodríguez-Rajo, V. Jato et al., *The use of aerobiological methods for forecasting Botrytis spore concentrations in a vineyard*, "Grana" 2010, nr 49, s. 56-65.

³⁰ A. Grinn-Gofroń, A. Strzelczak, *Hourly predictive artificial neural network and multivariate regression tree models of Alternaria and Cladosporium spore concentrations in Szczecin*, "International Journal of Biometeorology" 2009, nr 53, s. 555-562.

³¹ T. Gilles, K. Phelps et al., *Development of MILIONCAST, an improved model for predicting downy mildew sporulation on onions*, "Plant disease" 2004, nr 88, s. 695-702; J.P. Clarkson, R. Kennedy et al., *The effect of temperature and water potential on the production of conidia by sclerotia of Botrytis squamosa*, "Plant Pathology" 2000, nr 49, s. 119-128.

³² I. Iglesias, F.J. Rodríguez-Rajo et al., *Evaluation of the different Alternaria prediction models on a potato crop in A Limia (NW of Spain)*, "Aerobiologia" 2007, nr 23, s. 27-34.

aeromikologicznych. Dzięki uprzejmości członków Polskiej Sekcji Aerobiologicznej European Aeroallergen Network podpisano umowy pomiędzy ośrodkiem w Worcester a Uniwersytetem Jagiellońskim, Uniwersytetem im. A. Mickiewicza oraz Uniwersytetem Szczecińskim. Nawiązana współpraca umożliwia również opracowanie międzynarodowych modeli prognostycznych dla wspomnianych taksonów grzybów, dzięki czemu powinny one cechować się wyższą stabilnością ze względu na zwiększoną liczbę rekordów oraz różnice klimatyczno-geograficzne stacji monitoringowych, co być może pozwoli na ich zastosowanie w obu krajach. Projekt przewiduje dodatkowo porównanie stężeń zarodników grzybów w powietrzu zmierzonych za pomocą metody wolumetrycznej z alergenami pochodzącymi z tychże zarodników, co jak dotąd nie zostało jeszcze zbadane w Wielkiej Brytanii.

Wspomniane cele decydują o nowatorskim charakterze projektu i wedle zamierzenia mają poszerzyć wiedzę z dziedziny aeromikologii, co będzie stanowić istotny wkład w monitoring europejski.

ABSTRACT

The aim of this article is to inform about aerobiological research which has been commenced in co-operation between the University of Worcester, Jagiellonian University, Adam Mickiewicz University and the University of Szczecin. Occurrence of four allergenic fungal spores in the air will be studied, i.e. *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Ganoderma* spp. and *Didymella* spp. in relation to meteorological factors. Diurnal, daily and spatial variations of the fungal spore concentration will be compared between spore monitoring sites to produce forecast models for selected fungi. Forecasts play an important role in the timing of prophylactic medication and in maintaining compliance in treatments. They also help allergic people to plan their activities in order to avoid exposure to high atmospheric concentrations of fungal spores.

BIBLIOGRAFIA

1. Agashe S.N., Caulton E., *Pollen and spores. Applications with special emphasis on aerobiology and allergy*, Enfield 2009.
2. Ataygul E., Celenk S., Canitez Y., Bicakci A., Malyer H., Sapan N., *Allergenic fungal spore concentrations in the atmosphere of Bursa, Turkey*, "Journal of Biological & Environmental Sciences" 2007, nr 1 (2).
3. Bousquet J., van Cauwenberge P., Khaltaev N., Aria Workshop Group and World Health Organisation, *Allergic rhinitis and its impact on asthma*, "Journal of Allergy and Clinical Immunology" 2001, nr 108.
4. Bustos Delgado I., Adams-Groom B., Emberlin J., *A fungal spore calendar Worcester, West Midlands, UK*, [w:] 8th International Congress on Aerobiology, Neuchâtel 2006.
5. Caulton E., Lacey M., Allitt U., Crosby R., Emberlin J., Hirst J., *Airborne Pollens and Spores: A guide to Trapping and Counting*, Harpenden 1995.

6. Clarkson J.P., Kennedy R., Phelps K., *The effect of temperature and water potential on the production of conidia by sclerotia of Botrytis squamosa*, "Plant Pathology" 2000, nr 49.
7. Corden J.M., Millington W.M., *Didymella ascospores in Derby*, "Grana" 1994, nr 33.
8. Corden J.M., Millington W.M., *The long-term trends and seasonal variation of the aero-allergen Alternaria in Derby, UK*, "Aerobiologia" 2001, nr 17.
9. Corden J.M., Stępańska D., *Alternaria and Didymella spore concentrations in Derby UK and Cracow Poland – can these fungal spores concentration have a role in thunderstorm asthma*, [w:] 8th International Congress on Aerobiology, Neuchâtel 2006.
10. Corden J.M., Stępańska D., Stach A., Millington W.M., Jackson F.A., Myszkowska D., Józefiak M., *Seasonal variation in Alternaria spore concentrations in three European cities, Derby, UK, Cracow and Poznan in Poland (1995-2002)*, [w:] 3rd Symposium on Aerobiology, Worcester 2003.
11. Damialis A., Gioulekas D., *Airborne allergenic fungal spores and meteorological factors in Greece: forecasting possibilities*, "Grana" 2006, nr 45.
12. de Linares C., Belmonte J., Canela M., de la Guardia C.D., Alba-Sanchez F., Sabariego S., Alonso-Pérez S., *Dispersal patterns of Alternaria conidia in Spain*, "Agricultural and Forest Meteorology" 2004, nr 150.
13. Escuredo O., Seijo M.C., Fernández-González M., Iglesias I., *Effects of meteorological factors on the levels of Alternaria spores on a potato crop*, "International Journal of Biometeorology" 2011, nr 55.
14. Flückiger B., Koller T. et al., *Comparison of airborne spore concentrations and fungal allergen content*, "Aerobiologia" 2000, nr 16.
15. Gilles T., Phelps K., Clarkson J.P., Kennedy R., *Development of MILIONCAST, an improved model for predicting downy mildew sporulation on onions*, "Plant disease" 2004, nr 88, s. 695-702.
16. Gregory P.H., *The microbiology of the atmosphere*, London 1961.
17. Grinn-Gofroń A., Strzelczak A., *Artificial neural network models of relationships between Alternaria spores and meteorological factors in Szczecin (Poland)*, "International Journal of Biometeorology" 2008a, nr 52.
18. Grinn-Gofroń A., Strzelczak A., *Artificial neural network models of relationships between Cladosporium spores and meteorological factors in Szczecin (Poland)*, "Grana" 2008b, nr 47.
19. Grinn-Gofroń A., Strzelczak A., *Hourly predictive artificial neural network and multivariate regression tree models of Alternaria and Cladosporium spore concentrations in Szczecin*, "International Journal of Biometeorology" 2009, nr 53.
20. Grinn-Gofroń A., Strzelczak A., *The effects of meteorological factors on the occurrence of Ganoderma sp. spores in the air*, "International Journal of Biometeorology" 2011, nr 55.
21. Hirst J.M., *An automatic volumetric spore trap*, "Annals of Applied Biology" 1952, nr 39.
22. Hjelmroos M., *Relationship between airborne fungal spore presence and weather variables*, "Grana" 1993, nr 32.
23. Horner W.E., Helbling A., Salvaggio J.E., Lehrer S.B., *Fungal allergens*, "Clinical Microbiology Reviews" 1995, nr 8, s. 161-179.
24. Hyde H.A., *Atmospheric pollen and spores in relation to allergy*, "Clinical Allergy" 1972, nr 2.
25. Infante F., Alba F., Caño M., Castro A., Domínguez E., Méndez J., Vega A., *A comparative study of the incidence of Alternaria conidia in the atmosphere of five Spanish cities*, "Polen" 1999, nr 10.
26. Kasprzyk I., Rzepowska B., Wasylów M., *Fungal spores in the atmosphere of Rzeszów (South-East Poland)*, "Annals of Agricultural and Environmental Medicine" 2004, nr 11.
27. Kurup V.P., Shen H.-D., Banerjee B., *Respiratory fungal allergy*, "Microbes and Infection" 2000, nr 2.

