

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

Rok 2, numer 2 (4)
Wrzesień 2004

Diagnosta Laboratoryjny

GAZETA KRAJOWEJ IZBY
DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH

GAZETA
BEZPŁATNA



POZNAJ SIŁĘ
SWOJEGO
ZAWODU



Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych zgodnie z art. 39 ustawy o diagnostyce laboratoryjnej z dnia 28 sierpnia 2003 przesyła sprawozdanie z działalności Samorządu diagnostów laboratoryjnych za rok ubiegły.

Ustawa o diagnostyce laboratoryjnej z dnia 27 lipca 2001, która nadała tytuł prawny zamierzeniom Krajowego Komitetu Organizacyjnego na rzecz powołania Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych stała się *de facto* i *de iure* kontynuacją, istniejącego już Samorządu diagnostów laboratoryjnych. Formę strukturalną temu Samorządowi nadał I Krajowy Zjazd Delegatów Diagnostów Laboratoryjnych. Powstająca Izba Diagnostów Laboratoryjnych powołała na tym Zjeździe, 5-6 grudnia 2002 roku, skład Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych, skład Komisji Rewizyjnej, skład Sądu Dyscyplinarnego, skład Wyższego Sądu Dyscyplinarnego, Rzecznika Dyscyplinarnego oraz jego zastępców i Prezesa Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych. Prezydium zostało powołane na I posiedzeniu Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych, 13 stycznia 2003 roku. Od tej daty należy przyjąć, że powołana Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych zaczęła funkcjonować dla służby pacjentom i osób wykonujących czynności diagnostyki laboratoryjnej.

Biuro Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych, według zapisów ustawy o diagnostyce laboratoryjnej, zainstalowane zostało w Warszawie po uzyskaniu lokalu najemnego od Robotniczej Spółdzielni Mieszkaniowej, na Pradze, przy ul. Białostockiej 7. Istotnym i wyjątkowym, różnym od istniejących podobnego typu samorządów, pośród zawodów medycznych, ewenementem jest to, że KIDL (KRDL) nie otrzymywała, ani nie otrzymuje, jak tamte żadnego wsparcia finansowego z budżetu państwa. Inne korporacje, za przejęte zadania do realizacji, od administracji państwowej, otrzymują dotację z budżetu.

Diagnostami laboratoryjnymi, z mocy ustawy, stawały się tylko te osoby, które wykonywały czynności diagnostyki laboratoryjnej, posiadały studia wyższe, studia na kierunkach przydatnych do wykonywania i udzielania świadczeń zdrowotnych. Ich liczba, ani różnorodność typu wykształcenia,

nie były znane. Informacje dotyczące właściwości tej grupy zawodowej znane były Wydziałom Zdrowia Urzędów Wojewódzkich, ale tylko do 1991 roku. Prawem, przed 1990 rokiem, do wykonywania zawodu objęci byli tylko absolwenci analityki medycznej. Po 1990 roku zostały reanimowane Izby Samorządowe, z pominięciem diagnostyki laboratoryjnej, a wraz z przejęciem zadań od Państwa przejęły też fundusze, które były przyznawane Urzędowi Wojewódzkim, na realizację tych zadań przekazanych Izbie Lekarskiej, Pielęgniarek i Położnych oraz Aptekarskiej.

Z chwilą powołania KIDL, przed diagnostami laboratoryjnymi, stanęła nagle potrzeba i zadanie wypełnienia luki informacyjnej dotyczącej ważnej części świadczeń medycznych. W ciągu kalendarzowego roku 2003 rozpoznaniu i ewidencji poddanych zostało w Izbie 11 560 wniosków, czynnych zawodowo osób zatrudnionych w medycznych laboratoriach diagnostycznych. Na te składały się laboratoria diagnostyczne, mikrobiologiczne, parazytologiczne, serologiczne, genetyczne, hematologiczne, transfuzjologiczne, patomorfologiczne i niektóre laboratoria pozostające w strukturach stacji sanitarno-epidemiologicznych. Tak uczyniona ewidencja osobowa pozwala określić już strukturę zawodu diagnostów laboratoryjnych, tak co do typu wykształcenia, posiadanych specjalizacji jak również specyfikacji dotyczącej zakresu udzielania świadczeń. Rozpoznaniu poddane są także miejsca pracy diagnostów laboratoryjnych, ilość podmiotów i kwalifikacja podmiotu wobec wymogów określających standardy dla medycznych laboratoriów diagnostycznych oraz struktura podmiotów, których częścią składową są laboratoria. Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych posiada, stworzoną przez Biuro, bazę danych – dokumentację materiałową osób wpisanych na listę diagnostów laboratoryjnych oraz formę elektroniczną stanowiącą odzwierciedlenie zgromadzonych informacji w teczkach osobowych. Na listę diagnostów zostało wpisanych 10 160 osób wobec 11 580 wniosków złożonych o wpis na listę. Wnioski zostały weryfikowane na podstawie zebranych dokumentów przekazanych przez Przedstawicieli KRDL na

ciąg dalszy na stronie 7

UWAGA!!!

Na pierwszej stronie prezentujemy zdjęcie nowej siedziby KIDL.

Od połowy września 2004 następuje zmiana adresu:

ul. Konopacka 4; 03-428 Warszawa

Numery telefonów i numer konta pozostają bez zmian. Dodatkowe numery telefoniczne przedstawimy Państwu w kolejnym numerze gazety oraz na stronie Internetowej.

Czy diagności laboratoryjni mogą wybić się na niezależność?

Przewrotność z jaką niektórzy przedstawiciele sztuki medycznej (nie należy mylić z naukami medycznymi), jest równa zadufaniu, gdy tworzą w sobie przekonanie i usiłują innych przekonać, że pacjent w medycznym laboratorium diagnostycznym jest dla diagnosty laboratoryjnego tylko numerem. Przewrotność ta jest powtórzoną wersją, że w świadczeniach medycznych osobowy kontakt z pacjentem ma tylko ten, który potrafi nazwać chorobę i przyporządkować objawom jakiś specyfik farmaceutyczny. Takie przekonania trudno nazwać byłoby teoriami, ale w głowach wielu, odbijają się echem podobne paradygmaty. Diagnostyka laboratoryjna nie od lat minionego pięćdziesięciolecia jest obecna w służbie ratowania życia i zdrowia człowiekowi, gdyż do takiego przekonania doszli ludzie nauki, którzy nie wywodzili się „ze sztuki medycznej”. Być może za tymi Pionierami, jako tylko ogony w komicie, podążać będą mędrcy Ci uprawiający medycynę, i świadczenia zdrowotne bez diagnostyki laboratoryjnej. Ci są najbardziej hałaśliwi, rozgłaszając, że przed pacjentem i wobec pacjenta nie muszą występować w towarzystwie diagnosty, fizjoterapeuty czy pielęgniarki. Tym zaś, wystarczy za dostateczne źródło informacji ogląd pacjenta i nic więcej. Kontestowane zaś stosowane paski i krótkie testy są skutkiem niezrozumienia dla ich wiedzy i doświadczenia, gdy przy leczeniu pacjentów, niektórzy z nich pełnych badań w laboratorium się domagają. W zestawieniach i raportach miesięcznych do NFZ, Ci właśnie, najczęściej i najobficiej podpierają się wirtualnymi, ukazanymi badaniami z diagnostyki laboratoryjnej. Ci też właśnie bronią dostępu do informacji o sposobach leczenia i sposobach rozliczania świadczeń zdrowotnych podpierając się tajemnicą zawodową, tajemnicą dotyczącą pacjenta i jego dóbr osobistych, narażanych w przypadku zbytniej docieklowości przez pytającego, gdzie i kiedy oraz w jakich warunkach wykonane były te badania. Czy diagności laboratoryjni, którzy w pełni dyspozycyjności, w wysoko kwalifikowanych

laboratoriach i przy wpisaniu zawodu diagnosty laboratoryjnego w krąg zawodów medycznych o zaufaniu publicznym, mając materiał do badania pobrany od pacjenta, często osobiście przez diagnostę pozostają w kontakcie numerycznym z pacjentem, czy też w kontakcie osobowym. A czy materiał pobrany od człowieka, krew, wymaz jest nadal częścią osoby ludzkiej, czy materiał ten staje się tylko rzeczą? Przeniesienie stosunku rzeczowego do pacjenta, o który tak często pacjenci oskarżają biegłych w sztuce leczenia jest projekcją budzonego sumienia, u tychże, przez publikatory. Czy, być może, łatwiej i lepiej jest zobaczyć ten stosunek u innych przedstawicieli zawodów, niż dostrzeżać to w osobistej relacji do pacjenta. Diagności laboratoryjni w interesie pacjentów i w trosce o ich dobro, dla ich zdrowia i życia muszą wybić się na niezależność. Tego kolejnym etapem był samorząd zawodowy, który jest faktem od 3 lat. Następnym krokiem, który muszą uczynić, niekoniecznie przy akompaniamencie odgłosów walki bitewnej, ale poprzez mądrych i roztropnych parlamentarzystów. W nich spoczywać będzie głos przyznający diagnostom prawo do udzielania świadczeń zdrowotnych w zakresie diagnostyki laboratoryjnej refundowanej z publicznych środków zdrowotnych i kontraktowania świadczeń diagnostycznych przez diagnostów bezpośrednio w Narodowym Funduszu Zdrowia. Dlaczego niezależność jest tak istotna? Jest ona fundamentalna z przyczyn naukowych. To badania w naukach biologicznych, chemicznych, fizycznych, ogólnie przyrodniczych stworzyły możliwości dla świadczeniodawców medycznych; i to, że spadła śmiertelność; i to, że wydłuża się wiek żywotności zdolności ludzkiego organizmu do zabezpieczenia środków do życia i czerpania radości z życia i pracy - są skutkiem tych badań. Zlecający farmakoterapie nie stanowią trzonu i nie są liczne reprezentowani w zespołach naukowo - badawczych diagnostyki laboratoryjnej.

Absolwenci natomiast wydziałów i kierunków studiów wokół diagnostyki, wybijają się na niezależność i wybijają się, gdy w obliczu zagrożeń epidemiologicznych i innych, wskazać i rozpoznać muszą

ciąg dalszy na stronie 5

W NUMERZE	
Czy diagności laboratoryjni mogą wybić się na niezależność	3
Dylematy etyczno - prawne wynikające z rozwoju genetyki	4-5
Walidacja metody pomiarowej	6
Sprawozdanie z rocznej działalności KIDL oraz odpowiedź Sekretarza Stanu MZ	2-7-8
Cytometria przepływowa w diagnostyce laboratoryjnej	8-10
Strategia wyboru biomarkerów niewydolności serca	11-12
Nowoczesne metody oceny nasienia	13-17
Program ubezpieczenia dla diagnostów laboratoryjnych i laboratoriów	18-19

W Biuletynie m.in.:

- uchwały KRDL,
- Opinie Prawne,
- Wybrane uwagi i komentarze nadesłane przez PT Diagnostów Laboratoryjnych na postawiony zarzut przez posła A. Wojtyłę i dr K. Radziwiłła,
- II Mazowiecka Konferencja Diagnostów Laboratoryjnych
- Korespondencja dotycząca Zespołu do Spraw Organizacji i Wdrażania Systemu Jakości w MLDiM.

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

03-741 Warszawa; ul. Białostocka 7

tel. (022) 741-21-55; (022) 741-21-57 (022) 741-11-60;

faks: (022) 741-21-56

Nazwa Odbiorcy: Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych.

03-741 Warszawa; ul. Białostocka 7

Numer rachunku: 72102010420000880200105692

Bank PKO BP. IV Oddział Warszawa

www.kidl.org.pl e-mail:biuro@kidl.org.pl

WYDAWCA

Krajowa Rada

Diagnostów Laboratoryjnych

Redakcja:

Henryk Owczarek

Stanisław Krężel

Tomasz Dryl

Nakład 10 000 + 500 egz.

Druk: Drukarnia A-Z

Andrzej Zieliński

03-741 Warszawa ul. Białostocka 42

Dylematy etyczno-prawne
wynikające z rozwoju genetyki
medycznej i obowiązujące zasady
etyczne prowadzenia
postępowania medycznego
w zakresie genetyki

Niezwykle szybki rozwój genetyki w ostatnich dziesięcioleciach sprawił, że stanęliśmy wobec zupełnie nowych możliwości diagnostycznych, terapeutycznych i badawczych. Postęp w diagnostyce genetycznej stanowi przełom, wyrażający się nie tylko możliwością przeprowadzenia badań genetycznych u pacjentów, którzy zgłaszają się do lekarza z powodu określonych dolegliwości. Możliwe jest teraz rozpoznanie choroby, jeszcze przed wystąpieniem objawów (diagnostyka przedobjawowa), a także ocena predyspozycji do wystąpienia choroby (diagnostyka predykcyjna). Badania genetyczne można też prowadzić przed urodzeniem, co pozwala na wykluczenie lub rozpoznanie niektórych chorób u płodu. Dzięki postępowi w diagnostyce genetycznej możemy w wielu przypadkach, jeśli nie zapobiec wystąpieniu choroby, to zaplanować efektywny schemat działań profilaktycznych – na przykład w odniesieniu do nowotworów dziedzicznych, zmierzający do wczesnego wykrycia patologii. W przypadkach chorób, których rozwojowi nie tylko nie potrafimy zapobiec (np. płasawica Huntingtona), ale też nie potrafimy ich leczyć, pacjenci mogą uzyskać informację o tym, czy posiadają nieprawidłowy gen, a także, jakie jest ryzyko przekazania tego genu potomstwu. Badania genetyczne, nawet w obecnie dostępnym zakresie, wywołują spory etyczne. Przed nami tymczasem, stoją nowe perspektywy zastosowania w praktyce wiedzy genetycznej. Wiele z nowych procedur, jak na przykład klonowanie narządowe i reprodukcyjne, terapia genowa, sporządzanie „paszportów genetycznych”, zindywidualizowanie terapii zgodne z indywidualnym profilem podatności na leki, diagnostyka przed-koncepcyjna, budzi zasadnicze kontrowersje etyczne.

Obszar zagadnień dotyczących aspektów etycznych badań genetycznych jest tak szeroki i skomplikowany, że przekroczył już ramy zagadnień czysto medycznych. Do ich rozwiązania muszą włączyć się filozofowie (etycy), prawnicy, socjologowie, którzy wraz z lekarzami i genetykami molekularnymi wspólnie powinni opracować normy etyczne i prawne.

