

Diagnosta Laboratoryjny

Rok 7, numer 2(20)
grudzień 2009

GAZETA BEZPŁATNA



GAZETA KRAJOWEJ IZBY DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH



Awers Sztandaru Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych



Czas Bożego Narodzenia to chwila zatrzymania się i refleksji nad tymi bliskimi, których po raz pierwszy nie ma z nami przy wigilijnym stole.

W tym roku pożegnaliśmy św. p. Annę Ojak - człowieka oddanego diagnostyce i tworzeniu samorządu diagnostów laboratoryjnych.

Św. p. Anna Ojak była osobą niezłomną, konsekwentną, odznaczającą się charyzmatem ducha, odpowiedzialnością i bezinteresownością, bezwzględnie głoszącą prawdę w spolaryzowanym otoczeniu, choć niosło to z sobą trudy i przykre konsekwencje. Była oddana do końca. Cierpienie ofiarowała za diagnostów laboratoryjnych - tak powiedziała w rozmowie telefonicznej przed śmiercią.

Wierzimy, że droga nam św. p. Anna Ojak pozostanie w naszej pamięci symbolem troski o dobro zawodu, bezinteresownej pracy na rzecz samorządu zawodowego oraz rozwijania etosu zawodu diagnosty laboratoryjnego w środowisku medycznym i w środowisku pacjentów.

Wspominając św. p. Annę Ojak myślimy również o diagnostach laboratoryjnych, którzy odeszli tego roku do domu Ojca.

Drodzy diagności,

*Święta Bożego Narodzenia to wyjątkowy okres.
To czas, który budzi szczere uczucia i łączy nas
w jedną rodzinę diagnostyczną.*

*To czas, który pozwala umacniać w nas wiarę
w siłę dobra*

- w codziennym trudzie,
- w naszym zmęczeniu,
- w nadziei o przetrwanie,
- w rozwijaniu aspiracji zawodowych i naukowych,
- w budowaniu autentycznej rzeczywistości
diagnostycznej

*i zrozumieć, że w lichej stajence narodziła się miłość,
która puka do każdego z nas.*

*Wszystko dla dobra pacjenta - niech to hasło
przyświeca nam i naszym współpracownikom nie
tylko w okresie świątecznym, lecz przez cały
rok, 2010*

*W imieniu Prezydium KRDL, Krajowej Rady
Diagnostów Laboratoryjnych i pracowników Biura
KIDL*

*Prezes KRDL
Henryk Owczarek*

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych
03-428 Warszawa; ul. Konopacka 4
tel. 22-741-21-55, 22-741-21-57, 22-741-11-60;
faks: 22-741-21-56

Nazwa Odbiorcy: Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych
03-428 Warszawa; ul. Konopacka 4
Numer rachunku: 72102010420000880200105692
Bank PKO BP IV Oddział Warszawa

W NUMERZE

Boże Narodzenie 2009	3
Patomechanizm gospodarki żelazem w niedokrwistości	4 - 7
Wybrane testy czynnościowe w laboratoryjnej diagnostyce endokrynologicznej	7 - 9
Wpływ potranslacyjnych modyfikacji hormonów białkowych (PTM) na wyniki oznaczeń immunochemicznych	9 - 11
Oznaczanie wolnych i biodostępnych hormonów drobnocząsteczkowych	12 - 14
Organizacja laboratoriów prątku gruźlicy w Polsce, ich cele i zadania w programie zwalczania gruźlicy.	14 - 17
Streszczenia wybranych prac opublikowanych w czasopiśmie zagranicznych w 2009 r.	17 - 19
Streszczenia Nagrodzonych Prac Magisterskich	19 - 21
Filozofia klasyczna wobec problemów bioetyki	21 - 22

W biuletynie:

- Uchwały XII posiedzenia KRDL
 - Uchwały Prezydium KRDL
 - Opinie Radcy Prawnego KIDL
- Artykuły:
- "MLD - jak było, jak jest i czy tak miało być.....uwagi z obserwacji wizytatora....."
 - "Zdrowiej bez antybiotyków"

WYDAWCA

Krajowa Rada
Diagnostów Laboratoryjnych

Redakcja:

Henryk Owczarek - Prezes KRDL
Czesław Główniak - Sekretarz KRDL
Marcin Ruszkiewicz - Red. Techniczny
Grzegorz Szych - Konsultacja Tech.
Nakład 10000 + 700 egz.