28. Lacey J., *Fungi and Actinomycetes as Allergens*, [w:] *Allergy and Allergic Diseases*, ed. A.B. Kay, Oxford 1997.
29. Lacey J., *Whither Aerobiology?*, [w:] *Recent trends in aerobiology, allergy and immunology*, ed. S.N. Agashe, Oxford 1994.
30. Mitakakis T., Ong E.K., Stevens A., Guest D., Knox R.B., *Incidence of Cladosporium, Alternaria and total fungal spores in the atmosphere of Melbourne (Australia) over three years*, "Aerobiologia" 1997, nr 13.
31. Richards M., *Seasonal periodicity in atmospheric mould spore concentrations*, "Acta Allergologica" 1954, nr 7.
32. Rodríguez-Rajo F.J., Jato V., Fernández-González M., Aira M.J., *The use of aerobiological methods for forecasting Botrytis spore concentrations in a vineyard*, "Grana" 2010, nr 49.
33. Simon-Nobbe B., Denk U., Pöhl V., Rid R., Breitenbach M., *The spectrum of fungal allergy*, "International Archives of Allergy and Immunobiology" 2008, nr 145.
34. *Spore calendar*. [Online]. Protokół dostępu: http://www.maara.org/index.php?page=spores_calendar, Derby [2 marca 2011].
35. Stępalska D., *Koncentracje zarodników wybranych taksonów grzybów w powietrzu na tle elementów pogodowych w Krakowie w latach 1997-1999*, Praca doktorska, Archiwum Instytutu Botaniki UJ, Kraków 2004.
36. Stępalska D., Wołek J., *The estimation of fungal spore concentrations using two counting methods*, "Acta Agrobotanica" 2009, nr 62.
37. Stephen E., Raftery A.E. et al., *Forecasting spore concentrations: a time series approach*, "International Journal of Biometeorology" 1990, nr 34.
38. Tarlo S.M., Bell B., Srinivasan J., Dolovich J., Hargreave F.E., *Human sensitization to Ganoderma antigen*, "Journal of Allergy and Clinical Immunology" 1979, nr 64.

Magdalena Sadyś, e-mail: m.sadys@worc.ac.uk

MARIA GROLIK

(UNIwersytet Jagielloński)

INŻYNIERIA TKANKOWA – NOWE NARZĘDZIE W REKONSTRUKCJI TKANEK

WSTĘP

Inżynieria tkankowa (ang. *Tissue Engineering*, TE) jest dyscypliną naukową, która proponuje nowe, alternatywne rozwiązania, zmieniające sposób podejścia do leczenia przy pomocy przeszczepów oraz uzupełnień ubytków narządów lub tkanek.

Początki inżynierii tkankowej przypadają na lata osiemdziesiąte XX wieku. W 1993 chemik J. Langer oraz chirurg J.P. Vacanti zwrócili uwagę całego naukowego świata na potencjał oraz ogromne możliwości tej młodej dziedziny [3]. Za główny cel inżynierii tkankowej uważa się otrzymanie materiału biologicznego, dzięki któremu możliwe byłoby zastąpienie, przywrócenie lub podtrzymanie podstawowych funkcji uszkodzonych tkanek bądź całych narządów. Materiał ten powinien posiadać strukturę biochemiczną w pełni przypominającą tkankę naturalną, z jej niezwyklejmi właściwościami mechanicznymi [2, 13].

INŻYNIERIA TKANKOWA – PODSTAWOWE ZAGADNIENIA

Zakłada się, iż do prawidłowego, wydajnego przebiegu procesu regeneracji tkanki koniecznych jest kilka zależnych wzajemnie od siebie elementów. Zaliczamy do nich przede wszystkim rusztowanie (nośnik, podłoże), komórki hodowane w środowisku *in vitro* (poza organizmem), które integrują się z rusztowaniem, oraz różnego rodzaju czynniki wzrostu, hormony i witaminy występujące w specjalnie do tego przeznaczonych, dostępnych komercyjnie pożywkach

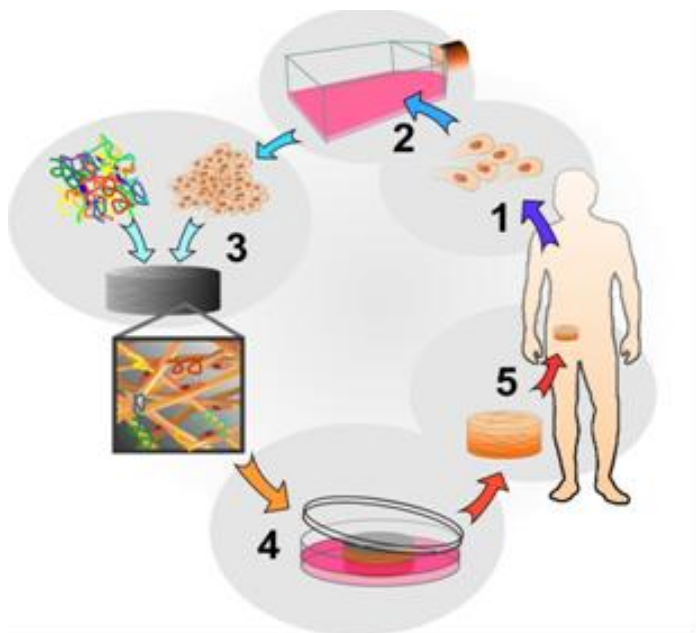
hodowlanych. Wykorzystanie przestrzennych struktur do hodowli komórek ułatwia uzyskanie tkanki o pożądanym kształcie oraz wielkości, ale także decyduje o prawidłowym funkcjonowaniu komórek [2, 3, 4, 5, 6].

FAZY INŻYNIERII TKANKOWEJ

Proces rekonstrukcji uszkodzonych tkanek (narządów) składa się z określonej sekwencji zdarzeń i przebiega etapowo. Początkowo z organizmu pacjenta bądź innego dawcy pobiera się fragment tkanki (biopsja). Pozyskany w ten sposób materiał poddaje się obróbce polegającej na uwolnieniu komórek z naturalnej macierzy otaczającej je w organizmie.

Następnie uzyskane komórki wysiewa się na rusztowaniach komórkowych (*in vitro*) symulujących natywną macierz łącznotkankową, dodając przy tym czynniki wzrostu, których głównym zadaniem jest przyspieszenie procesu proliferacji.

Rys. 1. Przebieg fazy inżynierii tkankowej [23]



Następnie tak przygotowany nośnik (wraz z wysianymi na nim komórkami) umieszczany jest w jałowej komorze bioreaktora, gdzie zachodzi proces namnażania komórek.

KOMÓRKI WYKORZYSTYWANE W INŻYNIERII TKANKOWEJ

W inżynierii tkankowej podstawą są komórki. Mogą one pochodzić z różnorodnych źródeł:

1. ksenogeniczne, pochodzące od obcego gatunku;
2. allogeniczne, przeszczep następuje w obrębie tego samego gatunku;
3. syngeniczne, jednorodne, pochodzące od osobników identycznych genetycznie;
4. autologiczne, przeszczep w obrębie tego samego ustroju [16].

Strategie stosowane w inżynierii tkankowej wykorzystują rusztowania komórkowe głównie do namnażania pojedynczych komórek oraz scalania ich w tkankę. Bardzo istotny z punktu widzenia regeneracji jest jednak fakt, że komórki wykazują zdolność do produkcji składników natywnej macierzy łącznotkankowej [2]. Najczęściej spotykanym rozwiązaniem jest wszczepienie w miejsce ubytku rusztowań komórkowych pokrytych nahodowanymi wcześniej na nich komórkami. Inną, zupełnie odmienną możliwością jest bazowanie na rusztowaniach w postaci naturalnej matrycy komórkowej, uzyskanej w wyniku usunięcia komórek z tkanki. Pozbawione komórek rusztowanie wszczepiane jest do organizmu, gdzie w wyniku reakcji organizmu zostaje zasiedlone przez komórki gospodarza. W przypadkach, w których komórki pochodzą z tego samego ustroju (autologiczne), nie obserwuje się odpowiedzi układu immunologicznego pacjenta [16].

RUSZTOWANIE KOMÓRKOWE

Kluczowym zadaniem rusztowania komórkowego (ang. *scaffold*) jest fizyczne stworzenie podłoża dla komórek i regulacja procesu proliferacji oraz różnicowania [6].

Jeśli komórkom nie dostarczy się naturalnego rusztowania komórkowego bądź jego substytutu, regeneracja jest praktycznie niemożliwa. Dlatego w przypadku niektórych urazów jedyną szansą na regenerację tkanki jest wprowadzenie sztucznej macierzy łącznotkankowej w miejsce uszkodzenia.

Za podstawowy parametr rusztowania komórkowego, decydujący o jego funkcji, przyjmuje się porowatość. Wielkość i ilość porów ma ogromny wpływ na przenikanie komórek do wnętrza implantu, co w konsekwencji wpływa korzystnie na regenerację uszkodzonej tkanki [6].

Prawidłowy przebieg odbudowy tkanki *in vitro* warunkowany jest nie tylko obecnością komórek i rusztowania, ale także sterujących procesami różnicowania komórek cytokin i czynników wzrostu [6].