Dodatkowym trudnym problemem wynikającym z faktu coraz szerszego

zastosowania metod diagnostyki genetycznej jest pytanie, kto i na jakich zasadach może taką diagnostykę prowadzić. Rozwój stosunkowo prostych technik wykorzystywanych w diagnostyce genetycznej jak np. reakcja PCR, sekwencjonowanie genów, hodowla komórkowa lub tkankowa, barwienie chromosomów, sprawił, że do przeprowadzenia wielu laboratoryjnych procedur wystarczy przygotowanie z zakresu biotechnologii. Do prowadzenia genetycznej diagnostyki klinicznej jest jednak niezbędna szeroka wiedza nie tylko z zakresu procedur laboratoryjnych, lecz również znajomość algorytmów postępowania diagnostycznego w przypadkach poszczególnych złożonych zaburzeń genetycznych, umiejętność analizy np. chromosomów, znajomość zasad interpretacji wyników w odniesieniu do rozpoznania klinicznego. Na przykład zastosowanie niewłaściwej sondy w badaniu FISH (fluorescencyjna in situ hybrydyzacja) podczas diagnostyki złożonych aberracji chromosomowych lub zespołów z mikrodelecji, może doprowadzić do wydania pacjentom fałszywych wyników. Obiekcje budzi także stosowanie przez niespecjalistyczne laboratoria gotowych zestawów (kitów) do diagnostyki molekularnej niektórych chorób genetycznych jak np. mukowiscydozy. W genie CFTR jest znanych obecnie około 1000 różnych mutacji, z których 12 – 17 odpowiada za około 75-80% przypadków tej choroby w Europie Środkowej i te właśnie mutacje mogą być diagnozowane za pomocą kitów, dostępnych w sprzedaży komercyjnej. Nie stwierdzenie jednak mutacji w tych testach nie oznacza wykluczenia choroby i ta informacja musi zawsze znaleźć się w interpretacji wyniku. Rozpoznanie mutacji, obciąża natomiast do udzielenia pacjentowi właściwej porady genetycznej, obejmującej również poradę rodzinną. Innym przykładem pozornie łatwej diagnostyki molekularnej jest poszukiwanie mutacji w genach odpowiedzialnych za dziedzicznie występujące nowotwory, w tym raka piersi lub/i jajnika. Niewłaściwa interpretacja wyników tych badań może mieć dramatyczny wpływ na losy pacjentów i ich rodzin. Zaniepokojenie budzi więc fakt pojawiania się placówek, które bez przygotowania merytorycznego korzystając z powszechnej dostępności do metod diagnostyki genetycznej (szczególnie diagnostyki molekularnej) proponują komercyjnie prowadzenie tych badań, często nie unikając podstawowych błędów merytorycznych nawet w swoich materiałach reklamowych (np. oferta jednego z prywatnych laboratoriów

genetycznych, z siedzibą we Wrocławiu, w której, między innymi oferowane jest „wykrywanie nieuleczalnego uszkodzenia genu odpowiedzialnego za genetycznie uwarunkowany brak plemników”).

W związku z tymi, w ogromnym skrócie przedstawionymi przeze mnie problemami, w ciągu ostatnich lat w różnych krajach podejmowano próby regulacji działań dotyczących genomu (diagnostycznych i terapeutycznych, a także badań naukowych).

Wobec faktu, że Polska stała się członkiem Unii Europejskiej i Rady Europy, chciałam przedstawić bliżej treści, zawarte w konwencji „O ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej wobec Zastosowań Biologii i Medycyny”, rozdziale poświęconym regulacji badań genetycznych i ich zastosowania pt. „Ludzki genom” (The Council of Europe Steering Committee on Bioethics, Explanatory note to the working document on the applications of genetics for health purposes, Strasbourg, 6 February 2003).

W artykule 1 tego protokołu zawarta jest główna idea, przyświecająca autorom omawianego dokumentu, a mówiąca o ochronie „godności i tożsamości istoty ludzkiej i gwarantowanej każdej osobie, bez dyskryminacji, poszanowanie dla jej integralności oraz innych podstawowych praw i wolności wobec określonych w artykule 2 zastosowań genetyki w odniesieniu do istoty ludzkiej. Artykuł 2 odnosi się do „zastosowań genetyki w dziedzinie zdrowia, w tym dla celów eksperymentalnych, jak również w dziedzinach zatrudnienia i ubezpieczeń, powiązanych z działaniami na genomie ludzkim przeprowadzaną na żyjących osobach lub na osobach zmarłych. Artykuł 4 wyraża zakaz wszelkiej dyskryminacji ze względu na dziedzictwo genetyczne, a w artykule 5 podkreślono jednoznacznie, że „w zastosowaniach genetyki będących przedmiotem niniejszego Protokołu właściwe zawodowe normy i standardy muszą być przestrzegane”, a wymagane informacje są przekazywane w sposób zrozumiały i niedyrektywny.

W rozdziale opisującym zastosowania genetyki dla celów medycznych zostały jednoznacznie opisane normy i zasady, które muszą być spełnione podczas prowadzenia badań na materiale genetycznym człowieka, a w szczególności:

“warunkiem wykonania badań genetycznych jest udzielenie przez badanego, lub jego opiekuna prawnego, świadomej zgody na badania genetyczne, tj. po uzyskaniu przez pacjenta szczegółowej informacji dotyczącej celów i rodzaju badania, ryzyka

z nim związanego, konsekwencji uzyskania wyników badań dla osoby poddanej badaniu (w tym w zakresie prokreacji), jak i dla członków rodziny badanej osoby. Osoba zainteresowana może w każdej chwili swobodnie wycofać zgodę na badanie. Szczególną regulacją objęte jest prowadzenie badań genetycznych na osobach niepełnoletnich. Badania genetyczne nie powinny być prowadzone, aż do czasu uzyskania przez zainteresowanych pełnoletniości, chyba, że spowodowałyby to uszczerbek dla jego zdrowia. Ważne jest, że nawet w przypadkach osób niepełnoletnich, zdanie zainteresowanego musi być zawsze wzięte pod uwagę, a znaczenie takiej opinii wzrasta w zależności od jego wieku i stopnia dojrzałości.”

W części poświęconej świadczeniom genetycznym zostało jednoznacznie sformułowane, że „pracownicy ochrony zdrowia, uczestniczący w udzielaniu świadczeń genetycznych posiadają odpowiednie kwalifikacje i zostali odpowiednio przeszkoleni, w sposób umożliwiający im wykonywanie czynności związanych z udzielanymi świadczeniami, zgodnie z normami i obowiązkami wynikającymi z zasad postępowania zawodowego, a testy genetyczne stosowane w ramach świadczeń genetycznych muszą spełniać profesjonalne normy jakości naukowej i klinicznej”. Podkreślono, że dostęp do badań genetycznych powinien być równy, w ramach możliwości istniejących w każdym z krajów sygnatariuszy konwencji. Każda osoba, która zostanie poddana badaniom genetycznym musi mieć zapewniony dostęp do poradnictwa genetycznego, prowadzonego przez odpowiednio wyszkolony personel.

“W artykule omawiającym ochronę prywatności i dostęp do badań genetycznych stwierdzono, że każdy ma prawo do ochrony swojej prywatności, w tym informacji uzyskanych z badań genetycznych. Informacje o wynikach badań genetycznych muszą być przekazane osobom zainteresowanym, ponadto muszą być przekazane w sposób dla tej osoby zrozumiały. Szczególnie podkreślono, że „należy respektować życzenia osób, które nie chcą być informowane”.

“W rozdziałach poświęconych testom przedobjawowym i predykcyjnym (diagnostyka zmian genetycznych, które w przyszłości mogą „spowodować rozwój u badanego choroby lub zaburzenia, albo mogących wywołać chorobę lub zaburzenie w razie przekazania ich potomstwu, albo też mających znaczenie dla postępowania leczniczego”) stwierdzono, że takie testy mogą być prowadzone wyłącznie dla celów

zdrowotnych, lub dla badań naukowych, związanych z celami zdrowotnymi. Wyjątkowo, badania takie mogą być przeprowadzone na osobach, nie mających zdolności do wyrażenia na nie zgody, jeśli takie badanie może wnieść wiedzę „o charakterze profilaktycznym, diagnostycznym lub leczniczym albo dokonanie świadomego wyboru w zakresie prokreacji”, konieczną dla zdrowia danej rodziny. Postanowienia przedstawianego Protokołu odnoszą się również do testów znajdujących się w wolnej sprzedaży, a w szczególności: “jeżeli przepisy prawa dopuszczają wolną sprzedaż testów genetycznych, sprzedaż taka podlega odpowiednim regulacjom mającym na celu w szczególności zapewnienie prawidłowej informacji i prawidłowego zrozumienia implikacji testu przez osobę zainteresowaną”.

Zakres protokołu, odnoszący się do testów genetycznych, wykonywanych na osobach zmarłych reguluje możliwość wykonania takich badań jedynie „po uzyskaniu wymaganej przepisami prawa zgody lub zezwolenia”, a w szczególności stanowi, iż „nie można przeprowadzić testu genetycznego, jeżeli dana osoba zmarła wyraziła za życia sprzeciw”.

W sekcji, poświęconej regulacji zasad prowadzenia badań przesiewowych dla celów zdrowotnych „podejmowanych na całej populacji lub na jej części, w celu przedobjawowej identyfikacji osób, u których występuje zwiększone ryzyko rozwinęcia się choroby lub zaburzenia genetycznego albo przekazania potomstwu takiej choroby lub zaburzenia” stwierdzono, że badania mogą być prowadzone jedynie, jeśli program został zatwierdzony przez odpowiednią instytucję, jego znaczenie naukowe i w zakresie ochrony zdrowia zostało stwierdzone, a w konsekwencji tego programu będą podjęte działania profilaktyczne lub lecznicze oraz, że osoby objęte badaniami będą w sposób adekwatny poinformowane. Prowadzący badania są zobowiązani do „zapewnienia ochrony przed stygmatyzacją populacji lub części populacji, której zaproponowano udział w programie badań przesiewowych, a także członkom populacji biorącym udział w badaniach”.

Omawiany protokół reguluje również zasady prowadzenia badań naukowych, terapii genowej oraz interwencji na genomie ludzkim.

Podsumowując, należy stwierdzić, że omawiany protokół w sposób wyczerpujący reguluje najbardziej podstawowe zasady prowadzenia działań na genomie człowieka. Niektóre z tych kwestii są regulowane różnymi aktami prawnymi, ale to zagadnienie przekracza zakres niniejszej

publikacji. Nie ulega wątpliwości, że Polska nie tylko powinna sygnować omawiany protokół, lecz również egzekwować zasady jego przestrzegania w dobrze pojętym interesie pacjentów.

Literatura u autora.

*Maria Sądadek
Zakład Genetyki Katedry Patofizjologii,
Akademia Medyczna we Wrocławiu*

Czy diagności laboratoryjni mogą wybić się na niezależność?

dokończenie ze strony 3.

przyczynę zagrożeń i środki zaradcze. Nie czynią tego i nie czynić będą z pompatycznością i odgłosami trąb faryzejskich. Współczesny i obecny nam świat zagrożeń, które dotyczą człowieka i szybkość z jaką mogą się rozprzestrzeniać, również jako skutki celowego działania, złowieszczonego, dają diagnostom asumpt, by rozpoznali SIĘ SWOJEGO ZAWODU, SWOJEJ WIEDZY. „Poznać się swojego zawodu” jest właśnie myślą przewodnią i motto kolejnego numeru „Diagnosty Laboratoryjnego”. Siła ta drzemie w przeszłości, z jakiej wyrosły nadzieje ludzkie na wynalezienie i odkrycie eliksiru młodości i panaceum dla zdrowia. To w naukach, z których wyrasta diagnostyka laboratoryjna znajdują się fundamenty i pokłady możliwości działań medycznych, z którymi ludzie wiążą nadzieję i darzą zaufaniem diagnostów. Dostęp do kodu genetycznego organizmu ludzkiego stał się Rubikonem w postępie nauk medycznych. Promem przepływającym na drugą stronę była diagnostyka laboratoryjna. By jednak móc odczytać tajemnicę tkwiącą w biologicznej i psychicznej naturze człowieka mało jest posiadać wiedzę z interny i farmakoterapii. Dla takich „profesjonalistów” jest ona zakryta. Otworzy się wówczas, gdy adept sztuki medycznej i profesjonalista staną się pokorniejsi wobec nauki, a sztukę leczenia zostawiają prestidigitatorom wówczas gdy przy ordynowaniu leku nie czują i nie widzą potrzeby poprzedzenia diagnozy i terapii lekiem skorzystania z wiedzy i rzetelnego badania wykonanego przez diagnostę laboratoryjnego. Czy pokolenie adeptów sztuki medycznej, wyrosłe w latach ostatniego 50-lecia jest gotowe przyjąć tę wiedzę i tę potrzebę, czy też powtarzać będą, że w leczeniu i ratowaniu zdrowia i życia człowieka nie są konieczne badania wykonane w medycznym laboratorium diagnostycznym. Zaufanie zaś pacjentów wyrażane przez okazję udzielania świadczeń, jest wtedy pełniejsze, gdy w procesie tym uczestniczą diagności laboratoryjni, gdyż oni budują zaufanie do zawodów medycznych.

*Prezes KRDL
Henryk Owczarek*

WALIDACJA METODY POMIAROWEJ

Co to jest walidacja metody pomiarowej?

Według normy EN/PN 17025:2001 walidacja jest potwierdzeniem przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione wymagania dotyczące zamierzonego zastosowania. Jest procesem potwierdzającym, że procedura analityczna /badana metoda/ użyta do wykonania konkretnego, wyspecyfikowanego oznaczenia/testu jest odpowiednia do zamierzonego celu /fitness for purpose/.

Dlaczego należy przeprowadzać walidację metody pomiarowej?

Walidacja metody jest dowodem spełnienia określonych kryteriów jakościowych. Świadczy o tym, że laboratorium panuje nad metodą i wydaje wiarygodne, klinicznie użyteczne wyniki badań. Na podstawie wyników wydawanych przez laboratorium lekarz podejmuje decyzje często decydujące o zdrowiu i życiu pacjenta. Pomimo wysokich kosztów związanych z walidacją, jej zaniechanie może okazać się kosztowniejsze, w sytuacji gdy zostanie podważona przez zleceniodawcę (lekarza/pacjenta) jakość wykonanego badania/oznaczenia, natomiast laboratorium nie potrafi wykazać, że zastosowana metoda była odpowiednia do otrzymanego zlecenia, a wydany wynik poprawny. Gruntowna znajomość charakterystyki metody daje możliwość jej doskonalenia, adaptacji do specyficznych potrzeb zleceniodawcy, pozwala na uzyskanie danych do oszacowania budżetu niepewności pomiaru i co najważniejsze, umożliwia prawidłową interpretację uzyskanych wyników. Ponadto walidacja metod dostarcza informacji o kompetencjach technicznych laboratorium w procesie akredytacji.

Kiedy i w jakim zakresie należy przeprowadzać walidację metody?

Metoda powinna być walidowana, kiedy należy wykazać, że jej parametry są odpowiednie do konkretnego analitycznego problemu. Może to dotyczyć następujących sytuacji:

- wprowadzanie nowej metody,
- udoskonalanie metody lub dostosowywanie jej do nowego problemu,
- gdy kontrola jakości wykaże, że ustalona metoda zmienia się w czasie,
- gdy dana metoda ma być zastosowana przez inny personel, na innej aparaturze.

Norma EN ISO/IEC:15189 zakłada, że laboratorium powinno stosować procedury badawcze spełniające wymagania użytkowników usług laboratorium i odpowiadające rodzajowi badań. Preferowane są procedury

opublikowane w międzynarodowych, krajowych czy regionalnych przewodnikach, zalecane przez organizacje techniczne (np. NCCLS, IFCC). Metody takie są opracowywane i przystosowywane do określonych systemów pomiarowych przez producentów aparatury i/lub odczynników, a następnie wprowadzane do laboratoriów. Przyjmuje się, że walidacja przeprowadzona przez producenta to tzw. walidacja podstawowa, natomiast walidacja przeprowadzona przez laboratorium to tzw. walidacja wtórna.

Walidacja podstawowa.

Walidacja podstawowa swoim zakresem (zgodnie z zapisem normy PN 17025:2001 rozdz. 5.4.5.3.) obejmuje:

- 1) specyfikację wymagań – należy określić parametry analityczne metody, w jakich warunkach ma ona działać oraz z jaką czułością i specyficznością
- 2) określenie cech charakterystycznych metody – zbadanie zgodnie z zaleceniami organizacji zalecających następujących parametrów: czułość analityczną, liniowość, precyzję dla powtarzalności i odtwarzalności, odporność na czynniki zewnętrzne, możliwe interferencje, granice wykrywalności i oznaczalności
- 3) sprawdzenie, czy wyspecyfikowane wymagania mogą być spełnione przez stosowaną metodę
- 4) stwierdzenie walidacyjne o przydatności metody

Walidacja wtórna

Zadaniem walidacji wtórnej jest dokonanie oceny czy dana metoda pomiarowa z jej parametrami analitycznymi może być stosowana w rutynowej pracy laboratorium. W laboratorium medycznym należy rozróżnić walidację związaną z wdrażaniem nowej metody pomiarowej od walidacji metody ustalonej, w stosowaniu której laboratorium posiada doświadczenie. Kluczem do procesu walidacji przeprowadzanej w laboratorium jest ocena wielkości błędu analitycznego. Niezbędne jest ustalenie jakiego rodzaju błędy mogą wystąpić, jakie doświadczenia mogą dostarczyć danych o tych błędach, w jaki sposób przeprowadzić te doświadczenia, ile danych należy zgromadzić, aby właściwie oszacować błędy oraz jakie metody statystyczne pozwolą z uzyskanych danych obliczyć wielkość błędu i wreszcie jaka wielkość błędu jest możliwa do zaakceptowania.