Rusztowania komórkowe spełniają równocześnie wiele istotnych funkcji. Stanowią mechaniczną podporę dla komórek (tkanek), scalają je, wpływają na ich kształt, migrację oraz rozwój, a także kierują ich funkcjami poprzez oddziaływanie z receptorami na powierzchni komórek.

MATERIAŁY WYKORZYSTYWANE W INŻYNIERII TKANKOWEJ

Biomateriały wykorzystywane w inżynierii tkankowej w trakcie regeneracji uszkodzonej tkanki niejednokrotnie łączą się z nią trwale, dlatego też muszą one spełniać szereg ważnych kryteriów. Rusztowanie powinno odznaczać się biokompatybilnością (nie może powodować stanów pozapalnych, zmian nowotworowych ani mutagennych), bioresorbowalnością, odpowiednimi właściwościami wytrzymałościowymi (moduł sprężystości, wytrzymałość na ściskanie i rozciąganie, sztywność itp.). Powinno też pozytywnie oddziaływać z komórkami i tkankami, tzn. należy uwzględnić zwiększoną przyczepność komórek do materiału rusztowania (adhezja), wzrost, migrację oraz funkcje różnicowania się komórek. Materiały wykorzystywane w inżynierii tkankowej powinny charakteryzować się wysoką porowatością struktury oraz odpowiednią wielkością porów. Biomateriał winien posiadać także zdolność do biodegradacji (szybkość musi być ściśle dobrana do tworzenia się nowej struktury tkankowej), a produkty jego rozkładu nie powinny być toksyczne dla organizmu.

W zależności od potrzeby do otrzymywania rusztowań stosuje się metale, ceramikę (w tym hydroksyapatyty, bio szkła), materiały węglowe, kompozyty oraz coraz częściej polimery, zarówno naturalne, jak i syntetyczne [14].

W chwili obecnej żaden z dostępnych materiałów implantacyjnych nie posiada właściwości takich, jakie wykazuje naturalna tkanka. Jest to kompromis pomiędzy różnorodnymi kryteriami jakościowymi, którymi powinien charakteryzować się biomateriał. Nie udało się stworzyć materiału przeznaczonego „na całe życie”, materiału obojętnego, który nie wchodziłby w reakcję z tkankami. Implant to zawsze ciało obce dla ludzkiego ciała, najczęściej o ściśle określonym czasie działania, i dlatego po spełnieniu swojej funkcji powinien być usuwany z organizmu [6, 9, 10, 14].

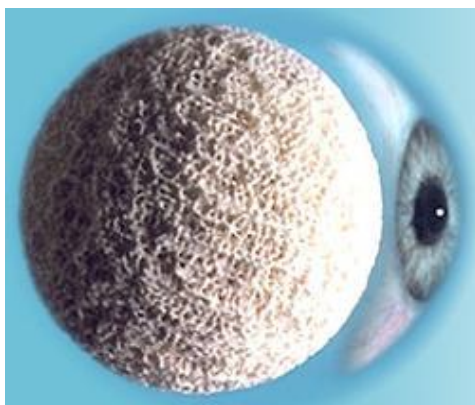
MATERIAŁY CERAMICZNE

Wśród materiałów implantacyjnych szczególne miejsce zajmują tworzywa oparte o fosforany wapnia (*ceramika hydroksyapatytowa HAp*, sól kompleksowa wapniowo-fosforowa). Nie wykazują one efektów prozapalnych ani mutagennych. Dzięki bioaktywności oraz wysokiej czystości chemicznej implanty ceramiczne mogą łączyć się bezpośrednio z tkanką (twardą lub miękką), przy tym odznaczają się również wysoką biogodnością. Dodatkowo, w zależności od po-

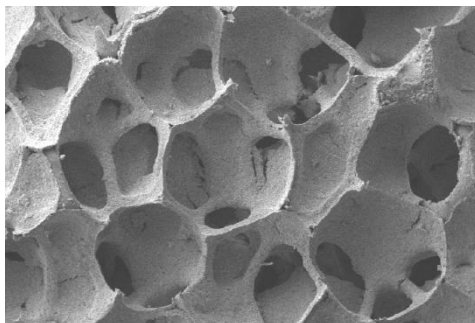
trzeby, istnieje możliwość utworzenia rusztowania komórkowego o różnym stopniu porowatości. Za wadę uznaje się niezadawalające parametry wytrzymałościowe i zawodność wykonanych rusztowań, co wpływa na zawężenie zakresu zastosowań HAp do miejsc, na które nie działają znaczne obciążenia mechaniczne [14].

Rys. 2. Przykłady (a) zastosowania ceramiki hydroksyapatytowej, (b) porowatej struktury hydroksyapatytu [23, 24]

(a)



(b)



MATERIAŁY POLIMEROWE

Materiały polimerowe w medycynie stosuje się już od ponad 50 lat. Wykorzystuje się je do wytwarzania produktów jednorazowego użytku oraz do wyrobów implantów. Ich znaczenie wzrasta z dnia na dzień w miarę pojawiania się nowych materiałów o unikatowych właściwościach fizykochemicznych oraz bio-

logicznych, pojmowanych szeroko jako zgodność komórkowa i zgodność z komponentami żywego organizmu. Polimery biomedyczne podzielono na dwie podstawowe grupy: polimery pochodzenia naturalnego (biopolimery) i polimery syntetyczne [14].

POLIMERY NATURALNE

Polimery występujące naturalnie w organizmach żywych i przez nie produkowane nazywamy biopolimerami. Do najpopularniejszych wykorzystywanych w medycynie zaliczamy białka oraz polisacharydy (wielocukry). Do najczęściej stosowanych w inżynierii tkankowej zaliczamy przede wszystkim chitozan, celulozę, kolagen i elastynę [14].

Chitozan to polisacharyd, substancja organiczna będąca pochodną chityny. W czystej postaci występuje jako składnik ścian komórkowych grzybów strzępkowych z klasy *Zygomycetes*, czyli popularnych „pleśni”. Na skalę przemysłową pozyskuje się go w procesie deacetylacji chityny – składnika budulcowego skorupiaków morskich. Chitozan uważany jest za polimer biodegradowalny, gdyż łatwo jest rozkładany na substancje pierwsze, z czym wiąże się nietoksyczność, bioaktywność i doskonała sorpcyjność (pochłanianie). Posiada on szereg przydatnych właściwości. Przykładowo, stosowanie opatrunków z chitozaniem przyspiesza zabliznianie trudno gojących się ran. Obniża on ciśnienie krwi i pomaga zwalczać arteriosklerozę (miażdżycę) – główną przyczynę nadciśnienia. Nazywany jest także biologicznie aktywną celulozą komórkową. Pod względem swoich właściwości podobny jest do ludzkiego włókna kolagenowego. Polimer ten stosowany jest także na szeroką skalę w produkcji otoczek na leki czy kosmetyków ze względu na jego właściwości ochronne [18, 19].

Kolagen i elastyna zaliczane są do białek strukturalnych. Kolagen odznacza się wysoką odpornością na rozciąganie oraz elastycznością, dzięki czemu stanowi podstawowy składnik ścięgien. To on odpowiedzialny jest za elastyczność skóry. Zaliczany do polimerów bioresorbowalnych, nierozpuszczalnych w wodzie, ulega denaturacji pod wpływem podwyższonej temperatury. Wykazuje znacznie mniejsze zróżnicowanie międzygatunkowe niż inne białka zwierzęce, cechując się ponadto stosunkowo niewielką immunogennością, dlatego też białko to znajduje szerokie zastosowanie w medycynie. Może być także skomponowany z innymi naturalnymi polimerami (np. chitozaniem), tworząc w ten sposób kompozytowe hydrożelowe rusztowanie komórkowe [7, 8].

Elastyna to białko tkanki łącznej. Nadaje sprężystość przede wszystkim skórze, więzadłom, tkance płucnej, ścianom naczyń krwionośnych. Dzięki niej tkanki po rozciągnięciu lub ściśnięciu odzyskują swój pierwotny kształt i wielkość. Polimer ten zaliczany jest do grupy polimerów inteligentnych (ang. *smart polymers*), wrażliwych na zmiany temperatury. Biomateriały na bazie elastyny

znajdują coraz szersze zastosowanie w inżynierii tkankowej. Wykorzystuje się je m.in. w przeszczepach naczyniowych, zastawkach serca lub do produkcji sztucznej skóry [7, 15, 20].

POLIMERY SYNTETYCZNE

Szczególną uwagę należy zwrócić na polimery bioresorbowalne, czyli takie, które degradują w środowisku biologicznym do nieszkodliwych produktów ubocznych. Produkty te występują naturalnie w organizmie jako produkty przemiany materii, a następnie są z organizmu wydalane. Obok nich stosuje się również polimery biodegradowalne. Materiały takie rozkładają się na produkty, które niekoniecznie występują naturalnie w organizmie, jednakże są one dla niego nieszkodliwe. Degradacja polimerów powinna być procesem kontrolowanym. Zbyt szybki rozkład może powodować nie tylko przedwczesną utratę właściwości mechanicznych, ale także uwalnianie w zbyt krótkim czasie znacznej ilości produktu degradacji, przekraczającej zdolność organizmu do jego wydalania. Do najczęściej stosowanych polimerów bioresorbowalnych zaliczamy: poliglikolid, polilaktydy, kopolimery glikolidu z laktydami [14].

Poliglikolid (poli(kwas glikolowy), PGA) jest polimerem bioresorbowalnym wykorzystywanym we współczesnej chirurgii do wyrobu implantów o dobrych właściwościach mechanicznych (śruby chirurgiczne, płytki, siatki i folie opatrunkowe). Czas degradacji takich wszczepów jest dobierany tak, aby po zrośnięciu się uszkodzonej tkanki spajający ją mechanicznie implant uległ całkowitej resorpcji. Kwas glikolowy stosuje się także do produkcji rusztowań komórkowych czy nici chirurgicznych, których dużą zaletą jest utrata wytrzymałości nawet do 50% już po 2 tygodniach, zaś całkowitej resorpcji ulegają one po 4-6 miesiącach. W porównaniu z polilaktydem (poli(kwasem mlekowym), PLA) cechuje go prawie dwukrotnie szybsze tempo rozkładu w środowisku *in vitro* [9, 14, 17, 21, 25].

Poprzez dobór odpowiednich stężeń monomerów GA i LA uzyskuje się kopolimer kwasu polimlekowego oraz kwasu glikolowego (PLGA) o właściwościach pośrednich pomiędzy wyżej opisanymi polimerami. Kopolimer ten najczęściej wykorzystywany jest do produkcji szwów chirurgicznych [25].

PODSUMOWANIE

Problem „naprawy” ubytków ludzkiego ciała zawsze wzbudzał zainteresowanie naukowców i ośrodków badawczych. Potocznie nazywana „naprawa” to proces mający na celu stworzenie lub też indukcję formowania się specyficznej tkanki w danym miejscu w wyniku czynności dokonywanych na komórkach, podłożach i czynnikach wzrostu.

Uważa się, że inżynieria tkankowa to przyszłość medycyny regeneracyjnej. Hodowla pojedynczych komórek lub całych tkanek poza żywym organizmem, za pomocą ciągle ewoluujących metod i technik, jest jednym z ciekawszych i ważnych zagadnień w ostatnich czasach nie tylko w medycynie i biologii, ale również chemii. Jako forma terapii regeneracyjnej unika ona problemów związanych z przeszczepami organów, na przykład niewystarczającą liczbą dawców czy leczeniem trwałego tłumienia immunologicznego. Nie wymaga również implantacji sztucznych protez (implantów), materiałów o względnie niskiej biogodności [12].

ABSTRACT

The loss or failure of an organ or tissue is one of the most devastating and costly problems in healthcare. Tissue engineering is a new field that applies the principles of biology, engineering and the life science in the development of functional substitutes for damaged tissue. Regeneration involves the creation of tissue identical to that which has been lost or injured. In contrast, tissue repair restores the damaged area with functional but different tissue. This approach uses two main components: cells and scaffolds [6, 11].

Scaffold development underpins the advancement of tissue engineering. Materials used for scaffold preparation play a major role and have found widespread biomedical applications in the development of synthetic skin substitutes, controlled drug release delivery, artificial tissue and organs, and biosensors. They have numerous advantages, such as biocompatibility, biodegradability, and anti-bacterial properties. They are safe for human use.

BIBLIOGRAFIA

1. Krebs N., *Advances in Cardiac Engineering and Cardiac Tissue Replacement Modalities*, "Journal of Undergraduate Research", Vol. 2, No. 1.
2. Wojtowicz A., Szostak D., Malejczyk J., *Tissue engineering in oral surgery – review of new methodology*, „Nowa Stomatologia” 1/2002.
3. Langer R., Vacante J., *Tissue engineering*, "Science" 260 (1993).
4. Michalska M., Kozakiewicz M., Bodek K., *Polimerowe nośniki czynników angiogennych. Cz. I. Membrana chitozanowo-alginianowa jako nośnik PDGF-AB i TGF- β* , „Polimery w Medycynie” 2008, T. XXXVIII, Nr 4.
5. Gelsea K., Poschlb E., Aigner T., *Collagens – structure, function, biosynthesis*, "Advanced Drug Delivery Reviews" 55 (2003).
6. Ma P.X., *Scaffolds for tissue fabrication*, "Materials Today", May 2004.
7. Daamena W.F., Veerkampa J.H., van Hestb J.C.M., van Kuppevelt T.H., *Elastin as a bio-material for tissue engineering*, "Biomaterials" 28 (2007).
8. Wisowski G., Olczyk K., Koźma E.M., *The influence of sorbitol on photooxidation-mediated crosslinking of porcine pericardial collagen*, „Biotechnologia”, 4 (71) 2005.
9. Jachimowicz M., *Projektowanie i wytwarzanie rusztowań stosowanych w rekonstrukcji tkanek biologicznych*, LXIV, Zeszyt 4/2005.
10. Ciupik L., Jędryc L., Kierzkowska A., *Biomaterials used for DERO implants: history, present-days, future*, Lfc.

11. Ranger L., *A new Field and its challanges*, "Pharmaceutical Research", Vol. 14, 1997.
12. Tabata Y., *Recent progress in tissue engineering*, "DDT" Vol. 6, No. 1, January 2001.
13. „Puls – Pismo Okręgowej Izby Lekarskiej w Warszawie”, Nr 2004-06.
14. Nałęcz M., *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000*, T. 4, Biomateriały, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003.
15. Minakowski W., Weidner S., *Biochemia kręgowców*, Warszawa 2005.
16. Kucharska M., Bocian K., Butruk B., Ciach T., *Implanty kostne*, „Przegląd Techniczny, Gazeta Inżynierska” 03.2008.
17. Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J., OPIS PATENTOWY PL 191846 B1.
18. http://www.alejazdrowia.pl/product_info.php?products.
19. <http://www.biolog.pl/article1258.html>.
20. http://zschpraca.webpark.pl/podzial_bialek.htm.
21. <http://www.w3.aspoleczny.pl/Poliglikolid.html>.
22. <http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108Groups/group12/TEModelLarge.jpg>.
23. <http://www.ioi.com/>.
24. <http://www.ibs.upm.edu.my/~aini/micrograph.htm>.
25. http://www.cmj.org/paper_journal/05/17/05/F051705_2.htm.

Maria Grolik, e-mail: mg-b@tlen.pl

PAWEŁ J. CHOMIAK, JACEK J. PIETRZYK¹

(UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI)

OMÓWIENIE PROBLEMU WŁAŚCIWEJ INTERPRETACJI
WYNIKÓW KARIOTYPU MOLEKULARNEGO
PRZY PRÓBIE IDENTYFIKACJI OBSERWOWANYCH
NIEZRÓWNOWAŻONYCH ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH
U PACJENTÓW Z NIESPECYFICZNĄ NIEPEŁNOSPRAWNOŚCIĄ
INTELEKTUALNĄ ORAZ ZESPOŁEM MNOGICH
WAD WRODZONYCH

STRESZCZENIE

Ocena kariotypu pacjenta stanowi podstawę prawidłowej porady genetycznej mającej związek z podjętym leczeniem i/lub prewencją. W chwili obecnej laboratoria cytogenetyczne mają do dyspozycji ogromną liczbę metod diagnostycznych, w tym analizy kariotypu molekularnego oparte na metodach *CGH*. Metody *CGH* pozwalają na wykrywanie zmian zdecydowanie mniejszych, w porównaniu z klasycznymi technikami cytogenetycznymi takimi jak metoda GTG. Niestety, brak możliwości bezpośredniej analizy chromosomów pacjenta może prowadzić do przekłamania podczas interpretacji wyniku. W poniższym opracowaniu przedstawiono dwa przypadki obrazujące najczęstsze problemy pojawiające się podczas interpretacji wyników kariotypu molekularnego metodą *CGH*.

¹ Dr Paweł J. Chomiak, MSD Polska, Warszawa; e-mail: pchomiak@inar.pl.