Walidacja nowej metody pomiarowej obejmować powinna:

- zbadanie precyzji w serii jednoczesnej /powtarzalności/ oraz pomiędzy seriami /odtwarzalności/ w stabilnym materiale kontrolnym z obliczeniem odchylenia

standardowego i współczynnika zmienności (SD i CV%)

- ocenę dokładności (poprawności), czyli wyznaczenie wielkości i kierunku błędu systematycznego (D%)
- sprawdzenie liniowości i czułości analitycznej
- weryfikacja granicy wykrywalności /detekcji/ w tych metodach, gdzie jest to istotne /np. pomiary stężeń leków/
- ocenę wpływu substancji interferujących /bilirubina, hemoglobina, lipemia/
- ocenę stabilności metody, jej odporności na czynniki zewnętrzne
- weryfikację zakresu wartości referencyjnych podanych przez producenta
- ocenę przydatności analitycznej metody w stosunku do całkowitego dopuszczalnego błędu metody TEA

Walidacji metody ustalonej dokonuje się z chwilą wprowadzania do niej zmian - udoskonalień czy rozszerzenia. Zakres tej walidacji będzie zależał od rodzaju wprowadzanych zmian. Laboratorium samo decyduje, jakie parametry metody musi ocenić w celu jej zwalidowania. Planując walidację danej metody należy wziąć pod uwagę:

- zakres i dostępność danych z walidacji podstawowej
- wymagania klienta/zleceniodawcy
- ograniczenia finansowe
- możliwości analityczne
- doświadczenie personelu.

Iwona Szkop

Hanna Czeszko - Paprocka

W opracowaniu korzystano z następujących materiałów:

- 1.PN-EN ISO 9000:2001 „Systemy zarządzania jakością. Podstawy i terminologia”
- 2.Grupa Robocza EURACHEM: Przydatność metod analitycznych do określonych celów. Przewodnik walidacji metod w laboratorium i zagadnienia związane. Biuletyn Informacyjny Klubu Polskich Laboratoriów Badawczych POLLAB, Nr 2(Vol. 30), 2000
- 3.PN-EN ISO/IEC 17025:2001 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcowych”
- 4.Wg. EN ISO/IEC 15189:2003 „Medical laboratories – particular requirements for quality and competence”
- 5.Naskalski J.W.: Traceability – wywód metrologiczny i proces przenoszenia poprawności wyników badań laboratoryjnych. Bad. Diagn., Nr 5(Vol.7), 2001
- 6.Materiały szkoleniowe Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce oraz firmy Nova Medical Polska: Wdrażanie systemu jakości w laboratorium medycznym, Gdańsk, grudzień 2003
- 7.Materiały szkoleniowe Centrum Edukacji Menedżerskiej PRMOTOR: Zasady prowadzenia kontroli jakości badań laboratoryjnych, Poznań, luty 2003
- 8.Komitet Techniczny ILAC ds. Technik Akredytacyjnych : Wprowadzenie problematyki niepewności pomiaru w badaniach w związku z wejściem do stosowania normy ISO/IEC 17025, ILAC-G17:2002
- 9.James O. Westgard: Method validation – Selecting a method to validate 2000
- 10.James O. Westgard: Method validation – The inner, hidden, deeper, secret meaning 2000

dokończenie ze strony 2...

na poszczególne województwa lub nadesłanych do Biura drogą pocztową, czy też złożonych bezpośrednio w biurze przez zainteresowane osoby. Wpis na listę diagnostów laboratoryjnych stawał się podstawą wydanego „Zaświadczenia o prawie wykonywania zawodu”, wówczas gdy dostarczone dokumenty (dowód tożsamości, dyplom ukończenia studiów, dyplom specjalizacji, zaświadczenie o zatrudnieniu, bądź świadectwo pracy uwiarygodnione za zgodność z oryginałem oraz złożona rota ślubowania, oświadczenie o niekaralności i fotografie) potwierdzały dane zawarte we wnioskach. Warunkiem wydania „Zaświadczenia” było także potwierdzenie wypełnienia obowiązku uregulowania na bieżąco składek członkowskich. Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych uczestniczyła i współpracowała z Ministerstwem Zdrowia, z Narodowym Funduszem Zdrowia, z Konferencją Okrągłego Stołu – w Komisjach pracujących nad reformami służby zdrowia, w pracach Sejmowej i Senackiej Komisji Zdrowia. Opiniując często, wnosząc uwagi, postulaty do projektów ustaw i rozporządzeń poszczególnych Ministerstw, wyrażane były stanowiska diagnostów laboratoryjnych. Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych wyrażała w wieloraki sposób i wielokrotnie opinię i ocenę dotyczącą istniejących struktur w służbie zdrowia, przyczyn zapaści finansowej w służbie zdrowia oraz zgłaszała projekty i propozycje naprawy, reformy, czy restrukturyzacji służby zdrowia dla poprawienia udzielanych świadczeń zdrowotnych dla pacjenta. Programy te były kierowane na ręce Przewodniczących Komisji, którym patronowało Ministerstwo Zdrowia. Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych w swoim stanowisku, wyrażanym w debatach Okrągłego Stołu, jednoznacznie głosiła, że w pierwszej kolejności należy dokonać analizy przyczyn zadłużenia się jednostek służby zdrowia, a jakiegokolwiek propozycje oddłużenia *carte blanche* dla przekształcających się menadżerów, będzie kolejną zachętą do dalszej niefrasobliwości w dysponowaniu funduszami społeczno-państwowymi. Takie też zostało wyrażone stanowisko KRDL przy Okrągłym Stole. Podobne stanowiska w kwestiach organizacji i funkcjonowania jednostek służby zdrowia, zagadnień praw pacjenta zostały wyrażone i przesłane na ręce przewodniczących Zespołów Roboczych Okrągłego Stołu i Ministerstwa Zdrowia.

Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych uczestniczyła w opracowaniu rozporządzenia MZ dotyczącego niezbędnych badań diagnostycznych wymaganych

przy udzielaniu ubezpieczonym świadczeń zdrowotnych w ramach poz; rozporządzenia określającego standardy jakości wymagane wobec laboratoriów diagnostycznych chcących udzielać świadczeń zdrowotnych oraz rozporządzenia określającego zasady i kierunki uzyskiwania specjalizacji przez diagnostów laboratoryjnych. Czynnie współuczestniczyła w nowelizacji ustawy o diagnostyce laboratoryjnej. Samorząd diagnostów laboratoryjnych (KIDL), dla sprawowania nadzoru nad należytym wykonywaniem czynności diagnostyki laboratoryjnej w sposób kolegialny, opracował kanony Kodeksu deontycznego diagnostów laboratoryjnych, który jest poddany ogólnej konsultacji. Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych zarejestrowała w Sądzie Okręgowym w Warszawie tytuł gazety „Diagnosta Laboratoryjny” i wydała 3 numery gazety, która jest transmisją zadań, celów oraz porad prawnych docierających do wszystkich członków korporacji. Wybór Przewodniczącego Zespołu Wizytatorów i jego zastępcy jest częścią programu działań samorządowych. Ponadto zadania samorządu w ustalaniu standardów realizowane są poprzez udział przedstawicieli KRDL w pracach Ministerialnej Komisji opracowującej wymogi dotyczące warunków i wyposażenia laboratoriów oraz zakresu wymaganych kompetencji przez udzielających świadczenia diagnostyczne. Ilość czynnych zawodowo diagnostów laboratoryjnych, ich zdyscyplinowanie oraz współuczestniczenie w wielu programach inicjowanych przez KRDL wskazuje stosunkowo wysoki procent integracji środowiska. Podejmowane inicjatywy samokształceniowe w poszczególnych województwach przez grupy inicjatywne, niesponsorowane z budżetu państwa, ani też niestymulowane dotąd przez Konsultantów ds. Diagnostyki Laboratoryjnej, ukazują wysoki poziom samoorganizacji i samorządności środowiska. Organizowane sympozja i konferencje, których inspiratorami są przedstawiciele KRDL i członkowie KIDL mają charakter i zasięg ogólnokrajowy o poważnym ładunku naukowym i metodologicznym. Całoroczną działalność KRDL można przedstawić w czterech działach:

1. Organizacja Biura i Struktur Samorządowych.

a. Baza lokalowa i materiałowa Biura KIDL,
b. Wyposażenie i nabycie koniecznych urządzeń elektronicznych i telekomunikacyjnych,

c. Dokumentowanie posiadanych i napływających wniosków o wpis na listę,

d. Tworzenie sieci komunikacyjnej

i korespondencyjnej z różnymi podmiotami administracji państwa, ustawodawstwa, administracji terenowej oraz jednostkami służby zdrowia,

e. Tworzenie przez Biuro komunikacji internetowej dostępnej dla diagnostów w całym kraju,

f. Tworzenie zaplecza porad prawnych dla diagnostów i doradztwa w zakresie restrukturyzacji podmiotów świadczących usługi diagnostyczne.

2. Tworzenie Struktur Samorządowych i nadzoru merytorycznego nad działalnością diagnostyczną, wykonywaną przez diagnostów laboratoryjnych.

a. 7 posiedzeń KRDL,

b. 42 Uchwały KRDL – przekazywane w informacji do MZ,

c. 8 posiedzeń Prezydium KRDL – 4 stanowiska do MZ, NFZ.

d. Mandat dla Przedstawicieli KRDL na poszczególne Województwa w organizowanie i reprezentowanie KIDL w terenie oraz rozwiązywania petycji zgłaszanych przez diagnostów laboratoryjnych do czasu ostatecznego powołania Zespołu Wizytatorów.

3. Tworzenie bazy danych (dokumentacja w teczkach osobowych i elektroniczna) dla wszystkich wniosków złożonych o wpis na listę przez diagnostów laboratoryjnych.

a. Weryfikacja danych zawartych we wnioskach na podstawie zgodności z dostarczonymi dokumentami,

b. Weryfikacja uprawnień do wykonywania czynności i zawodu zgodnie z wymogami ustawy, zbieraną i posiadaną dokumentacją osobową,

c. Opracowanie wzoru i wydawanie „Zaświadczeń” o nabyciu prawa do wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego.

d. Dokumentacja i księgowanie składek w wersji elektronicznej,

e. Przygotowanie i opracowanie własnej bazy danych osobowych i konfigurowanie jej do zobowiązań członków wynikających z płatności składek,

f. Prowadzenie księgowości, buchalterii przychodów i wydatków związanych z działalnością KRDL.

4. Działalność informacyjna i szkoleniowa, kształceniowa.

a. Edytowanie Gazety „Diagnosta Laboratoryjny” o nakładzie: No1-9000, No2 – 10 500 egzemplarzy,

Gazeta jest kolportowana do każdego diagnosty laboratoryjnego składającego wnioski o wpis.

b. Współudział i organizowanie wspólnie z Towarzystwami naukowymi, konferencji, szkoleń i sympozjów, przy równoczesnym wsparciu tych inicjatyw przez KIDL pomocą finansową i poligraficzną.

Ten zakres czynności i działań możliwy był przy wykorzystaniu zapału, pomysłowości i zaangażowaniu osób tworzących Biuro (6 osób), Prezydium KRDL, 29 członków KRDL i 19 Przedstawicieli KRDL na województwa. Poważnym problemem dla realizacji tych zadań stawały się trudności finansowe, przy braku dofinansowania z budżetu państwa inicjatyw KRDL. Tworzące się trudności i spiętrzenie ilości wniosków i dokumentów napływających do KIDL przed ostatecznym terminem określonym w ustawie, przy niezbyt licznych zespołach pracowników biura KIDL uzasadniały wydłużający się okres związany z weryfikacją dokumentów, szczególnie po okresie uprawnomocnienia się nowelizowanej ustawy o diagnostyce laboratoryjnej z dnia 28 sierpnia 2003 roku. Zadaniem na rok następny dla Samorządu diagnostów laboratoryjnych będzie dopracowanie i zakończenie konsultacji w środowisku diagnostów laboratoryjnych dotyczących Kodeksu deontycznego dla diagnostów laboratoryjnych; opracowanie i wyposażenie każdego diagnosty laboratoryjnego w nowy dokument Prawa Wykonywania Zawodu według wzoru przygotowanego przez KRDL i zaakceptowanego przez MZ; dalsza ewidencja czynnych zawodowo diagnostów laboratoryjnych i podmiotów w których udzielane są świadczenia diagnostyki laboratoryjnej (ewidencja laboratoriów); opracowanie programów dla zespołu wizytatorów, standardów jakości i walidacji udzielanych świadczeń diagnostycznych, zgodnie z wymogami międzynarodowymi i zaleceń MZ; opracowanie programu do nowopowstającej ustawy o świadczeniach opieki zdrowotnej finansowanych ze środków publicznych, w której zawarte zostaną zapisy o możliwości kontraktowania przez płatnika świadczeń z diagnostyki laboratoryjnej bezpośrednio z podmiotami prowadzącymi medyczne laboratoria diagnostyczne a umożliwiające pełny dostęp pacjentom do świadczeń diagnostycznych, dalszą konsolidację i integrację środowiska diagnostów laboratoryjnych i dbałość o etyczną i merytoryczną stronę udzielanych świadczeń diagnostyki laboratoryjnej pacjentom. Celem i zadaniem nadrzędnym dla Samorządu diagnostów jest najlepszy i najwyższy poziom świadczeń zdrowotnych udzielanych pacjentom dla utrzymania, ratowania życia i zdrowia.

*Z poważaniem
Prezes
Krajowej Rady
Diagnostów Laboratoryjnych
Dr Henryk Owczarek*

MINISTERSTWO ZDROWIA
SEKRETARZ STANU
Ewa Kralkowska

Pan
Henryk Owczarek
Prezes Krajowej Rady
Diagnostów Laboratoryjnych

W odpowiedzi na pismo (znak: L. dz. 174/05/04) zawierające sprawozdanie z działalności samorządu diagnostów laboratoryjnych za rok 2003 uprzejmie dziękuję za przekazanie wyczerpującej i pełnej informacji na temat funkcjonowania korporacji zawodowej diagnostów.

Jednocześnie pragnę wyrazić uznanie dla osób zaangażowanych w proces tworzenia struktur samorządu diagnostów laboratoryjnych. Sprawnie przeprowadzony wybór członków organów Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych, tj. Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych, Komisji Rewizyjnej, Wyższego Sądu Dyscyplinarnego i Sądu Dyscyplinarnego oraz niezwłoczne podjęcie pracy przez ww. organy pozwoliło samorządowi diagnostów na szybkie rozpoczęcie realizacji zadań nałożonych na niego przepisami ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (Dz. U. Nr 100, póź. 1083 z późn. zm.).

Podkreślenia wymaga czynne zaangażowanie się diagnostów laboratoryjnych w działania mające na celu wypracowanie korzystnych i powszechnie akceptowalnych rozwiązań problemów stojących przed systemem ochrony zdrowia, a w szczególności aktywny udział w pracach Konferencji Okrągłego Stołu w Ochronie Zdrowia. Również współpraca w ramach prac legislacyjnych m.in. nad nowelizacją ustawy o diagnostyce laboratoryjnej oraz

ciąg dalszy na stronie 12.

Cytometria przepływowa w diagnostyce laboratoryjnej
Postęp jaki dokonał się w ostatnim dziesięcioleciu w diagnostyce zaburzeń układu krwiotwórczego stwarza możliwości coraz skuteczniejszych interwencji terapeutycznych. Postęp ten wynika głównie z możliwości oceny fenotypu komórek krwi i szpiku czyli ekspresji determinant antygenowych błon komórkowych, struktur cytoplazmatycznych oraz jąder (22). Taka analiza umożliwia określenie do jakiej linii rozwojowej należy dana komórka, jaki jest jej stopień zróżnicowania i dojrzałości oraz stan czynnościowy (34). Informacje te mają fundamentalne znaczenie w wyborze właściwej terapii oraz rokowaniu co do przebiegu choroby. Dokładna charakterystyka fenotypowa jest również jednym

z licznych warunków niezbędnych do pomyślnego przeszczepienia szpiku kostnego (33).

Możliwość szybkiej i wieloparametrowej analizy fenotypowej komórek układu krwiotwórczego powstała dzięki zastosowaniu cytometrii przepływowej (23). Metoda ta pozwala na jednoczesne określenie kilku rodzajów antygenów różnicowania (CD) poprzez użycie przeciwciał monoklonalnych dwu-, trój- lub cztero-kolorowych. Podstawowym warunkiem wykonania analizy cytometrycznej jest doprowadzenie posiadanego materiału do zawiesiny pojedynczych komórek. Przy pobieraniu materiału do analizy cytometrycznej stosuje się odpowiednie antykoagulanty, a ich dobór zależy od stosowanej procedury (np. w procedurze dla krwi pełnej zalecany jest EDTA-K2 dk krwi żyłnej i heparyna lub hirudyna dla szpiku). W uzyskanej zawieszynie komórek należy określić ich żywotność z uwagi na nieswoiste wiązanie przeciwciał przez komórki nekrotyczne (38).

We współczesnej, rutynowej diagnostyce hematologicznej podstawowe miejsce cytometrii przepływowej to określenie fenotypu komórek blastycznych w białaczkach ostrych, szukanie choroby resztkowej i molekulej oporności wielolekowej. Dzięki tym metodom wzrosły szanse pacjentów na przeszczepienie szpiku zakończone powodzeniem (23).

Cytometria przepływowa w diagnostyce białaczek ostrych

Cytometria przepływowa w diagnostyce białaczek ostrych pozwala na określenie fenotypu komórek blastycznych (fenotypów białaczko-wych), takich gdzie na komórkach obecne są struktury normalnie nie występujące lub brak jest struktur obecnych na komórkach prawidłowych (7).

Użycie odpowiednich zestawów przeciwciał monoklonalnych (paneli) pozwala na określenie pochodzenia komórek blastycznych, stopnia ich dojrzałości i zróżnicowania. Badanie fenotypu komórek blastycznych białaczki powinno być wykonane równolegle do oceny hematologicznej rozmazu i mielogramu oraz badań cytochemicznych (klasyfikacja FAB). Przy wykorzystaniu fenotypów komórek blastycznych do interpretacji klinicznej, należy pamiętać, że muszą być spełnione kryteria wg FAB (27). Jeżeli obok markerów linii mieloidalnej wykrywa się obecność markerów innych Unii komórkowych, mówimy o tzw. koekspresji, dwuliniowości czy dwuklonalności (25). Zastosowanie analizy cytometrycznej ma szczególne znaczenie w sytuacji,

gdy barwienia cytochemiczne są ujemne i istnieje ryzyko mylnego zakwalifikowania komórek blastycznych jako niezróżnicowanych. Niesie to za sobą konsekwencje niewłaściwego sposobu leczenia chorego. Powszechnie wiadomo, że trafność rozpoznawania białaczek ostrych w oparciu o klasyfikację FAB nie przekracza 80% nawet w zespołach o dużym doświadczeniu hematologicznym. Błędy w rozpoznawaniu dotyczą głównie postaci OBS (ostre białaczki szpikowe = OBNL (ostre białaczki nieлимfoblastyczne): M4 (białaczka mielomonocytowa), M5 (monocytowa), M6 (erytroleukemia) i MDS (zespoły mielodysplastyczne), (typ RAEB) niedokrwistość oporna na leczenie, ze zwiększonym odsetkiem blastów) a także białaczek limfoblastycznych (typ LI, L2) (11). Przy pomocy klasyfikacji FAB podtypy MO (OBS niezróżnicowana) i M7 (OBS megakarioblastyczna) nie są w ogóle rozpoznawane (17).

Wiadomo także, że ponad 40% OBL jest PAS ujemna a 15% OBNL może wykazywać cechy mielodysplazji trójukładowej. Ogromnym ograniczeniem badań cytochemicznych jest również brak możliwości określenia linii, do której należą limfoblasty (B, T, czy NK) (24, 35). Przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych i cytometrii przepływowej trafność rozpoznania zwiększyła się do około 95%, a klasyfikacja ostrych białaczek uległa poszerzeniu, szczególnie w przypadku OBL (Tab.I). W przedstawionych klasyfikacjach podano jedynie antygeny podstawowe, mające znaczenie zasadnicze dla rozpoznania w/w białaczek. Panele te są coraz bardziej rozbudowywane w zależności od ich dostępności na rynku, możliwości finansowych oraz doświadczenia diagnostów.

Wykorzystanie cytometrii przepływowej do oceny fenotypu komórek blastycznych pozwoliło również na stwierdzenie obecności na komórkach białaczkowych determinant innych linii i ujawnienie występowania białaczek mieszanych (1,12). W klasyfikacji nietypowych fenotypów komórek blastycznych proponowane są następujące określenia: białaczka dwufenotypowa (jednorodna populacja komórek blastycznych z determinantami komórek różnych linii), dwuliniowa (dwie subpopulacje komórek blastycznych różne fenotypowo) oraz mieszanokomórkowa (AMLL, komórki blastyczne wykazują obecność determinant z różnych Unii). Jeżeli na limfoblastach obecne są dodatkowo markery Unii mieloidalnej to białaczkę opisuje się jako ALL+My, zaś determinanty limfo-

idalne obecne na komórkach linii mieloidalnej opisuje się jako AML+Ly (2). Do antygenów limfoidalnych wykrywanych na komórkach blastycznych w OBS należą: CD2(57%), CD5(60%), CD7(37)%. Znacznie rzadziej w OBS spotyka się antygeny linii B komórkowej: CD10, CD19, CD24. Nie znana jest rola koekspresji antygeny CD56. W OBL obserwuje się najczęściej koekspresję markerów CD13 i CD33(~35%) (25). Zdania hematologów na temat wpływu koekspresji na przebieg i rokowanie białaczek są podzielone. Najczęściej jednak, taka koekspresja determinant związana jest z gorszą odpowiedzią na leczenie indukujące i jest traktowana jako czynnik o złym znaczeniu rokowniczym (12).

Cytometria przepływowa w diagnostyce chłoniaków

Cytometria przepływowa została wykorzystana do opracowania nowej klasyfikacji chłoniaków nieziarniczych (REAL) (19). Poprzednie klasyfikacje (Kilońska, Working Formulation), oparte głównie na kryteriach morfologicznych były rozdrobnione i nie zawsze czytelne dla klinicysty. Klasyfikacja REAL ma na celu powiązanie rozpoznania z obrazem klinicznym, sposobem leczenia i rokowaniem (15). Badanie fenotypu komórkowego powinno być wykonane równolegle do oceny histologicznej węzła chłonnego lub biopsji guza. Określenie fenotypu komórek chłoniaka nieziarniczego wymaga zestawu innych niż w białaczkach ostrych, przeciwciał monoklonalnych (35). Dużą zaletą cytometrii przepływowej jest możliwość oceny fenotypu komórek pobranych z wtórnego źródła zmiany chorobowej, w przypadku braku dostępu do guza (np. płynu opłucnowego, płynu otrzewnowego).

Cytometria przepływowa w diagnostyce białaczek przewlekłych

Cytometria przepływowa umożliwia określenie fenotypu komórek przewlekłej białaczki limfatycznej i różnicowanie jej z chłoniakami B komórkowymi (8). W CLL stwierdza się obecność limfocytów B o następującym fenotypie: HLA-DR+, CD19+, CD5+/CD19+, CD22+. Znaczenie rokownicze ma oznaczenie ekspresji antygenów CD23 i CD38.

Ocena cytometryczna pozwala także na ocenę fenotypu komórkowego w kryzysie przewlekłej białaczki szpikowej, w której u 20-30% chorych występuje przełom limfoblastyczny (najczęściej z cIg (cytoplazmatyczną Ig) lub antygenem Calla, najrzadziej z markerami linii T) (40).

Zespoły mielodysplastyczne (MDS) i cytometria przepływowa

Zespoły mielodysplastyczne stanowią duży problem kliniczno-diagnostyczny. Cytometria przepływowa w MDS wykorzystywana jest przede wszystkim do poszukiwania komórek o nieprawidłowym fenotypie (np. jednoczesna ekspresja CD2 i CD19) oraz do wychwycenia transformacji w ostrą białaczkę. Różnorodność zaburzeń w obrębie wielu linii komórkowych utrudnia ujednolicenie kryteriów rozpoznawczych MDS w oparciu o fenotyp komórkowy (23).

Poszukiwanie choroby resztkowej (MRD)

Wykrywanie choroby resztkowej (MRD - minimal residual disease) u pacjentów z ostrymi białaczkami polega na wyodrębnieniu populacji komórek białaczkowych spośród populacji komórek o prawidłowym fenotypie (16). Wykrycie MRD pozwala na eliminację jednej z przyczyn niepowodzeń transplantacji, jaką jest nawrót choroby rozrostowej. Podobne znaczenie ma poszukiwanie komórek mikrometastatycznych w szpiku kostnym pacjentów z chorobą nowotworową (30). Różne ośrodki prowadzą badania mające na celu opracowanie fenotypów białaczkowych pozwalających na wykrycie MRD. Bardzo często w celu wykrycia MRD łączy się ocenę fenotypu komórek z analizą DNA. Takim przykładem mogą być białaczki ALL (ostre białaczki limfoblastyczne) z obecnością aneuploidalnych blastów. Różnicuje się je z komórkami diploidalnymi po chemioterapii. Zaleca się wtedy oznaczenie antygenów CD34, CD10, CD19 z jednoczesną analizą cytometryczną DNA (28). W białaczkach T komórkowych problem polega na tym, że większość antygenów CD występuje zarówno na zdrowych jak i białaczkowych komórkach T. W poszukiwaniu choroby resztkowej wykorzystuje się również oznaczanie ilościowe antygenów CD3 i CD7. Stwierdzono, że komórki patologiczne T mają znamienne mniej cząsteczek CD3 i znamienne więcej cząsteczek CD7 na swojej powierzchni (13). W przypadku białaczek T komórkowych wykorzystuje się również ocenę genów łańcuchów beta dla receptorów TCR, które w komórkach białaczkowych mogą ulec rearanzacji (21). W myeloma multiplex zaleca się oznaczanie antygeny CD17 na komórkach plazmatycznych w połączeniu z antygenem CD38 (29). Ocena choroby resztkowej w białaczkach szpikowej przewlekłej opiera się na analizie chromosomalnej. Cytometria przepływowa umożliwia wykrycie hybryd BCR/ABL przy jednoczesnym zastosowaniu techniki odwrotnej transkrypcji (RT-reverse transcription) i PCR (polymerase chain reaction) (42).

Ocena obecności molekuly lekooporności

Oporność wielolekowa (MDR) powoduje niewrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapię (31). Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za ten fenomen jest redukcja akumulacji leku wewnątrz komórki w zależności od aktywności transbłonowego białka transportowego o ciężarze cząsteczkowym 170 kDa. Białko to jest produktem genu *mdr1* zwanym P-glikoproteiną (P-gp) (6). P-gp działa jako ATP-zależna pompa, powodująca wypływ leków czy toksyn z komórki. W szpiku kostnym P-gp jest wykrywana na komórkach CD34+ (komórki hemopoetyczne stem). W limfocytach P-gp występuje głównie na populacji CD56+ (NK), CD8+ (cytotoksyczne/supresorowe), CD20+ (limfocyty B) i znacznie mniejszym stopniu na limfocytach CD4+ (pomocnicze) (41). Wysoka ekspresja P-gp obserwowana jest zarówno w białaczkach jak i guzach litych i jest odpowiedzialna za niewrażliwość na chemioterapię. Zaobserwowano, że w komórkach ostrych białaczek, szpiczaka, chłoniaków nieziarniczych, nowotworów płaskonabłonkowych i jajnika, początkowo niska ekspresja P-gp, wzrasta często po leczeniu, stanowiąc tym samym poważny problem cyklicznej terapii.

Do oceny oporności wielolekowej stosuje się czynnościową analizę cytometryczną wypływu znakowanego fikoerytryną R123 lub przeciwciała monoklonalne znakowane fikoerytryną, skierowane przeciwko zewnątrzkomórkowemu epitopowi P-gp (41). Obok cytometrii przepływowej stosuje się również techniki immunohistochemiczne lub RT-PCR do oceny mRNA białka P-gp (6).

Badania komórek krwiotwórczych

Cytometria przepływowa jest najlepszą metodą określenia liczby macierzystych komórek krwiotwórczych we krwi obwodowej, pępowinowej czy szpiku w przypadkach planowanych autoprzeszczepów, diagnostyce anemii aplastycznych i wielu innych (4). W różnych stanach klinicznych (ocena funkcji układu krwiotwórczego, przeszczepianie tkanki krwiotwórczej i monitorowanie tego procesu) oznacza się najczęściej antygen CD34, odpowiedzialny za przyleganie komórek krwiotwórczych do elementów podścieliska. Ponieważ antygen CD34 nie występuje na późnych komórkach ukierunkowanych i dojrzających, w praktyce do ich rozdzielenia stosuje się również oznaczanie antygenu CD38, obecnego na komórkach nie-macierzystych (36). Uważa się, że fenotyp ludzkiej komórki krwiotwórczej określony metodą cytometrii

przepływowej ma ekspresję następujących antygenów: CD34+ CD7- CD10- CD13- CD19- CD33- CD38- CD71-. Przy oznaczaniu antygenu CD34 należy pamiętać o inaktywacji receptora Fc w celu eliminacji wiązań nieswoistych (4).

Ocena DNA w komórkach białaczkowych

Cytometria przepływowa umożliwia zarówno ocenę jakościową DNA jak i rozkład komórek w zależności od faz cyklu komórkowego na S, G₀/G₁, G₂/M (37). DNA oznacza się za pomocą jodku propidyny. Histogramy DNA pozwalają na określenie procentu komórek w fazie S (SPF), indeksu proliferacji jako liczby komórek w fazie S+G₂/M oraz ploidii DNA. Cytometryczna ocena ploidii DNA i SPF jest szeroko stosowana do prognozowania przebiegu choroby nowotworowej i oceny odpowiedzi na leczenie (9). Możliwość wykorzystania analizy DNA w komórkach nowotworowych ma szczególnie duże znaczenie przy jednoczesnej ocenie obrazu histopatologicznego i klinicznego. Stwierdzono jednoznacznie korelację pomiędzy indeksem DNA, aberracjami chromosomalnymi, stopniem histopatologicznym i stanem klinicznym (44).