Prof. dr hab. Jacek J. Pietrzyk, Zakład Genetyki Medycznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

DIAGNOSTYKA CYTOGENETYCZNA NIEPEŁNOSPRAWNOŚCI INTELEKTUALNEJ I ZESPOŁÓW MNOGICH WAD WRODZONYCH – WPROWADZENIE

Jedną z przyczyn wystąpienia niespecyficznej niepełnosprawności intelektualnej oraz zespołu mnogich wad wrodzonych jest ogólnie pojęte zjawisko aberracji chromosomowych, polegające na zmianach liczby bądź struktury chromosomów somatycznych oraz chromosomów płci. W chwili obecnej ocenia się, iż częstość aberracji chromosomowych u pacjentów ze zdiagnozowaną niepełnosprawnością intelektualną oraz zespołem mnogich wad wrodzonych sięga nawet 6% [2, 3]. Do najczęściej obserwowanych zmian należą:

1. trisomia chromosomów 21. pary (zespół Downa), stanowiąca około 76% wszystkich zaburzeń chromosomowych u pacjentów z niespecyficzną niepełnosprawnością intelektualną oraz zespołem mnogich wad wrodzonych;
2. delecje chromosomowe wraz z zespołami mikrolecyjnymi – 8%;
3. zmiany liczby chromosomów płci – 4%;
4. chromosomy koliste i chromosomy markerowe – 4%;
5. translokacje zrównoważone – 3%;
6. translokacje niezrównoważone – 3%;
7. duplikacje – 2%;
8. pozostałe aneuploidie autosomalne – 1%;
9. inne – 1%.

Zaburzenia liczby chromosomów (aneuploidie i poliploidie) lub ich struktury (aberracje strukturalne) pojawiające się podczas procesów rozwojowych są częste, o czym mogą świadczyć dane szacunkowe prezentowane w niektórych źródłach [3] dotyczących przyczyn poronień samoistnych obserwowanych w pierwszych tygodniach ciąży. Przyczyny wystąpienia zaburzeń można podzielić ze względu na ich pochodzenie i moment powstania. Do najczęstszych należą [2]:

1. zjawisko *nondysjunkcji chromosomowej* (nieprawidłowej segregacji chromosomów), występującej w trakcie podziałów mejotycznych procesów gamatogenezy. Częściej zaburzenia te pojawiają się w procesie oogenezy, a ryzyko związanych z nimi trisomicznych zygot rośnie wraz z wiekiem kobiety;
2. obecność *translokacji zrównoważonych* (np. translokacji robertsonowskich) u jednego z rodziców;
3. zaburzenia procesu mitozy w pierwszych etapach życia zarodkowego, np. wystąpienie zjawiska *nondysjunkcji*;
4. zmiany typu *de novo* powstałe pod wpływem działania czynników zewnętrznych (teratogenów) lub w wyniku niestabilności DNA.

Zespołem genetycznym, którego etiologię poznano najlepiej, jest zespół Downa. W 85% przypadków trisomia chromosomów 21. pary spowodowana jest nondysjunkcjami chromosomowymi w procesie oogenezy, w 5% przypadków dochodzi do nondysjunkcji chromosomowej w trakcie procesu spermatogenezy. Pozostałe to zaburzenia powstałe w trakcie pierwszych podziałów mitotycznych zapłodnionej komórki jajowej, a także obecność translokacji zrównoważonych u jednego z rodziców, jak również zmiany typu *de novo* i inne [3].

Rzetelnym kryterium weryfikacji i potwierdzenia zmian strukturalnych chromosomów pacjenta jest wykonanie badań cytogenetycznych. Kryterium doboru właściwego badania laboratoryjnego uzależnione jest w głównej mierze od postawionego rozpoznania oraz możliwości diagnostycznych ośrodka badawczego. Najczęściej podstawowe badania cytogenetyczne obejmują analizę kariotypu pacjenta z wykorzystaniem metody oceny prążkowej chromosomów – badanie prążkami G, zwane również badaniem GTG lub Giemza-Trypsyna-Giemza.

W badaniu GTG możliwa jest analiza zarówno liczby, jak i struktury chromosomów pacjenta. Istnieją również inne techniki umożliwiające bezpośrednią analizę kariotypu. Należą do nich takie metody, jak metoda prążków R, prążków Q, prążków C, srebrzenia organizatorów jąderka, metody prążkowe typu *HRT* – *high resolution technique* czy też klasyczne techniki *FISH* – *fluorescent in situ hybridization*, takie jak *FISH* z wykorzystaniem sond specyficznych do wybranych sekwencji DNA czy też *multicolor FISH*, stosowany najczęściej do analizy poszczególnych chromosomów lub całego kariotypu pacjenta.

Niedoskonałości wymienionych wyżej metod w głównej mierze dotyczą rozdzielczości oraz czułości wykrywania bardzo małych zmian strukturalnych. W przypadku technik *FISH* główny problem wynika z faktu, iż metoda stosowania specyficznych sond wymaga znajomości przez badacza konkretnego regionu zmiany. Techniki fluorescencyjne oparte na wielokolorowych mieszaninach ze względu na bardzo wysokie koszty przeprowadzanych analiz, jak również potrzebne zaplecze aparaturowe, przeprowadzane są zdecydowanie rzadziej podczas wykonywania pierwszej oceny kariotypu.

W przypadku klasycznych technik badawczych opartych na bezpośredniej analizie chromosomów w mikroskopie świetlnym bardzo dużym problemem jest właściwa interpretacja wyników w momencie, kiedy dojdzie do wykrycia niewielkiej aberracji chromosomowej. Niejednokrotnie stwierdzenie obecności „dodatkowego” materiału genetycznego wiąże się z brakiem możliwości dokładnej identyfikacji pochodzenia tego addytu chromosomowego.

Pod koniec lat 90. ubiegłego wieku pojawiły się nowe techniki analizy aberracji chromosomowych – metody typu *CGH* (*comparative genomic hybridization*) – porównawczej hybrydyzacji genomów, ponieważ około 7-8% [5, 6, 7, 8, 9] aberracji chromosomowych związanych jest ze zmianą ilości materiału genetycznego.

Głównym założeniem techniki *CGH* jest jednoczesna hybrydyzacja dwóch różnie znakowanych, ilościowo identycznych (w stosunku 1:1) próbek DNA genomowego. Jedna próbka pochodzi od pacjenta, druga – od osoby o prawidłowym kariotypie, a hybrydyzacja wykonywana jest na prawidłowej płytce metafazowej. Dzięki zastosowaniu hybrydyzacji typu *CGH* możliwe stało się badanie całego genomu. Niestety, ze względu na ilościowy charakter analizy techniką tą można analizować tylko aberracje nie zrównoważone. Wraz z wprowadzeniem technik *CGH* typu *hr-CGH* – *high resolution CGH* oraz *array-CGH* pojawiło się nowe pojęcie w cytogenetyce molekularnej, zwane kariotypem molekularnym. Definicja kariotypu molekularnego jest pojęciem bardzo ogólnym i różnie określanym przez autorów prac badawczych. Dla potrzeb niniejszego opracowania przyjęto, iż kariotyp molekularny jest wygenerowanym obrazem komputerowym, stanowiącym odzwierciedlenie rzeczywistej, uśrednionej wartości stopnia hybrydyzacji kompetytywnej sekwencji znakowanego fluorescencyjnie genomowego DNA pacjenta w stosunku do znakowanego fluorescencyjnie DNA referencyjnego, przeprowadzonej na matrycy, jaką jest prawidłowa płytka metafazowa o zapisie 46,XY. Wynik badania kariotypu molekularnego nie jest efektem analizy bezpośredniej chromosomów pacjenta, ale DNA genomowego poddanego uprzednio preparatyce technikami biologii molekularnej [1].

Klasyczna technologia *CGH* umożliwia identyfikację zmian ilościowych w sekwencjach subtelerowych chromosomów. Ze względu na ograniczoną czułość technika ta nie ma zastosowania w identyfikacji zmian ilościowych sekwencji polimorficznych oraz repetytywnych chromosomów, takich jak centromery, satelity chromosomów grupy D, regiony heterochromatyny konstytutywnej oraz telomery. Technika *hr-CGH*, wykazująca większą czułość oraz specyficzność, umożliwia identyfikację większości zmian ilościowych. Jedynie zmiany sekwencji centromerowych nie są wykrywane przy użyciu tej metody.

W niniejszym opracowaniu na przykładzie dwóch przypadków opisano możliwości diagnostyczne i zasady interpretacji wyników uzyskiwanych podczas analizy kariotypu molekularnego wykonywanej z wykorzystaniem metody *hr-CGH*.