Cytometria przepływowa w badaniach płytek krwi

Cytometria przepływowa znalazła zastosowanie w ocenie morfologii i czynności płytek krwi. Obecne procedury oparte są na stosowaniu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko glikoproteinom, obecnym na płytkach aktywowanych lub nie pobudzonych (30). Pojawienie się cytometrii przepływowej i stosowanie przeciwciał monoklonalnych rozpoznających antygeny błonowe stworzyło nowe możliwości oceny funkcji aktywacji płytek krwi. Glikoproteina GMP-140 (granule membranę protein 140) zwana inaczej PADGEM (platelet activation-dependent granule external membranę protein), P-selectyną i antygenem CD62P jest integralną składową błon a ziarnistości. Obecność cząstki GMP-140 na powierzchni płytek uznano za typowy marker ich aktywacji i wystąpienia reakcji uwalniania. Podobną rolę markera aktywacji pełni GP53 - białko błonowe lizosomów (LIMP, antygen CD63), czy też CD31 (GPIIa, molekula endotelialna płytkowa) stwierdzone na powierzchni krążących we krwi pobudzonych trombocytach (10). Analiza cytometryczna fenotypu płytek krwi jest wykorzystywana między innymi do oceny płytek w płytkofezie (CD41a, CD42b, CD62P, CD63) (14).

Cytometria przepływowa w diagnostyce retikulocytów i erytrocytów

Cytometryczna ocena liczby retikulocytów (flow cytometric reticulocyte count), oparta jest na pomiarze intensywności fluorescencji zależnej od zawartości RNA w retikulocycie. Najczęściej stosowanymi fluorochromami są oranż tiazolowy, auramina i bromek etydyny. Metoda cytometryczna dzieli retikulocyty na 3 grupy w zależności od zawartości RNA: o wysokiej zawartości RNA (HFR-high fluorescent ratio), średniej (MFR-medium fluorescent ratio) i niskiej zawartości RNA (LFR-low fluorescent ratio). Do celów diagnostycznych oblicza się wskaźnik IFR (immature fraction of reticulocyte), który jest sumą HFR i MFR (43). W diagnostyce klinicznej niedokrwistości szczególne miejsce zajmuje HFR, który ulega zmianom wcześniej niż inne parametry hematologiczne. Najczęściej analiza cytometryczna retikulocytów wykorzystywana jest do oceny i różnicowania anemii aregeneracyjnej od dyserytropoezy (45), oceny odpowiedzi na leczenie erytropoetyną lub stymulację cytokinami (46), ilościowej oceny retikulocytów u pacjentów dializowanych, (20), dawców krwi (32) oraz jako wykładnika odzwierciedlania erytropoezy po chemioterapii (26).

Cytometryczna analiza ekspresji erytrocytarnych antygenów powierzchniowych CD55 i CD59 wykorzystywana jest do diagnostyki nocnej napadowej hemoglobinurii (18) a ekspresja antygenu CD36 w diagnostyce anemii sierpowatej (5). Ocena CD71 i Gly pomocna jest w wykrywaniu erytrocytów opornych na hemolizę (HRCs-haemolyser resistant cells).

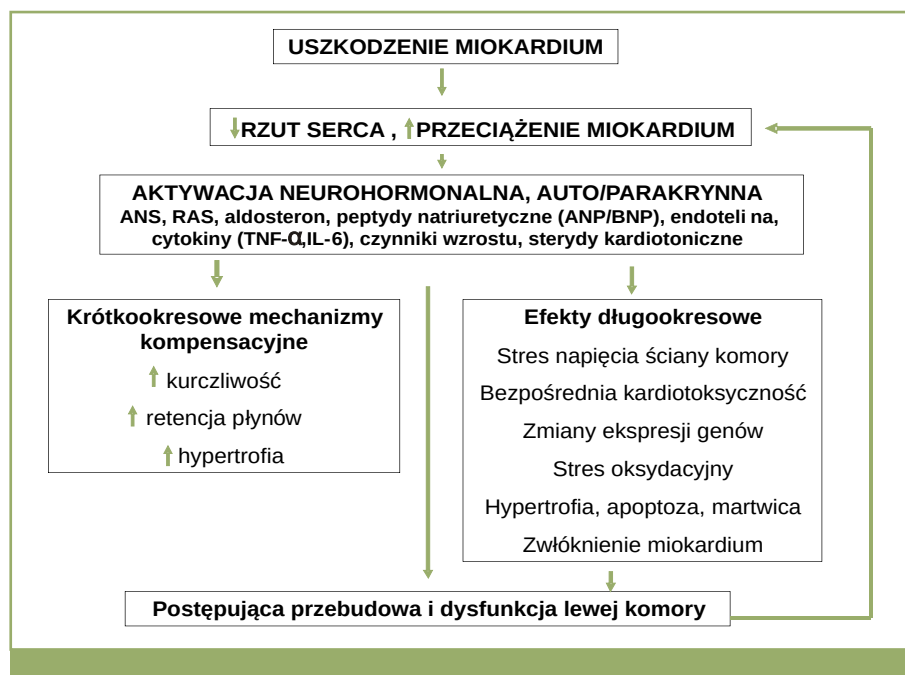
Podsumowanie

Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce hematologicznej i badaniach klinicznych w Polsce są znaczące. Dzięki niej poprawiły się możliwości zdiagnozowania chorego, kontroli procesu leczenia czy nadzoru remisji. Coraz częściej wykorzystuje się cytometrię przepływową do oceny transportu błonowego, wpływu leków na cykl komórkowy, w badaniach struktur komórki, jej funkcji i apoptozy. Ten ogromny postęp diagnostyczny trwa nadal i już teraz stwarza bogatą ofertę dla wielu dziedzin medycyny, nie tylko hematologii.

Mirosława Pietruczuk
Zakład Diagnostyki Hematologicznej
AM w Białymstoku

Literatura dostępna u autora

Współczesna medycyna kliniczna stawia przed diagnostyką laboratoryjną nowe wyzwania. Te nowe wyzwania to poszukiwania coraz to doskonalszych biomarkerów, które pozwolą nie tylko na diagnostykę i monitorowanie stanów patologicznych, ale również na wczesne wykrycie zagrożenia rozwojem choroby tak, aby zahamować lub istotnie spowolnić ten proces poprzez zastosowanie najbardziej adekwatnego postępowania z pacjentem i wybór skutecznej farmakoterapii. Warunkiem niezbędnym sprostania tym wymaganiom jest poznanie czynników ryzyka, molekularnych mechanizmów patogenezy i procesów adaptacyjnych organizmu. Przykładem z ostatnich lat może być niewydolność serca, która stała się w krajach rozwiniętych jednym z ważniejszych, jeśli nie najważniejszych zespołem pośród chorób sercowo-naczyniowych. Zapadalność w populacji ogólnej jest bardzo wysoka (3 - 20 przypadków na 1000). Zatrważająco ogromna jest wśród pacjentów powyżej 65-go roku życia (30 - 130 przypadków na 1000). Śmiertelność w tej grupie osób wynosi aż 45% rocznie. Przyczyną rozwoju niewydolności serca jest uszkodzenie miokardium powodowane przez zawał mięśnia sercowego, myocarditis, dysfunkcja zastawek a także nadciśnienie tętnicze, otyłość i cukrzyca, które powodują przeciążenie objętościowo-ciśnieniowe serca. Czynniki ryzyka są również: nikotynizm, niska aktywność fizyczna, płeć męska oraz niskie wykształcenie. Reakcją na spadek rzutu serca oraz zwiększone przeciążenie jest aktywacja neurohormonalna i auto/parakrynną uruchamiana jako mechanizm adaptacyjny (Rycina 1). Szczególnie istotną wydaje się być aktywacja sympatycznego układu nerwowego (ANS - noradrenalina) oraz układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) a także wzrost syntezy peptydów natriuretycznych, endoteliny, cytokin (TNF- α , IL-6) i steroidów kardiologicznych (kardenolidów). Wysokie stężenia krążących neurohormonów wraz z czynnikami mechanicznymi i genetycznymi powodują przebudowę (remodeling) prowadzący do zmiany wielkości, kształtu i funkcji lewej komory serca (rycina 1). Przebudowa (remodeling) serca charakteryzuje się zmienioną ekspresją genów tzw. „płodowym” lub hipertroficznym programem genetycznym, który prowadzi do rozrostu miocytów, zwłóknienia serca oraz ubytku komórek na drodze apoptozy i/lub martwicy. Efektem tych zmian jest powiększenie komory prowadzące do dysfunkcji skurczowej i/lub rozkurczowej.



Poza przemianami funkcjonalnymi następuje także szereg zmian biochemicznych dotyczących głównie metabolizmu energetycznego oraz zaburzeń jonowych polegających na dysregulacji wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Udział w tym procesie mają kardenolidy – endogenne sterydy kardiologiczne, które hamują aktywność błonowej Na^+K^+ ATP-azy i sprzężony z nią system transportu wapnia. Czynnikiem inicjującym proces remodelingu wydaje się być aktywacja adrenergicznego układu nerwowego. Pobudzenie adrenoreceptorów α_1 i β_2 , a także receptorów angiotensyny II uruchamia wewnątrzkomórkowe sygnały, których efektem jest przebudowa serca. Postulowany jest również udział w tym procesie aldosteronu, endoteliny-1 oraz cytokin. Odpowiedzią kardiomiocytów na czynniki prowadzące do remodelingu jest zwiększona synteza peptydów natriuretycznych ANP i BNP. Fizjologiczne właściwości tych peptydów: natriureza, rozkurcz naczyń, hamowanie adrenergicznego układu nerwowego, antagonizm w stosunku do układu renina – angiotensyna – aldosteron oraz hamowanie aktywności endoteliny-1, predysponują je do zajęcia miejsca jako głównego mechanizmu adaptacyjnego.

Poznanie szlaku patogenezy oraz mechanizmów komórkowych i molekularnych niewydolności serca ma szereg implikacji klinicznych. Jedną z nich jest propozycja nowej klasyfikacji niewydolności serca podana przez American College of Cardiology i American Heart Association opartej na etapach rozwoju choroby.

Klasyfikacja ta definiuje cztery stadia niewydolności serca: A, B, C i D. Pacjenci w stadium A nie wykazują jeszcze ani zmian strukturalnych w sercu ani objawów choroby, ale są obarczeni wysokim ryzykiem. Pacjenci w stanie B są również bezobjawowi, ale stwierdza się już u nich zmiany strukturalne w postaci zmiany kształtu lewej komory serca. W stadium C choroba przybiera postać pełno objawową. Stadium D to końcowy etap, w którym dochodzi do załamania objawów i wymagana jest specjalna interwencja w postaci wspomagania krążenia sztucznymi komorami i/lub przeszczep serca. Klasyfikacja ta pociąga to za sobą konieczność przyjęcia stosownej strategii diagnostycznej polegającej na wczesnym wykryciu choroby jeszcze w stadiach bezobjawowych lub skąpoobjawowych, ocenie ryzyka rozwoju i monitorowania sukcesu terapeutycznego.

Obecnie kryteria markerów niewydolności serca spełniają cztery typy biomolekuł: 1) peptydy natriuretyczne typu A i B (ANP, BNP), które są wydzielane przez kardiomiocyty w odpowiedzi na przeciążenie serca, 2) kardenolidy (DLIF - czynnik digoksynopodobny i OLF - czynnik ouabainopodobny) jako hormony syntetyzowane w korze nadnerczy, które są potencjalnie zaangażowane w proces rozwoju choroby, 3) zapalne cytokiny (TNF- α , IL-6) jako aktywne biologicznie cząsteczki produkowane zarówno przez serce jak i tkanki obwodowe w odpowiedzi na uszkodzenie i zmniejszoną perfuzję obwodową oraz 4) troponiny (cTnT i cTnI) jako markery zaniku kardiomiocytów na

drodze apoptozy i/lub martwicy.

Szczególną pozycję wśród biochemicznych markerów niewydolności serca zajmują peptydy natriuretyczne a przede wszystkim BNP i NT-proBNP. BNP jest peptydem aktywnym biologicznie, podczas gdy NT-proBNP jest produktem proteolitycznego przekształcenia pro-BNP niewykazującym aktywności hormonalnej. Oba peptydy różnią się znacznie stabilnością zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Okres biologicznego półtrwania BNP wynosi zaledwie około 20 min., podczas gdy NT-proBNP 60-120 min. BNP wykazuje jednak znacznie lepszą korelację pomiędzy stężeniem a fizjologicznymi i klinicznymi warunkami ostrych zmian hemodynamicznych. Szereg badań wykazało przydatność oznaczania stężenia obu tych peptydów w różnicowej diagnostyce duszności, monitorowaniu przebiegu choroby a także skuteczności zastoso- wanego leczenia.

Kandydatami na biomarkery niewydolności serca są, więc bardzo różne cząsteczki, od małych endogennych molekuł kardenolidów do dużych peptydów takich jak peptydy natriuretyczne, endoteliny-1 i białek, którymi są cytokiny i troponiny. Przedstawione tu biomarkery stanowią cząsteczki uwalniane z kardiomiocytów podczas normalnej homeostazy (ANP, BNP), jak i syntetyzowane poza sercem (kardenolidy), ale i także uwalniane w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek (cytokiny zapalne). Wydaje się, że biomarkery, które są zaangażowane w etiologię niewydolności serca, szczególnie deregulację transportu jonów stanowią

Grupa markerów	Typ cząsteczki	Miejsce syntezy
Peptydy natriuretyczne ANP BNP NT-pro BNP	Peptyd Peptyd Peptyd	Przedsionki serca Komory serca Komory serca
Sterydy kardiogeniczne DLIF	Steroid Steroid	Kora nadnerczy Kora nadnerczy
Cytokiny TNF - α IL - 6	Białko Białko	Komórki śródbłonna, makrofagi, mitocyty
Endotelina - 1	Peptyd	Komórki śródbłonna
Troponiny (cTnI i cTnT)	Białko	Kardiomyocyty

Tabela 1. Charakterystyka potencjalnych biomarkerów niewydolności serca

grupę biochemicznych molekuł, które mogą odzwierciedlać najwcześniejsze stadia procesu chorobowego i stanowić podstawę do wyboru terapii i przewidywać progresję choroby. Tylko badania podstawowe dotyczące szczegółowych molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój wieloczynnikowego, kompleksowego zespołu niewydolności mogą doprowadzić do zrozumienia tego procesu i wyboru markerów, które pozwolą przewidywać zarówno zagrożenie, jak i szybko diagnozować, a także wskazywać najkorzystniejszy sposób leczenia i monitorować jego przebieg.

Prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz.
Zakład Biochemii Klinicznej
Instytut Kardiologii - Warszawa

Literatura.

1. Jortani S.A., Prabhu S.D., Valders Jr. R. Strategies for developing biomarkers of heart failure. Clin. Chem., 50, 265-278 (2004).
2. Clerico A., Emdin M., Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: A review. Clin. Chem., 50, 33 – 50 (2004).
3. Baciorek B., Styczkiewicz K. Rola peptydu natriuretycznego typu B w diagnostyce i rokowaniu niewydolności serca. Badanie i Diagnostyka, 8, 89-94 (2002)
4. Suzuki T., Yamazaki T., Mazaki Y., The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. Cardiovasc. Res., 51, 489-494 (2001).
5. Kalra P.R., Anker S.D., Coats A.J.S., Water and sodium regulation in chronic heart failure: the role of natriuretic peptides and vasopressin. Cardiovasc. Res., 51, 495-509 (2001).
6. Brunner-La Rocca H.P., Kiowski W., Ramsay D., Sutsch G., Therapeutic benefits of increasing natriuretic peptide levels. Cardiovasc. Res., 51, 510-520 (2001).
7. Jessup M., Brozena S., Heart failure., N. Engl. J. Med. 348, 2007-2018 (2003).

dokończenie ze strony 8...

wydawanymi na podstawie zawartych w niej delegacji rozporządzeń wpłynęła korzystnie na jakość tych aktów prawnych.

Odnosząc się do przedstawionych w sprawozdaniu działań samorządu diagnostów laboratoryjnych, których podjęcie planowane jest w bieżącym roku, informuję o szczególnym znaczeniu nadzoru sprawowanego przez przedstawicieli samorządu nad jakością i standardami udzielanych przez diagnostów laboratoryjnych świadczeń zdrowotnych. Sprawowanie nadzoru nad wykonywaniem zawodu przez członków samorządu jest jednym z głównych celów działania korporacji zawodowej diagnostów (obok reprezentowania interesów diagnostów laboratoryjnych oraz umożliwiania im stałego podnoszenia kwalifikacji zawodowych). Zakończenie zaplanowanych na 2004 r. prac, w szczególności stworzenie programów dla zespołów wizytatorów,

standardów jakości i walidacji udzielanych przez diagnostów świadczeń zdrowotnych wpłynąć powinno na wzmocnienie i usprawnienie nadzoru samorządu nad działalnością diagnostów laboratoryjnych.

Równocześnie uprzejmie informuję, że wszelkie działania podejmowane przez samorząd diagnostów laboratoryjnych mające na celu poprawę jakości i efektywności funkcjonowania systemu ochrony zdrowia mogą liczyć na poparcie ze strony Ministerstwa Zdrowia.

Uprzejmie przypominamy wszystkim PT. Diagnostom laboratoryjnym, którzy do tej pory nie otrzymali "Zaświadczenia" o wpisie na listę diagnostów laboratoryjnych, będące jednocześnie prawem wykonywania zawodu, aby w trybie pilnym kontaktowali się z biurem KIDL w celu wyjaśnienia brakujących danych osobowych, bądź zobowiązań finansowych względem korporacji. Są to bowiem główne przyczyny nieotrzymania "Zaświadczenia" przez Tych z Państwa.

Informacja dla PT Dyrektorów publicznych i niepublicznych zakładów opieki zdrowotnej posiadających w swojej strukturze organizacyjnej medyczne laboratoria diagnostyczne. Uprzejmie informuję, że zgodnie z ustawą z dnia 27-07-2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (Dz. U. 01.100.1083 z póź. zm.) do kierowania medycznymi laboratoriami diagnostycznymi oraz do autoryzacji wyników badań laboratoryjnych wykonywanych w medycznych laboratoriach diagnostycznych uprawnieni są wyłącznie diagnosty laboratoryjni posiadający wpis na listę diagnostów laboratoryjnych prowadzoną w KIDL i legitymujący się "Zaświadczeniem" o prawie wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego. Diagnosty laboratoryjni posługujący się pieczęcią o ustalonym wzorze (Uchwała nr 42/2003 KRDL z dnia 19 grudnia 2003 r.)

Z poważaniem
Sekretarz KRDL
Czesław Główniak

Nasienie dostarczane do laboratorium jest z reguły nasieniem ejakulowanym pobieranym drogą masturbacji. Ejakulowane plemniki zdrowego, płodnego mężczyzny są komórkami, które zostały wytworzone w procesie spermatogenezy w jądrach, przeszły proces dojrzewania w jądrach i krótko były magazynowane w nasieniowodach i bańce nasieniowodów. Bezpośrednio przed ejakulacją plemniki zostają zawieszone w mieszaninie wydzieliny gruczołu prostaty i pęcherzyków nasiennych i gruczołów opuszkowocewkowych, które wraz z płynem nasiennym tworzą plazmę nasienia. Dlatego ogólna ocena nasienia opierająca się na ocenie takich parametrów jak: liczba plemników, ich ruch, morfologia i żywotność jest kontrolą procesu spermatogenezy i dojrzewania plemników i jedynie pośrednio wskazuje na zdolności funkcjonalne męskich komórek rozrodczych do zapłodnienia komórki jajowej. Dodatkowe parametry oceny ogólnej nasienia takie jak objętość ejakulatu, pH i lepkość plazmy nasienia obecność leukocytów wskazują na prawidłowość funkcjonowania gruczołów dodatkowych. Plemniki w narządzie rozrodczym kobiety podlegają dalszym zmianom funkcjonalnym i morfologicznym, określanym jako procesy kapacytacji i reakcji akrosomalnej. Ich następstwem jest nabycie przez gamety męskie zdolności fuzji z owulowanym oocytom. Jednocześnie populacja plemników podlega intensywnej selekcji, której biologiczne kryteria nie są poznane. Selekcja ta prowadzi do znacznego ograniczenia liczby plemników, przedostających się w pobliże komórki jajowej. Ocenie opisanych zjawisk służą tzw. testy funkcjonalne plemników prowadzone in vitro (Rys.1, Tabela 1). Zarówno ogólne badania nasienia, jak i testy funkcjonalne plemników wskazane przez WHO (1999), są metodami manualnymi, nie zautomatyzowanymi i dlatego wymagającymi szczególnie intensywnej i skrupulatnej kontroli wewnątrz laboratoryjnej jak i między laboratoryjnej. Dlatego w poszukiwaniu nowoczesnych metod oceny nasienia istnieje tendencja do opracowania takich testów, które umożliwią automatyzację i obiektywizację ocenianych parametrów. Kontrowersyjny, chociaż w wielu przypadkach udokumentowany spadek jakości nasienia mężczyzny i obniżająca się płodność par pragnących potomstwa skłania do poszukiwania metod diagnostycznych o wysokiej wartości predyktoryjnej dla oceny szans pomyślnej koncepcji (Skakkebaek i wsp. 2001, Jorgensen N i wsp.2001). Proponowane

Rys.1
Udział badań laboratoryjnych w kontroli rozwoju i funkcji plemników

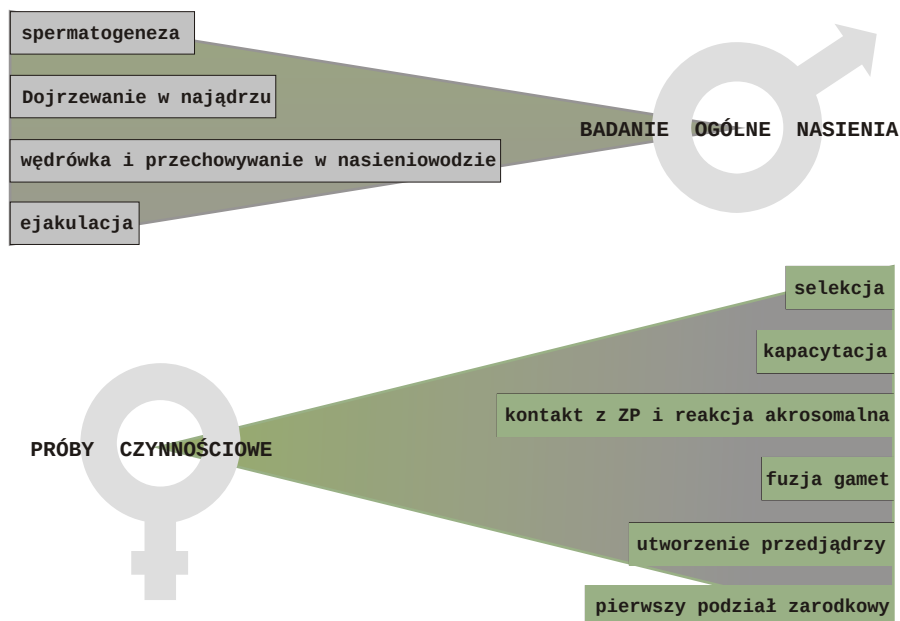


Tabela 1. Badania diagnostyczne wykorzystywane w ocenie nasienia

Badania diagnostyczne służące ocenie nasienia zalecane przez WHO (1999)			Inne testy oceny plemników leżące w sferze badań naukowych ale mające potencjalną wartość diagnostyczną
Testy wchodzące w zakres tzw. ogólnego badania nasienia	Testy dodatkowe	Testy funkcjonalne	
Badanie makroskopowe - upłynnienie - wygląd - objętość - lepkość - pH Badanie mikroskopowe: - koncentracja plemników - ruchliwość plemników - obecność innych komórek : leukocytów i komórek szeregu spermatogenicznego - aglutynacja plemników - żywotność plemników - morfologia plemników - obecność przeciwciał przeciwplemnikowych	Test wrażliwości osmotycznej plemników Badania mikrobiologiczne Testy biochemiczne plazmy nasienia CASA-komputerowy system oceny nasienia Test penetracji jaja chemicznego	Badanie obecności wolnych rodników Test wiązania plemników z osłonką przejrystą jaja Badanie zdolności plemników do reakcji akrosomalnej Komputerowy system oceny morfologii plemników	Badanie ekspresji receptora mannozowego Ocena wad genetycznych plemników Ocena integralności DNA Apoptoza plemników Ekspresja receptorów plemnikowych uczestniczących w fuzji gamet

przez WHO (1999) i akceptowane przez andrologów metody badania nasienia są podstawowym narzędziem diagnostycznym oceny płodności mężczyzny. Jednak zarówno w badaniach populacyjnych, jak i w analizie przypadków indywidualnych okazuje się, że niektóre parametry nasienia uznawane wg kryteriów WHO za prawidłowe (Tabela 2) są słabo skorelowane ze zdolnością pary do uzyskania potomstwa. Okazało się, bowiem, w badaniach populacyjnych przeprowadzonych w Danii przez Bonde J. i wsp. (1998), że wśród 430 par po raz pierwszy starających się o potomstwo prawdopodobieństwo skutecznej koncepcji rosło wraz ze wzrostem koncentracji plemników do $40 \times 10^6/\text{ml}$. Wynik ten wskazuje, że nasienie mężczyzn, w którym koncentracja plemników zamyka się w przedziale od $20\text{--}40 \times 10^6/\text{ml}$ jest nasieniem o ograniczonej płodności. W tych samych badaniach zarówno liczba plemników ruchliwych jak i objętość ejakulatu słabo skorelowały z uzyskaniem ciąży. Natomiast prawidłowa morfologia plemników była dobrym prognostykiem skutecznej koncepcji. Z drugiej strony coraz szersze wprowadzanie technik wspomaganego rozrodu zmienia kryteria oceny jakości nasienia uznawanego jako płodne. Na przykład, przy inseminacji naturalnej koncentracja plemników powinna wynosić co najmniej 2×10^7 plemników w 1 ml ejakulatu, przy zabiegach inseminacji domacicznej w dawce inseminacyjnej liczba plemników powinna wynosić co najmniej 1×10^6 plemników, w zabiegach IVF do oocytów dodaje się 1×10^5 plemników, a w zabiegach ICSI wystarczy 1 prawidłowy plemnik.

Dlatego, metody oceny nasienia podlegają ciągłemu doskonaleniu, tak aby wynik badania mógł pozwolić z jak najwyższym prawdopodobieństwem ocenić szansę uzyskania potomstwa. W tym procesie można wyróżnić następujące główne kierunki:

- 1 - automatyzacja metod wchodzących w zakres ogólnego badania nasienia
 - 2 - poszukiwanie nowych parametrów odzwierciedlających zdolności funkcjonalne plemników
 - 3 - doskonalenie metod wprowadzonych do praktyki andrologicznej.
- Metody automatycznej oceny parametrów nasienia. Spośród parametrów nasienia wchodzących w skład badania ogólnego ruch, koncentracja morfologia i żywotność plemników są tymi, dla których opracowano automatyczne systemy oceny. Komputerowe metody badania nasienia (CASA-Computer- Assisted Sperm Analysis) (ruch, koncentracja, morfologia).

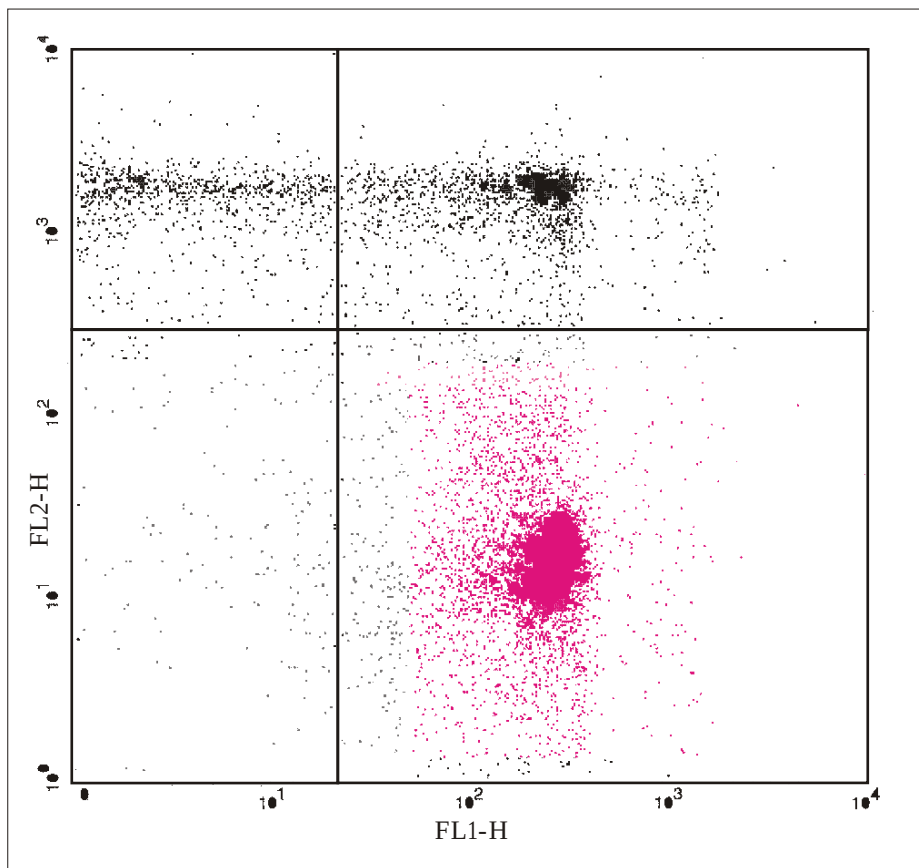
Tabela 2. Podstawowe parametry prawidłowego nasienia ejakulowanego

Oceniany parametr	Wartości prawidłowe
Objętość	2 ml lub więcej
PH	7,2 lub więcej
Koncentracja plemników	20×10^6
Całkowita liczba plemników w ejakulacie	40×10^6
Ruchliwość	a/szybki ruch postępowy 25% lub więcej b/wolny ruch postępowy a+b 50% lub więcej
Morfologia	30% plemników o prawidłowej budowie (1992r)
Żywotność	>70%
Liczba leukocytów w nasieniu	$< 1 \times 10^6$
Przeciwciała przeciwpłomnikowe (IBD)	< 50% ruchliwych plemników wiążących kuleczki
MAR test	< 50% ruchliwych plemników wiążących kuleczki lateksu

Komputerowy system analizy parametrów nasienia jest jak dotąd dostępny w niewielu laboratoriach andrologicznych w kraju. W większości systemów typu CASA przede wszystkim oceniana jest koncentracja i ruch, rzadziej system umożliwia automatyczną ocenę morfologii. Istnieją również próby opracowywania niezależnych systemów służących wyłącznie do automatycznej oceny morfologii plemników (Goulart i wsp., 2003). Wprowadzenie komputerowego systemu analizy nasienia ze względu na bardzo dobrą korelację pomiędzy wynikami uzyskiwanymi w ocenie manualnej z wynikami komputerowej oceny, większej powtarzalności wyników i uniezależnienia oceny od obserwatora, niewątpliwie przyczyniłoby się do standaryzacji oceny nasienia (Larsen i wsp., 2000). Jednak wysoki koszt urządzeń tego typu jest główną przeszkodą we wprowadzaniu systemu CASA do szerokiej praktyki andrologicznej. Przeprowadzone badania przez Larsen i wsp. (2000) wykazały, że istnieje silna korelacja dodatnia pomiędzy koncentracją plemników, całkowitą liczbą plemników w ejakulacie, odsetkiem plemników ruchliwych i koncentracją plemników ruchliwych a prawdopodobieństwem naturalnego zajścia w ciążę. Z drugiej strony, ocena plemników w systemie CASA nie zawsze zwiększa wartość predykcijną tak przeprowadzonego badania w odniesieniu do skuteczności zabiegów wspomaganego rozrodu (Oehninger S i wsp.2000). Z kolei niewątpliwie precyzyjna analiza toru ruchu plemnika, a także ocena liczby plemników hyperaktywnych jest możliwa tylko w systemie komputerowej analizy nasienia

i parametry ruchu plemników takie jak VCL, ALH, VAP, VSL są dobrymi wskaźnikami predykcijnymi w zabiegach IVF (De Geyter C. i wsp.1998).