IDENTYFIKACJA MIEJSCA POCHODZENIA CHROMOSOMU MARKEROWEGO

Zjawisko małych chromosomów markerowych (*SMCH*, ang. *supernumerary marker chromosome*) obserwowane jest w różnych zespołach genetycznych [4, 11]. Dokładna diagnostyka *SMCH* niejednokrotnie jest utrudniona ze względu na brak jednoznacznych wyników analiz cytogenetycznych. Chromosomy markerowe mogą pochodzić z każdego chromosomu obecnego w komórce (najczęściej powstają z chromosomów płci oraz akrocentrycznych chromosomów

grup D i G). *SMCH* w głównej mierze zbudowane są z heterochromatyny okołocentromerowej danego chromosomu oraz zawierają centromer, dzięki któremu mogą segregować w trakcie podziałów komórkowych. Identyfikacji *SMCH* dokonuje się najczęściej poprzez zastosowanie techniki *FISH* z wykorzystaniem sond centromerowych. Jednakże jest to technika, która nie zawsze pozwala na pełną identyfikację miejsca pochodzenia chromosomu (w badaniu identyfikowane są jedynie specyficzne centromery, budujące chromosom markerowy, niemożliwa jest więc identyfikacja sekwencji euchromatynowych, stanowiących również element chromosomu markerowego). Dzięki zastosowaniu techniki *hr-CGH* możliwa jest identyfikacja pochodzenia materiału chromosomowego, jednakże niemożliwa staje się identyfikacja samego centromeru. Zważywszy na wagę oraz potrzebę poznania aktywnych transkrypcyjnie regionów budujących *SMCH* oraz ich wpływ na obraz kliniczny pacjenta, zastosowanie metod analizy kariotypu molekularnego jest właściwą decyzją. Na rycinie poniżej przedstawiono wynik badania cytogenetycznego (w formie zapisu *ISCN* – *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) oraz idiogram obrazu kariotypu molekularnego u pacjenta ze stwierdzonym chromosomem markerowym.

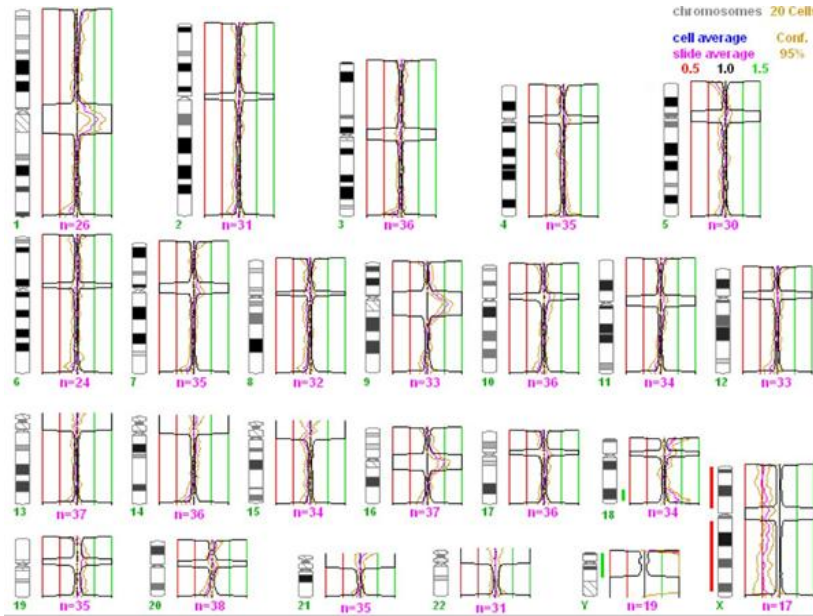
Wynik badania cytogenetycznego: GTG 550 46,XY [65%]/47,XY+mar(?)[35%].

Przeprowadzona analiza kariotypu molekularnego z wykorzystaniem metody *hr-CGH* pozwoliła ustalić, że dodatkowy materiał genetyczny pochodził z rejonu chromosomu 18. pary: ish *hr-CGH* dup18q22 (dokładny opis wyniku pod ryciną).

Uzupełniony zapis cytogenetyczny, uzyskany w oparciu o badania podstawowe, jak i molekularne, prezentuje się w następujący sposób:

ish *hr-CGH* 46,XY[65%]/47,XY + mar (18q22)[35%]

Rycina 1. Wynik analizy *hr*-CGH. Kolorem zielonym zaznaczone są miejsca obecności dodatkowego materiału genetycznego. Obecność sygnałów zielonego i czerwonego przy idiogramach chromosomów płci jest kontrolą w przeprowadzonej analizie. W założeniu, w przypadku materiału pochodzącego od pacjentów płci męskiej, hybrydyzacja jest tak prowadzona, aby uzyskać wynik pozytywnie fałszywej duplikacji chromosomu Y oraz delecji chromosomu X.



Jak wspomniano wcześniej, metoda *hr*-CGH nie pozwala na identyfikację regionów centromerowych, dlatego też nie uzyskano dodatkowych sygnałów świadczących o duplikacji w którymkolwiek z regionów centromerowych analizowanych chromosomów. Uzyskany wynik kariotypu molekularnego, stanowiący uzupełnienie klasycznego badania cytogenetycznego, w zupełności wystarczy do prowadzenia dalszych analiz genetycznych. Do takich analiz należy np. ocena stopnia ekspresji wybranych genów zlokalizowanych w regionie aberracji.

IDENTYFIKACJA DODATKOWEGO MATERIAŁU GENETYCZNEGO O NIEZNANYM POCHODZENIU

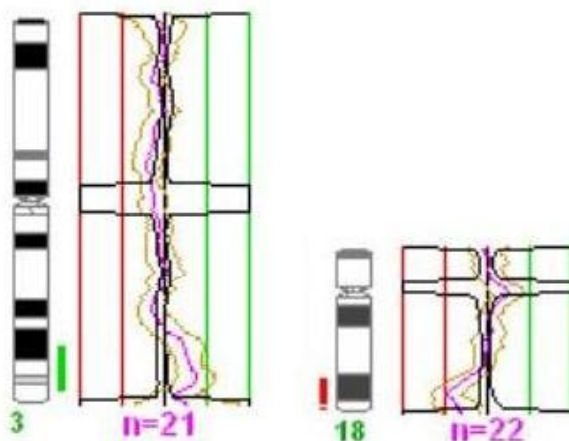
Kolejnym przykładem tego, że technika *hr*-CGH stanowi istotne uzupełnienie wyników klasycznego badania cytogenetycznego, jest identyfikacja dodatkowego materiału genetycznego o nieznanym pochodzeniu.

W przypadku wyniku cytogenetycznego o zapisie: GTG 500 46, XY, der (18q) stwierdza się u pacjenta obecność dodatkowego materiału genetycznego na jednym z chromosomów 18. pary. Podobnie jak we wcześniej opisywanej sytuacji, możliwe jest wykorzystanie różnych technik molekularnych, jednakże metoda *hr-CGH* jest uważana za jedną z najbardziej uniwersalnych.

Wynik analizy kariotypu molekularnego nie tylko pozwolił na wskazanie miejsca pochodzenia dodatkowej zmiany (zaznaczonej kolorem zielonym), ale również umożliwił wykazanie, iż chromosom 18. pary, biorący udział w translokacji, uległ częściowej delecji w dystalnej części długiego ramienia.

Ostateczny zapis aberracji podano w opisie Ryciny 2.

Rycina 2. Zapis wyniku: ish hr-CGH dup 3q27-28, del 18q22→ter, uzupełniony: ish hr-CGH 46,XY (der18)(dup3q27-28, del18q22→ter)



KOMENTARZ

Interpretacja wyników kariotypu molekularnego nie opiera się wyłącznie na prostej analizie uzyskanych danych. W przypadku identyfikacji addytów genetycznych obecnych w formie chromosomów markerowych albo dodatkowych zmian w strukturach chromosomu wymagana jest szczególna uwaga.

Ponieważ analizy molekularne z zastosowaniem wszystkich metod *CGH* (jak również innych metod opartych np. na analizie mikromacierzy DNA) są analizami ilościowymi, a nie jakościowymi, umożliwiają więc one jedynie detekcję obecnych ubytków lub dodatkowych kopii danych sekwencji DNA. Przyjęte zapisy wyników analizy opierają się na stwierdzeniu obecności delecji (del) lub duplikacji (dup) sekwencji, co może przyczynić się do niewłaściwych inter-

pretacji wyników, a przynajmniej do niewłaściwego opisu obserwowanego zjawiska. Problem interpretacji wyników analizy kariotypu molekularnego staje się bardzo istotny zwłaszcza w przypadku braku informacji o wynikach wcześniejszych badań cytogenetycznych, polegających na bezpośredniej ocenie kariotypu pacjenta. Brak zrozumienia patogenetyki obserwowanych zmian może doprowadzić do udzielenia nieprawidłowej porady genetycznej, a w rezultacie może zaburzyć przebieg dalszych badań diagnostycznych, jak również może przyczynić się do nieprawidłowej interpretacji charakteru samej zmiany. W opisywanych powyżej przypadkach analiza ilościowa z wykorzystaniem metody *hr-CGH* pozwoliła na identyfikację pochodzenia dodatkowego materiału genetycznego, co w rezultacie pozwoliło na postawienie ostatecznej diagnozy i właściwej opinii cytogenetycznej. Gdyby kariotyp obydwu pacjentów analizowano z wykorzystaniem samej metody *hr-CGH*, uzyskane wyniki byłyby nieprawidłowe. W przypadku pacjenta ze stwierdzonym chromosomem markerowym zmianę można zinterpretować jako duplikację fragmentu regionu 18q22. Dodatkowo u pacjenta niemożliwa była ocena częstości zmiany we frakcji komórek pobranych do badania. W drugim przypadku, opierając się wyłącznie na wynikach analizy molekularnej, otrzymano by informację o obecności dwóch zmian ilościowych, interpretowanych jako duplikacja i delecja (odpowiednio na chromosomie 3. i 18. pary), natomiast informacja o translokacji jako przyczynie obserwowanych zmian byłaby zupełnie nieosiągalna.