Metody automatycznej oceny żywotności plemników. W badaniu mikroskopowym żywotność plemników jest oceniana na podstawie liczby nieutrwalonych plemników z zabarwioną cytoplazmą (barwienie eozynowo-nigrozynowe). Wnikanie barwnika do komórki martwej i/lub uszkodzonej jest spowodowane zmianą przepuszczalności błony komórkowej. Żywotność plemników również można określać w jedno- lub dwukolorowym barwieniu przy użyciu cytometru przepływowego. Plemniki martwe są barwione przy użyciu jodku propidyny (sam jodek propidyny jest używany w barwieniu jednokolorowym, w którym populacją znakowaną są tylko plemniki martwe), populacja plemników żywych jest określana dzięki barwieniu barwnikiem SYBR14 (Rys 2). Zasadniczą różnicą pomiędzy barwieniem metodą eozynowo-nigrozynową (barwienie cytoplazmatyczne) i metodą przy użyciu jodku propidyny jest fakt, że jodek propidyny barwi komórki po wnikięciu do jądra (barwienie jądrowe) i z tego powodu liczba plemników martwych w barwieniu eozynowym może być nieznacznie wyższa niż w barwieniu z jodkiem propidyny (Lachaud C. i wsp.2004). Badania cytometryczne znajdują coraz szersze zastosowanie w ocenie plemników (Tab.3). Niewątpliwą zaletą tych metod jest wysoka czułość i możliwość oceny dużej liczby komórek (10 000) w krótkim czasie. Jednak spośród badań wchodzących w skład



Rys.2 Rozkład populacji plemników żywych (oznaczonych na zielono FL1-H) i martwych (oznaczonych na czarno FL2-H) barwionych przyżyciowo barwnikiem SYBR 14 i jodkiem propidyny (Molecular Probes) i ocenianych cytometrycznie przy pomocy cytometru FACS-Calibur (Becton Dickinson).

Tabela 3. Wykorzystanie badań cytometrycznych w ocenie nasienia
Oceniany parametr:

Żywotność
Apoptoza
Reakcja akrosomalna
Receptor mannozowy
Przeciwciała przeciwpłomnikowe
Integralność DNA

ogólnego badania nasienia przydatność tej techniki ogranicza się od oceny żywotności i obecności przeciwciał przeciwpłomnikowych (Nicholson S.C. i wsp.1997). Z drugiej strony nie można niedocenić użyteczności cytometrii w badaniach innych cech plemników, o czym będzie mowa w dalszej części artykułu.

Nowe parametry oceny nasienia pozostające w sferze badań naukowych i mające potencjalną wartość kliniczną

Testy integralności DNA i apoptoza plemników. Proces spermatogenezy obejmuje szereg następujących po sobie, ściśle kontrolowanych zmian, które prowadzą do wytworzenia haploidalnej gamety męskiej- plemnika.

W trakcie tych przemian w dojrzewającej komórce zachodzi nie tylko redukcja liczby chromosomów, ale także silna kondensacja materiału genetycznego w jądrze. Białka jądrowe charakterystyczne dla wszystkich komórek somatycznych-nukleosomy zostają zastąpione przez protaminy. Procesowi upakowywania DNA w dojrzewającej gamecie towarzyszą procesy nacinania i ligacji DNA, umożliwiające właściwą rearanżację nici DNA i związanie jej z protaminami. Dlatego sądzi się, że występowanie endogennych nacięć w ejakulowanych plemnikach może być związane z nieukończonym procesem dojrzewania (Saleh i wsp. 2002). Innym procesem, który nierozdzielnie jest związany z dojrzewaniem plemników jest

apoptoza komórek o zaburzonej spermatogenezie (Sinha Hikim A.P. i wsp. 2003). U człowieka komórki ginące wskutek apoptozy spotyka się we wszystkich etapach rozwoju tj. wśród spermatogonii, spermatocytów i spermatyd (Sakks i wsp. 1999). Ejakulowane plemniki człowieka posiadają zarówno receptory, jak i niezbędne enzymy uczestniczące w apoptozie (Sakks i wsp. 1999, Paasch U. i wsp. 2004). Pozostaje jednak nadal sprawą sporną czy w ejakulowanych plemnikach może dojść do inicjacji procesu apoptozy czy co wydaje się być prawdopodobnym, obserwowane charakterystyczne dla tego zjawiska zmiany są tylko kontynuacją przerwanej z jakiś powodów procesu samobójczej śmierci komórki?

Tak, więc uszkodzenie DNA plemnika może wynikać z a/ zaburzonej kondensacji chromatyny podczas spermatogenezy, b/ inicjacji apoptozy podczas spermatogenezy lub w czasie wędrówki plemników w męskich drogach wyprowadzających nasienie lub żeńskim narządzie rozrodczym lub c/ w wyniku stresu oksydacyjnego (Duran i wsp. 2002, Aitken and Krausz,2001)

Obecnie pojawia się stosunkowo dużo doniesień wskazujących na kliniczne znaczenie oceny integralności DNA i apoptozy ejakulowanych plemników.

Test integralności DNA.

Zasadą testu integralności DNA plemników jest zdolność oranżu akrydyny do wiązania się z kwasami nukleinowymi. Oranż akrydyny związany z dwu-niciowym DNA pod wpływem światła UV lub laserowego o długości fali 488nm świeci na zielono natomiast po związaniu z jednonicowymi kwasami nukleinowymi w tych samych warunkach świeci na czerwono. Dlatego pojawienie się komórek o intensywnym zabarwieniu w zakresie widma czerwonego wskazuje na obecność w tych komórkach jednonicowych kwasów nukleinowych. Ponieważ w dojrzałych plemnikach RNA prawie nie występuje, dlatego można przyjąć, że komórki intensywnie świecące na czerwono mają zwiększoną ilość uszkodzonego DNA. Taką populację komórek określa się mianem populacji COMP (cells outside the main population) – komórki leżące poza główną populacją tj. populacją komórek z dominującą zawartością jednonicowego DNA (Spano M. i wsp.2000). Zwiększoną liczbę takich komórek stwierdzono w nasieniu pacjentów niepłodnych o zmienionych parametrach nasienia w porównaniu z pacjentami płodnymi i niepłodnymi o niezmiennych parametrach nasienia (Zini i wsp.2000, Zini

A i wsp. 2002). Stwierdzono także, że prawdopodobieństwo zajęcia w ciążę maleje wraz ze wzrostem liczby plemników z uszkodzonym DNA (Evenson DP i wsp. 1999). Podobnie wykazano, że liczba plemników z nieuszkodzonym DNA koreluje pozytywnie z wynikami zabiegów inseminacji domacicznej (Duran E.H. i wsp. 2002). Wykazano również negatywną korelację pomiędzy stopniem uszkodzenia DNA i wynikami IVF (Larson K.L. i wsp. 2000). Na podstawie przytoczonych obserwacji można stwierdzić, że stopień integralności DNA jest obiektywnym kryterium oceny stanu funkcjonalnego plemników a test integralności DNA może w przyszłości stać się częścią rutynowej analizy nasienia.

Apoptoza plemników

Jak wspomniano, apoptoza jest naturalnym procesem regulującym liczbę komórek dojrzewających w czasie spermatogenezy. Zaburzenia procesu apoptozy mogą z kolei prowadzić do zwiększonej liczby plemników w ejakulacie, które wykazują obecność elementów uruchomionego szlaku przekazywania sygnału do apoptozy. Są nimi: fosfatydyloseryna obecna w błonie komórkowej, aktywne formy enzymów swoistych dla tego procesu (m.in. kaspazy 3 i 9), a także obecność fragmentów DNA w jądrze komórkowym. Także obecność receptora FAS na plemnikach ejakulowanych może wskazywać, że są to komórki, które nie zostały wyeliminowane w trakcie spermatogenezy w procesie apoptozy (Saakas D. i wsp.1999). Uszkodzenie plemników będące skutkiem uruchomienia procesu apoptozy można wykrywać przy pomocy metod stosowanych w badaniu tego zjawiska w komórkach somatycznych. Między innymi stosuje się test wiązania anexyny V z jednoczesnym barwieniem komórek jodkiem propidyny oraz badanie fragmentacji DNA przy użyciu metody TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling). W obydwu metodach liczbę komórek pozytywnych można wykazać przy pomocy badań mikroskopowych, jak i cytometrycznych (Oosterhuis G.J. i wsp. 2000).

Aktualnie prowadzone badania nad występowaniem apoptozy w plemnikach i jej związkiem z żywotnością plemników ejakulowanych wskazują, że chociaż wśród plemników martwych stwierdza się obecność komórek z cechami komórek apoptotycznych, to jednak związek pomiędzy żywotnością nasienia i indukcją apoptozy w dojrzałych plemnikach pozostaje nadal niewyjaśniony (Lachaud

C,2004). Z drugiej strony stwierdzono ujemną korelację pomiędzy liczbą plemników apoptotycznych i koncentracją i ruchliwością plemników u pacjentów zgłaszających się do badania w klinice niepłodności (Oosterhuis G.J. i wsp. 2000).

Testy funkcjonalne plemników (testy określające zdolność plemników do kapacytacji, reakcji akrosomalnej i fuzji z błoną komórkową oocytu) o potencjalnej wartości diagnostycznej Testy badające zdolność plemników do kapacytacji i reakcji akrosomalnej. Kapacytacja

Rozpoznanie, a następnie swoiste wiązanie plemnika z komórką jajową jest poprzedzone procesem kapacytacji inaczej określanego jako nabycie zdolności do zapłodnienia. U człowieka, kapacytacja naturalnie zachodzi w jajowodzie pod wpływem progesteronu, albumin i niektórych jonów np. HCO₃-(Jaisval B.S.,1998) W trakcie tego procesu dochodzi do zwiększenia płynności błony komórkowej plemnika wskutek oddysocjowania reszt cholesterolu i wymiany jonowej pomiędzy środowiskiem zewnętrznym gamet i wnętrzem komórki. W trakcie tych zmian ujawnia się receptor mannozowy, który ma zdolność wiązania reszt mannozowych na powierzchni zony pellucida (ZP) komórki jajowej i tym samym uczestniczy w procesie wiązania się gamet (Benoff S. 1997).

Okazuje się, że zdolność plemników do ekspresji receptora mannozowego jest skorelowana z płodnością mężczyzny i wynikami zabiegów IVF (Benoff S i wsp.1999). Obecność receptora mannozowego na plemnikach można wykazać mikroskopowo przy użyciu metody immunofluorescencji z wykorzystaniem koniugatu mannozy-albuminy –FITC. Plemniki nie skapacytowane w obrazie IF albo w ogóle nie wykazują świecenia albo ogranicza się ono do wstawki i witki (Benoff S. 1997). Plemniki skapacytowane charakteryzują się określonymi wzorami fluorescencji w obrębie główki. W niepublikowanych badaniach wykazaliśmy przydatność cytometrii przepływowej w analizie ekspresji receptora mannozowego na plemnikach człowieka. Wykazaliśmy różnice w intensywności świecenia pomiędzy plemnikami przed i po kapacytacji a także pomiędzy plemnikami skapacytowanymi i po przejściu reakcji akrosomalnej. Jednak pomimo udowodnionych korelacji pomiędzy ekspresją receptora mannozowego i wynikami zabiegów IVF, test na obecność tego receptora i pośrednio zdolności plemników do prawidłowej kapacytacji nie znalazł się na stałe w praktyce laboratoriów. andro-

logicznych. Być może pracochłonność metody złożony obraz mikroskopowy i konieczność posiadania dodatkowego sprzętu (mikroskop fluorescencyjny, cytometr przepływowy) stoją na przeszkodzie w uznaniu tego testu za referencyjny w diagnostyce andrologicznej. Reakcja akrosomalna (RA)

W wyniku reakcji akrosomalnej do środowiska komórki jajowej uwalniana zostaje zawartość akrosomu, którą stanowią enzymy hydrolityczne ułatwiające penetrację plemników przez osłonę jaja i wnikanie w głąb osłonki przejrzystej. Zarówno przedwczesna utrata akrosomu jak i niemożność przejścia reakcji akrosomalnej stanowią bezwzględną przeszkodę w zapłodnieniu. Plemniki, które przeszły reakcję akrosomalną przed dotarciem w bezpośrednie sąsiedztwo komórki jajowej nie są zdolne do adhezji do oocytu, te z kolei, które nie uwalniają enzymów akrosomalnych pomimo związania z powierzchnią oocytu nie penetrują w głąb (Patrat C. i wsp.2000).

Dlatego ocena zdolności plemników do reakcji akrosomalnej mogłaby być dobrym markerem sprawności biologicznej tych komórek. Naturalnymi induktorami reakcji akrosomalnej są elementy powierzchniowe wieńca promienistego, białka osłonki przejrzystej i progesteron. Na powierzchni plemników znajdują się bowiem receptory dla ligandów osłon jajowych a także dla progesteronu (Patrat C. i wsp.2000). W warunkach in vitro reakcję akrosomalną udaje się wywołać przy pomocy tych naturalnych induktorów lub ich syntetycznych pochodnych a także w sposób pozareceptorowy poprzez otwarcie kanałów wapniowych przy użyciu jonoforu (Liu DY, Baker HWG, 1996).

Plemniki po przejściu reakcji akrosomalnej zmieniają morfologię, a także tracą lub zyskują nowe elementy powierzchniowe błony komórkowej. Między innymi tracą zdolność wiązania lektyn (zmiana powierzchniowych ugrupowań cukrowych) np. PSA (Pisum sativum agglutinin), natomiast nabywają nowe antygeny, wśród nich antygen CD 46 i antygen rozpoznawany przez przeciwciała monoklonalne GB24. Dlatego różnicowanie plemników przed i po reakcji akrosomalnej wykonuje się na podstawie oceny ekspresji antygenów powierzchniowych plemników. W badaniu wykorzystuje się metody barwienia cytochemicznego lub immunofluorescencyjnego. W barwieniach negatywnych tzn. takich, w których plemniki nie wykazują obecności danego markera po przejściu reakcji akrosomalnej wykorzystuje się zdolność wiązania plemników z PSA,

w barwieniach pozytywnych na plemnikach wykazuje się obecność CD 46 (Patrat C. i wsp. 2000). W przewodniku WHO (1999) do oceny jakości biologicznej plemników polecany jest, jako badanie dodatkowe, test indukcji reakcji akrosomalnej przy użyciu jonoforu A23187. Jednak na podstawie prac Liu DY i Baker HGW (1996a) wydaje się, że test indukcji RA przy użyciu zona pellucida (osłonki przejrzystej oocytów człowieka) ma lepszą wartość predyktoryczną dla oceny zdolności zapładniającej plemników. Jednak niezależnie od używanego induktora, testy kontroli RA plemników są pracochłonne i trudne do standaryzacji. W pewnym stopniu ułatwieniem może być ocena RA przy użyciu cytometru przepływowego (Nikolaeva M.A. i wsp. 1998))

Łączenie się plemnika z błoną komórkową oocytów

Plechnik po przejściu reakcji akrosomalnej i penetracji osłonki przejrzystej wiąże się błoną komórkową oocytu. Jest to reakcja receptorowo swoista, ale w przeciwieństwie do procesu wiązania się z ZP, gatunkowo nieswoista. Wiele różnych par ligand-receptor zostało zidentyfikowanych na oocycie i plemniku jako te, które uczestniczą w procesie fuzji gamet, spośród których główną rolę odgrywają interakcje pomiędzy cząsteczkami adhezji między-komórkowej (integryny) i białkami macierzy pozakomórkowej. Integryny są glikoproteinami złożonymi z dwóch łańcuchów α i β . Uważa się, że najważniejszymi cząsteczkami odpowiedzialnymi za fuzję gamet są integryny oocytu rozpoznające swoiste ligandy na plemniku, jakimi są przede wszystkim fibronektyna i witronektyna (białka macierzy pozakomórkowej) oraz fertylina (białko należące do rodziny białek ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease domain) (Finaz C i Hammami-Hamza S. 2000). Okazuje się jednak, że również na powierzchni plemników, które przeszły reakcję akrosomalną stwierdza się obecność integryn β 6 β 1 (Reddy V.R.K i wsp. 2003). Wykazano, że plemniki mężczyzn płodnych po przejściu reakcji akrosomalnej w warunkach in vitro wykazują ekspresję tej integryny. Natomiast nie stwierdzono obecności tego białka na plemnikach uzyskanych od mężczyzn z nieprawidłową morfologią plemników i/lub nieprawidłowym ruchem. Są to jedne z niewielu obserwacji wskazujących związek kliniczny pomiędzy potencjalną zdolnością plemników do fuzji z oolemmą i płodnością mężczyzny.

Oznaczanie wielkości stresu oksydacyjnego nasienia jako przykład doskonalenia metody zalecanej przez WHO

W skład błony komórkowej plemników wchodzi więcej w porównaniu z komórkami somatycznym nienasyconych kwasów tłuszczowych. To warunkuje zwiększenie jej płynności, dzięki czemu możliwa jest fuzja plazmallemmy z zewnętrzną błoną akrosomalną w trakcie reakcji akrosomalnej, a także ułatwia zlanie się błon komórkowych w procesie łączenia się gamet. Jednak wiązania nienasycone są miejscami, gdzie łatwo dochodzi do odłączania protonów wodorowych i inicjacji procesu peroksydacji, wywołanego przez zawsze obecne w nasieniu wolne rodniki tlenowe. Przed niekontrolowanym i lawinowym procesem peroksydacji, który prowadzi do utraty płynności błony i zaburzenia jej funkcji chroni plemniki system antyutleniający obecny w plazmie nasienia. Same bowiem plemniki są słabo wyposażone w enzymy anty-oxidacyjne ze względu na ograniczoną zawartość cytoplazmy. Obecność zwiększonego poziomu wolnych rodników tlenowych (ROS) wraz z obniżeniem zdolności antyoksydacyjnych plazmy prowadzi do patologii plemników wywołanej stresem oksydacyjnym. Skutkiem stresu antyoksydacyjnego jest peroksydacja błon komórkowych plemników i utrata ich płynności. Upośledzenie ruchu i zdolności do łączenia z komórką jajową i zaburzenia integralności DNA pozostają w silnej zależności ze stopniem peroksydacji plazmallemmy męskich komórek rozrodczych (Agarwal A i wsp. 2003). Źródłem wolnych rodników tlenowych w nasieniu są same plemniki, a także często obecne w nasieniu leukocyty. Okazuje się, że nawet niewielka liczba leukocytospermii, jest źródłem wolnych rodników tlenowych zdolnych do wywołania stresu oksydacyjnego, mającego wpływ na jakość nasienia (Saleh R.A. 2002). Wykazano również, że obecność plemników niedojrzałych (z deformacjami główki i obecną kroplą cytoplazmatyczną) jest związana z podwyższonym poziomem ROS w nasieniu (Gil-Guzman E. i wsp. 2001). Z drugiej strony stwierdzono, mniejszą aktywność antyoksydacyjną plazmy nasienia u pacjentów niepłodnych. Jednak narażenie na stres oksydacyjny plemników zależy od indywidualnych właściwości każdego pacjenta, która jest wypadkową pomiędzy ilością tworzonych wolnych rodników i aktywnością przeciwutleniającą osocza nasienia. Dlatego wartość kliniczną będzie miało badanie określające poziom stresu oksydacyjnego mierzonego stosunkiem poziomu wolnych rodników w plemnikach do całkowitej zdolności antyoksydacyjnej plazmy nasienia (Shrama RK. i wsp. 1999). Instrukcja WHO

(1999) proponuje test chemiluminescencyjnego określania poziomu ROS w plemnikach z użyciem luminolu i peroksydazy chrzanowej jako indykatora. Aktualnie uważa się, że dodatkowym kryterium oceny stresu oksydacyjnego plemników oprócz poziomu ROS powinno być badanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej plazmy nasienia. Ten parametr można określić na podstawie pomiaru stopnia zahamowania wystandaryzowanej, stałej chemiluminescencji peroksydazy chrzanowej przez kompleks antyoksydacyjny zawarty w badanej plazmie nasienia. Na podstawie oznaczeń obu parametrów tj. poziomu ROS i całkowitej aktywności antyoksydacyjnej można obliczyć współczynnik określający całkowity stres oksydacyjny nasienia. Im wyższą wartość przybiera obliczony współczynnik, tym mniejsze jest narażenie plemników na stres oksydacyjny (Saleh R.A. i wsp. 2001)

Podsumowanie

Ocena nasienia jako służąca jak kryterium oceny płodności mężczyzny jest zadaniem trudnym zarówno dla diagnosty laboratoryjnego jak i lekarza androloga.

Dlatego uważa się, że diagnostyka laboratoryjna nasienia powinna być prowadzona wielopoziomowo:

- poziom pierwszy obejmowałby badanie ogólne nasienia zgodnie z zaleceniami WHO i dotyczy wszystkich pracowni andrologicznych.

- poziom drugi obejmowałby badania dodatkowe (uzupełniające) takie jak: badanie bakteriologiczne nasienia, badania biochemiczne plazmy nasienia, badania stresu oksydacyjnego badania hormonalne, genetyczne i inne; badania takie mogłyby być wykonywane w specjalistycznych pracowniach andrologicznych.

- poziom trzeci obejmowałby badania funkcjonalne (zdolność do kapacytacji, RA, testy wiązania z otoczką przejrzystą, oolemmą, test penetracji jaj chomiczego) i dotyczy wyspecjalizowanych pracowni andrologicznych przy ośrodkach wspomagającego rozrodu.

- poziom czwarty - obejmowałby badania naukowe w pracowniach naukowych obejmujące wprowadzane i nowe metody wynikające z potrzeb kliniki.

Tego typu organizacja laboratoriów seminologicznych w Polsce pozwoliłaby na standaryzację i doskonalenie metod diagnostycznych służących wykrywaniu i leczeniu niepłodności.

Anna Chełmońska-Soyta

Laboratorium Immunologii Rozrodu,
Instytut Immunologii i Terapii
Doświadczalnej PAN

Wrocław, 53-119 Wrocław ul. Weigla 12

Literatura u autora

**PROGRAM UBEZPIECZENIA DLA
DIAGNOSTÓW I LABORATORIÓW****1. UBEZPIECZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI
CYWILNEJ Z TYTUŁU WYKONYWANIA ZAWODU
DIAGNOSTY LABORATORYJNEGO**

Od 1 października 2004r. wchodzi w życie grupowa umowa ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej diagnosty laboratoryjnego.

Uchwała KRDL nr 54/2004 upoważniła Prezesa KRDL do wynegocjowania składki ubezpieczeniowej z tytułu odpowiedzialności cywilnej diagnosty laboratoryjnego. Wynegocjowana składka wynosi od 1 października 3 zł miesięcznie. Zatem w październiku należy kwotę 15 zł (składki członkowskiej) zwiększyć o 3zł (kwotę składki ubezpieczeniowej). Łączną kwotę 18 zł należy przelać na konto KIDL: Nr konta: 72102010420000880200105692

Działania KIDL zmierzają do zagwarantowania jednolitego zakresu ochrony ubezpieczeniowej w związku z odpowiedzialnością cywilną diagnosty laboratoryjnego.

Umową ubezpieczenia zostaną objęci wszyscy diagnosty laboratoryjni, którzy są członkami KIDL na dzień rozpoczęcia obowiązywania umowy oraz opłacą podwyższoną składkę do KIDL zgodnie z uchwałą KRDL.

Ochrona ubezpieczeniowa w stosunku do diagnostów laboratoryjnych - nowych członków KIDL, powstanie z dniem wpisania na listę członków KIDL pod warunkiem, że zostanie opłacona składka do KIDL zgodnie z uchwałą KRDL.

Suma gwarancyjna	Składka
35 000 PLN	3 PLN/ na osobę miesięcznie

ISTNIEJE MOŻLIWOŚĆ PODWYŻSZENIA SUMY GWARANCYJNEJ (DOUBEZPIECZENIA) NA PODSTAWIE INDYWIDUALNEJ DEKLARACJI I PO OPŁACENIU DODATKOWEJ SKŁADKI INDYWIDUALNIE (dotyczy przede wszystkim osób pracujących na podstawie umów cywilnoprawnych):

Podwyższenie sumy gwarancyjnej o:	Dodatkowa składka
30 000 PLN	70 PLN/ na osobę rocznie*
50 000 PLN	90 PLN/ na osobę rocznie*
100 000 PLN	130 PLN/ na osobę rocznie*
200 000 PLN	200 PLN/ na osobę rocznie*

*Składka ostateczna do zapłaty będzie naliczana proporcjonalnie do okresu ubezpieczenia (jeżeli okres ubezpieczenia będzie krótszy niż rok składka będzie niższa).

**2. OBOWIĄZKOWE UBEZPIECZENIE
ODPOWIEDZIALNOŚCI CYWILNEJ PODMIOTÓW
PRZYJMĄCYCH ZAMÓWIENIE NA ŚWIADCZENIA
ZDROWOTNE ZA SZKODY WYRZĄDZONE PRZY
UDZIELANIU TYCH ŚWIADCZEŃ (ROZPORZĄDZENIE
MINISTRA FINANSÓW Z 17 LISTOPADA 1998R. DZ.U
NR 143, POZ. 921)**

Dotyczy osób (diagnostów laboratoryjnych), którzy przyjmują zamówienie na świadczenie zdrowotne w trybie art. 35 ust. 1 ustawy z 30 sierpnia 1991 r. o zakładach opieki zdrowotnej, (Dz.U. nr 91, poz. 408) zgodnie z § 3 pkt 2 i 3 ww. rozporządzenia.

Wariant ubezpieczenia	Suma gwarancyjna	Składka roczna
Dotyczy osób wykonujących zawód medyczny w ramach indywidualnej praktyki lub indywidualnej specjalistycznej praktyki.	200 000 PLN	200 PLN 130 PLN*
Dotyczy osób legitymujących się nabyciem fachowych kwalifikacji do udzielania świadczeń zdrowotnych w określonym zakresie lub w określonej dziedzinie medycyny, która dysponuje lokalem oraz aparaturą i sprzętem medycznym, odpowiadającym wymaganiom przewidzianym dla zakładów opieki zdrowotnej, oraz spełniających warunki określone w przepisach o działalności gospodarczej	50 000 PLN	120 PLN 80 PLN*

* gdy umowa o udzielenie zamówienia na świadczenie zdrowotne jest zawarta na okres krótszy niż 12 miesięcy

**3. UBEZPIECZENIE LABORATORIÓW
DIAGNOSTYCZNYCH, BĘDĄCYCH NIEPUBLICZNYMI
ZAKŁADAMI OPIEKI ZDROWOTNEJ**

W ramach preferencyjnego programu laboratoria mogą skorzystać z ubezpieczenia w zakresie:

1) obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej podmiotów przyjmujących zamówienie na świadczenia zdrowotne za szkody wyrządzone przy udzielaniu tych świadczeń (rozporządzenie Ministra Finansów z 17 listopada 1998r.),

suma gwarancyjna	Liczba pracowników wykonujących czynności diagnostyczne	SKŁADKA
200 000 PLN	do 3	400 zł*
	4-6	600 zł*
	7-10	700 zł*
	11-15	800 zł*
	16-30	200 zł*
	31-40	500 zł*
	Powyżej 40	Składka ustalana indywidualnie

*rozłożenie składki na dwie raty skutkuje zwwyżką składki 5%.

2) ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej laboratoriów diagnostycznych,
3) ubezpieczenia mienia od ognia i innych zdarzeń losowych,
4) ubezpieczenia mienia od kradzieży z włamaniem i rabunku,
5) ubezpieczenia szyb i innych przedmiotów szklanych od stłuczenia,
6) ubezpieczenia sprzętu elektronicznego,
7) ubezpieczeń komunikacyjnych (OC, AC, NNW, Hestia Car Asistance).

**4. UBEZPIECZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI
CYWILNEJ Z TYTUŁU WYKONYWANIA CZYNNOŚCI
DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ (dla techników
laboratoryjnych)**

Do ubezpieczenia mogą przystąpić osoby uprawnione do wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej zgodnie z Art. 6a. ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (Dz. U. z dnia 18 września 2001 r.)

Suma gwarancyjna	Składka
35 000 PLN	3 PLN/ na osobę miesięcznie

ISTNIEJE MOŻLIWOŚĆ PODWYŻSZENIA SUMY GWARANCYJNEJ (DOUBEZPIECZENIA) NA PODSTAWIE INDYWIDUALNEJ DEKLARACJI I PO OPŁACENIU DODATKOWEJ SKŁADKI INDYWIDUALNIE (dotyczy przede wszystkim osób pracujących na podstawie umów cywilnoprawnych):

Podwyższenie sumy gwarancyjnej o:	Dodatkowa składka
30 000 PLN	70 PLN/ na osobę rocznie*
50 000 PLN	90 PLN/ na osobę rocznie*
100 000 PLN	130 PLN/ na osobę rocznie*
200 000 PLN	200 PLN/ na osobę rocznie*

UWAGA!

Ogólne warunki stanowiące podstawę zawarcia umowy ubezpieczenia, wnioski ubezpieczeniowe oraz deklaracje zgody znajdują się na stronach KIDL: <http://www.kidl.org.pl/>

Wszelkich informacji na temat programów ubezpieczeń majątkowych udzielają:

Maria Żurawska (0-56) 669 32 40

e-mail: maria.zurawska@mentor.torun.pl

Rafał Sobczak (0-56) 669 33 41

e-mail: rafal.sobczak@mentor.torun.pl

Mentor S.A.

Podmurna 95, 87-100 Toruń

tel. +48 56 669 33 00, fax +48 56 669 33 04

<http://www.mentor.torun.pl>

W razie zajścia wypadku objętego zakresem ubezpieczenia majątkowego Ubezpieczony jest w szczególności obowiązany niezwłocznie powiadomić:

HESTIA KONTAKT 0 801 107 107 (opłata za połączenie równa jednostce taryfikacyjnej TP S.A.)

lub 0 58 555 55 55 (dla telefonów komórkowych)

**EWIDENCJA LABORATORIÓW**

W październiku zakończymy trwającą prawie rok Ewidencję Laboratoriów. Do końca sierpnia br zarejestrowanych zostało ponad 1200 laboratoriów z całej Polski. Efekty pracy osób składających wnioski oraz KIDL można zobaczyć na stronie Internetowej www.kidl.org.pl “klikając” po otwarciu się strony głównej na przycisk **LABORATORIA**, a następnie **EWIDENCJA LABORATORIÓW**

Na ilustracji obok mogą Państwo zobaczyć pierwsze wydane “Zaświadczenie” (z numerem 1) o wpisie do Ewidencji Laboratoriów.

Wszystkich zainteresowanych otrzymaniem takiego zaświadczenia informujemy, że mogą je uzyskać tylko te laboratoria, które zostały umieszczone na naszej stronie Internetowej bez uwag (bez prośby o skontaktowanie się z Biurem KIDL) po uprzednim telefonicznym skontaktowaniu się z nami (tel: 0-22 741 21 57), zgodnie z Uchwałą Nr 47/2004 KRDL.