Reasumując, w przypadku analiz kariotypu molekularnego wskazana jest szczególna ostrożność w interpretacji obserwowanych zmian i nie dotyczy ona trafności samej analizy (badania kariotypu molekularnego wymagają weryfikacji innymi metodami molekularnymi czy cytomolekularnymi) co do sposobu określenia charakteru zmiany. Problemem metod cytomolekularnych opartych na zjawisku hybrydyzacji do specyficznego podłoża (chromosomu, macierzy DNA) jest absolutny brak możliwości bezpośredniej analizy samych chromosomów pacjenta, co uniemożliwia pełną i trafną ocenę struktury oraz liczby obserwowanych chromosomów, w tym chromosomów markerowych.

ABSTRACT

Evaluation of the patient's karyotype is the basis for proper genetic counseling, and thus also for a treatment or prevention to be taken. At present, cytogenetic laboratories have at their disposal a large number of diagnostic methods, including molecular karyotype analysis based on CGH procedures. The CGH methods allow to detect much smaller changes than conventional cytogenetic techniques such as a GTG method. Unfortunately, lack of direct analysis of patient's chromosomes may lead to a distortion in interpreting the result. The following paper presents two cases illustrating the most common problems in interpreting the results of molecular karyotyping using the CGH procedure.

BIBLIOGRAFIA

1. Chomiak P.J., *Analiza mikroaberracji chromosomowych u pacjentów z niespecyficzną niepełnosprawnością intelektualną i/lub zespołem mnogich wad wrodzonych z wykorzystaniem metody hr-CGH. Podjęcie próby określenia zależności genotyp-fenotyp. Badania wstępne*, praca doktorska CMUJ, 2011.
2. Cook D.J., *ISCN 2005. An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*, "British Journal of Biomedical Science" 2006.
3. Gersen S.L., Keagle M.B., *The Principles of Clinical Cytogenetics. Second Edition*, „Humana Press” 2005.
4. Helszer Z., Kałużewski B., Constantinou M., *Male dodatkowe chromosomy markerowe (ESACs). Problemy diagnostyczne i znaczenie kliniczne*, „Diagnostyka Laboratoryjna” 2001, 37.
5. Kirchhoff M., Bisgaard A.M., Bryndorf T., Gerdes T., *MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williamse Beuren syndrome regions*, "European Journal of Medical Genetics" 2007, 50.
6. Kirchhoff M., Gerdes T., Brunebjerg S., Bryndorf T., *Investigation of Patients With Mental Retardation and Dysmorphic Features Using Comparative Genomic Hybridization and Subtelomeric Multiplex Ligation Dependent Probe Amplication*, "American Journal of Medical Genetics" 2005, 139A.
7. Kirchhoff M., Gerdes T., Maahr J., Rose H., Bentz M., Lundsteen C., *Deletions Below 10 Megabasepairs are Detected in Comparative Genomic Hybridization by Standard Reference Intervals*, "Genes, Chromosomes & Cancer" 1999, 25.
8. Kirchhoff M., Pedersen S., Kjeldsen E., Rose H., Dunø M., Kølvraa S., Lundsteen C., *Prospective Study Comparing HR-CGH and Subtelomeric FISH for Investigation of Individuals With Mental Retardation and Dysmorphic Features and an Update of a Study Using Only HR-CGH*, "American Journal of Medical Genetics" 2004, 127A.
9. Kirchhoff M., Rose H., Lundsteen C., *High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics*, "Journal of Medical Genetics" 2001, 38.
10. Mckinlay Gardner R.J., Sutherland G.R., *Chromosome abnormalities and genetic counseling. Third edition*, Oxford University Press 2004.
11. Srebnia M.I., Tomaszewska A., *Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.

Paweł J. Chomiak, e-mail: pchomiak@inar.pl

PAWEŁ J. CHOMIAK, MAGDALENA JANECKO

(UNIwersytet Jagielloński)

AN 11-YEAR-OLD BOY WITH DOWN SYNDROME
PHENOTYPE AND PARTIAL DUPLICATION
IN 21Q11.2-Q21 REGION

S t r e s z c z e n i e: Opis przypadku 11-letniego chłopca z zespołem Downa ze stwierdzoną *de novo* częściową duplikacją chromosomu 21. pary. W pracy dokonano prezentacji algorytmu diagnostycznego, jak również skrótego przeglądu literaturowego.

A b s t r a c t: We report a clinical case of an 11-year-old boy with *de novo* partial duplication of chromosome 21st pair and some clinical features of Down syndrome. Using hr – CGH method (high resolution Comparative Genomic Hybridization) we detected a quantitative change (a duplication) in 21q21 – q11.2 region. To confirmed the results of hr-CGH analysis we used Quantitative Fluorescent Real Time PCR method with four primers for two different genes located in duplication region.

K e y w o r d s: Down syndrome, hr-CGH, partial duplication, Quantitative Fluorescent Real Time PCR.

I n t r o d u c t i o n: Down syndrome (DS) is a chromosomal disorder caused by the presence of all or part of an additional 21st chromosome [3], [4], [5]. Investigations made during the last 20 years showed that partial trisomy of 21q22 regions is a sufficient determinant of clinical symptoms DS. Down syndrome is always associated with some intellectual and cognitive ability impairment, physical growth retardation and a particular set of dysmorphic facial features.

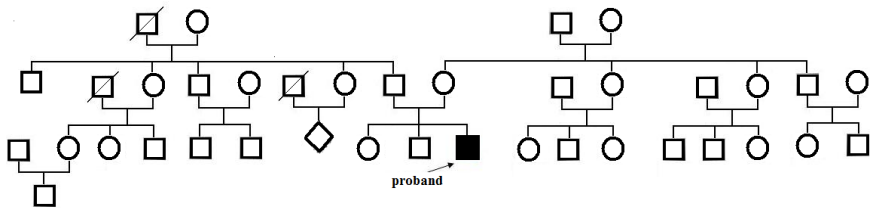
Individuals with Down syndrome tend to have a lower than average cognitive ability, often ranging from mild to moderate developmental disabilities. A small number have severe to profound mental disability. Health concerns for individuals with Down syndrome include a higher risk for congenital heart defects and thyroid dysfunctions.

Materials: We present a boy with some dysmorphic features typical for Down syndrome with a duplication in 21q11.2-q21 region. A proband was born to a G3, P3 (third pregnancy) healthy mother at 40 weeks of gestation. The parameters at birth were: weight 3420 g, length 56 cm, head circumference 34 cm, Apgar score 9 points. A psychomotoric development was normal at first, nevertheless a speech delay was observed. According to a consulting psychologists his cognitive ability is lower than average. That is why, a boy was sent to school with a one-year delay. Although he follows an individual syllabus. The child showed difficulty in knowledge acquisition. No congenital defects were detected.

Clinical evaluation of the child revealed hypotrophy, mild muscle hypotonia and a variety of dysmorphic features, including high forehead, hypertelorism, upslanting palpebral fissures, epicanthal folds of the eyelids, long and flattened philtrum, thin lips, brachydaktyly and short, broad hands.

Both parents and siblings of patient were healthy. Genealogy was not charged in the direction of genetically determined diseases. On figure below (Figure 1) we present the proband's pedigree.

Figure 1. The proband's pedigree



Methodology: Classical cytogenetic analysis chromosomes in T-cells from peripheral blood – 550 GTG banding method – revealed a normal male karyotype 46, XY. Hr – CGH analysis, which is used for detection of small unbalanced chromosomal translocations [2], showed duplication on long arm chromosome 21th pair (Figure 2) in region of q21-q11.2 band. Twenty metaphases target slides were analyzed what resulted in average value from 35 chromosomes 21th pair – five chromosomes were thrown aside become of chromosomal collisions. To eliminate the possible mistakes and the false positive results

the molecular analyses were conducted. Two randomly chosen genes located in duplication region – *JAM2* (*junctional adhesion molecule 2*) and *TMPRSS15* (*transmembrane protease, serine 15*) were analysed. *B-actin* gene with a locus on chromosome number 7 was used as a control. In Table 1 we present additional information for both genes.

Table 1. Characteristic of *JAM2* and *TMPRSS15* genes

	Gene	Primer's sequence (5'→3')	Product's size	Gene's localization
1.	<i>JAM2</i>	GAAGGCAAAGACCTAAAATGGCT TTGGCAGTGTGTGAATGCCTATG	276	27,011,584- 27,089,874
2.	<i>TMPRSS15</i>	GGCTCGTGAAGGTGCTCTCAGC CGGAGTTGCTACTCAGTTTGTGACC	522	19,641,433- 19,775,970

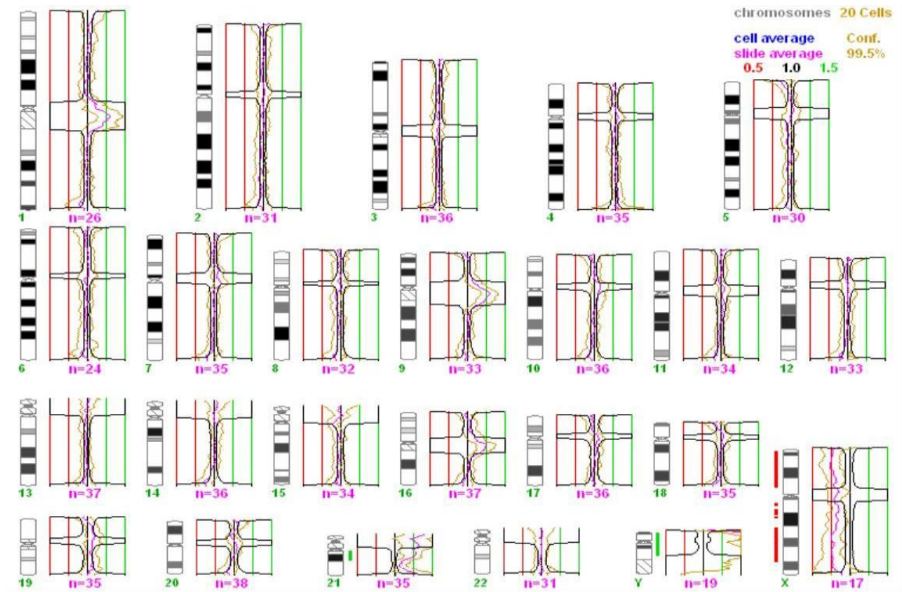
Reference DNA was isolated from 8 healthy people. Results of quantitative real time PCR – Syber® Green analyses showed that both genes (*JAM2*, *TMPRSS15*) were present in three copies – procedure was repeated twice (see Table 2). Every time we used two different thinning of DNA (100 and 50 ng per probe) [1].

Table 2. Results of Quantitative Fluorescent Real Time PCR

Gene	Value of used DNA	ΔC_t (probe)	ΔC_t (control sample)	$\Delta\Delta C_t$ [%]
<i>JAM2</i>	50ng	4,050	4,704	157,353
	100ng	3,105	3,61	141,912
<i>TMPRSS15</i>	50ng	3,980	4,497	142,109
	100ng	3,035	3,580	145,902
Average value of $\Delta\Delta C_t$ from all experiments				146,819

In support of analyses we established the size of change on about 7 Mbp.

Figure 2. Results of hr – CGH analysis. The green colour on ideogram of chromosome 21st pair marks the region of duplication. Sex chromosomes are false, positive control



Discussion and conclusions: Down syndrome due to 21 trisomy is the most common cause of mental retardation and developmental malformation (congenital heart defects) in our population. Investigations made during the last 20 years showed that partial trisomy of 21q22 regions is a sufficient determinant of clinical symptoms DS. This region has been called “Down’s syndrome critical region”. Our case showed that partial trisomy 21q11.2-q21 region can be the cause of some symptoms of DS what is in agreement with the results of other studies. It is possible that imperfection of hr-CGH method (the lack of possibility of identification the cell mosaics, unbalanced chromosomal changes with the frequency lower than 25% and the size smaller than 2-4 Mbp) influenced on possibility of detection changes in critical for DS region 21q22 in this case, however received diagnostic conduct permits us to suggest about correctness of results [6].

REFERENCES:

1. Hu Y., Zheng M., Xu Z., Wang X., Cui H., *Quantitative real-time PCR technique for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome*, "Prenatal Diagn." 2004; 24: 704-707.
2. Kirchhoff M., Rose H., Lundsteen C., *High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics*, "J. Med. Genet." 2001; 38: 740-774.
3. Korbel J.O., Tirosh-Wagner T., Urban A.E. Chen X.N., Kasowski M., Dai L., Grubert F., Erdman C., Gao M.C., Lange K., Sobel E.M., Barlow G.M., Aylsworth A.S., Carpenter N.J., Clark R.D., Cohen M.Y., Doran E., Falik-Zaccai T., Lewin S.O., Lott I.T., McGillivray B.C., Moeschler J.B., Pettenati M.J., Puschel S.M., Rao K.W., Shaffer L.G., Shohat M., van Riper A.J., Warburton D., Weissman S., Gerstein M.B., Snyder M., Korenberg J.R., *The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies*, "Proc. Natl. Acad. Sci." USA 2009, Jul 21; 106(29):12031-6.
4. McKinlay Gardner R.J., Sutherland G.R., *Chromosome abnormalities and genetic counseling. Third edition*, Oxford University Press 2004.
5. Schintzel A. *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd edition*, Berlin, New York, De Gruyter 2001.
6. Lyle R., Béna F., Gagos S., Gehrig C., Lopez G., Schinzel A., Lespinasse J., Bottani A., Dahoun S., Taine L., Doco-Fenzy M., Cornillet-Lefévre P., Pelet A., Lyonnet S., Toutain A., Colleaux L., Horst J., Kennerknecht I., Wakamatsu N., Descartes M., Franklin J.C., Florentin-Arar L., Kitsiou S., Yahya-Graison E., Costantine C., Sinet P.-M., Delabar J.M., Antonarakis S.E., *Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21*, "European Journal of Human Genetics" 2009, 17: 454-466.

INFORMACJE O AUTORACH

BARTŁOMIEJ MATEJKO – mgr inż. biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, student V roku inżynierii biomedycznej Międzywydziałowej Szkoły Inżynierii Biomedycznej AGH, doktorant Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych). Zainteresowania badawcze: zastosowanie nowoczesnych technologii w medycynie, w szczególności w leczeniu cukrzycy.

MAGDALENA SADYŚ – mgr biologii Akademii Pomorskiej w Słupsku, doktorantka na Wydziale Nauk Przyrodniczych i Środowiska Uniwersytetu w Worcester. Zainteresowania badawcze: aerobiologia, mikologia, ochrona środowiska.

DOROTA MYSZKOWSKA – doktor nauk farmaceutycznych, Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zainteresowania badawcze: aerobiologia, transport daleki pyłku, monitorowanie leczenia chorych na alergiczny nieżyt nosa.

MATTHEW SMITH – doktor aerobiologii Uniwersytetu w Worcester; obecnie adiunkt na Uniwersytecie w Wiedniu. Zainteresowania badawcze: rozwój modeli prognostycznych dla alergennych ziaren pyłku, transport atmosferyczny alergennych ziaren pyłku w skali lokalnej oraz regionalnej, transport dalekobieżny alergennych ziaren pyłku, wpływ wzorów wielkoskalowych zmienności klimatycznej na wyznaczenie oraz wielkość sezonów pyłkowych, dystrybucja przestrzenna i fenologia alergennych roślin.

MARIA GROLIK – mgr międzywydziałowych studiów inżynierii materiałowej na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Doktorantka inżynierii materiałowej w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN w Krakowie. Projekt badawczy: synteza i badanie właściwości polimerowych podłoży do hodowli komórkowej do zastosowań w okulistyce. Zainteresowania naukowe: biomateriały, zwłaszcza materiały polimerowe (biostabilne, degradowalne i resorbowalne), inżynieria tkankowa, hodowla funkcjonalnych tkanek i organów, oddziaływanie komórek z biopolimerami, okulistyka ze szczególnym uwzględnieniem rogówki gałki ocznej.

PAWEŁ J. CHOMIAK – doktor, MSD Polska, Warszawa.

JACEK J. PIETRZYK – prof. dr hab., Zakład Genetyki Medycznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Collegium Medicum UJ

MAGDALENA JANECKO – doktor, Zakład Genetyki Medycznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Collegium Medicum UJ.