Patomechanizm gospodarki żelazem w niedokrwistości

Kazimierz Kuliczkowski

**Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi
i Transplantacji Szpiku AM we Wrocławiu**

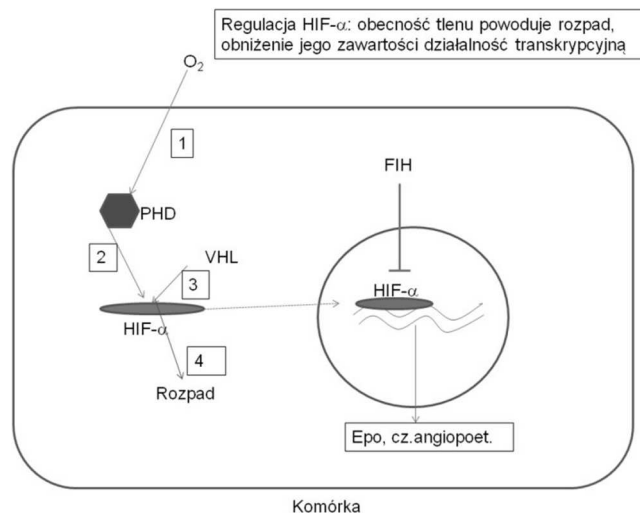
Niedokrwistość (anemia) to objaw charakteryzujący się obniżeniem poniżej normy dla danej populacji stężenia hemoglobiny i liczby erytrocytów. Przyczyną powstania niedokrwistości mogą być w kolejności patofizjologicznej:

1. niesprawność „producenta” szpiku powstała w wyniku różnych mechanizmów - np. w niedokrwistości chorób przewlekłych, w niedokrwistości aplastycznej, w zespołach mielodysplastycznych, białaczkach itp.,
2. nadmierna utrata w wyniku ostrych czy przewlekłych krwawień,
3. nadmierne niszczenie erytrocytów hemoliza w wyniku nieprawidłowych zmian w erytrocytach wrodzonych lub nabytych,
4. brak niezbędnych składników do produkcji erytrocytów w wyniku:
 - niedoborów pokarmowych,
 - zaburzonego wchłaniania,
 - nieprawidłowej gospodarki tymi składnikami np. niedokrwistość w przewlekłym zapaleniu, w procesach immunologicznych.

Często przyczyny powstawania niedokrwistości są złożone i uczestniczą w nich różne mechanizmy np. niedokrwistość w przebiegu nowotworu. Do najczęstszych niedokrwistości należą niedokrwistość z niedoboru żelaza i niedokrwistość chorób przewlekłych (ACD anemia of chronic disease).

Żelazo w organizmie 70 kg człowieka stanowi 4,0 g (60 ppm), z czego 2,5 g zawarte jest w erytrocytach, 4 mg w osoczu, 300 mg w mioglobinie i enzymach oddechowych i 1,0 g stanowią magazyny tkankowe (5).

Głównym zadaniem erytrocytów jest dostarczenie tlenu do tkanek i temu celowi służy hemoglobina składająca się z hemu (pierścień pirolowy związany z żelazem) i białka globiny oraz charakterystyczna budowa erytrocyta. Niedobory głównie żelaza lub upośledzenie struktury erytrocyta i jego składowych upośledzających transport tlenu czego wynikiem jest niedotlenienie tkanek, hipoksja. W komórkach całego ciała znajdują się „czujniki” tlenowe, czynniki transkrypcyjne wrażliwe na niedobór tlenu. Niedobór tlenu indukuje ich aktywność i pobudzenie transkrypcji genów biorących udział w przeciwdziałaniu temu np. poprzez produkcję erytropoetyny stymulującej szpik do zwiększonej produkcji erytrocytów, co z kolei ma wpływ na mechanizmy regulujące dostarczające składników do ich produkcji np. żelazo, wit. B12, kwas foliowy i in. Oprócz genów odpowiedzialnych za produkcję erytrocytów, ulegają indukcji również geny stymulujące angiogenezę aby poprawić dostarczanie tlenu do tkanek. Tym czynnikiem transkrypcyjnym jest czynnik indukowany hipoksją - HIF- α (hypoxia-inducible factor). Dotychczas opisano ich trzy rodzaje: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α . Przy prawidłowej zawartości tlenu w tkankach ulegają one niszczeniu przy pomocy hydroksylaz należących do nadrodziny dioksygenaz zależnych od 2-oksylglutaranu, które hydroksylując prolinę czynnika transkrypcyjnego HIF- α w obecności tlenu umożliwiają przyłączenie białka VHL (von Hippel-Lindau), które jest rozpoznawane przez ligazę E3 ubikwityny, co prowadzi w ostateczności do degradacji HIF- α , hydroksylazy te nazywane są PHD (prolyl hydroxylase domain containing proteins) i opisano dotychczas ich 4 rodzaje. Oprócz wrażliwości na tlen i 2-oksylglutaran, wymagają do swojej aktywności również Fe²⁺. Obecność tlenu aktywuje te hydroksylazy, natomiast niedobór tlenu stabilizuje HIF- α i dochodzi do transkrypcji genów odpowiedzialnych za erytropoetynę i angiogenezę. Obok hydroksylaz jest jeszcze jeden czynnik odpowiedzialny za regulację HIF- α , -inhibitor (FIH Factor Inhibiting HIF), który hydroksylując w nim w obecności tlenu asparaginę hamuje jego działanie. Wpływ na angiogenezę czyni czynniki HIF- α ważnymi w procesie cancerogenezy (Ryc. 1.) (3,7,14).

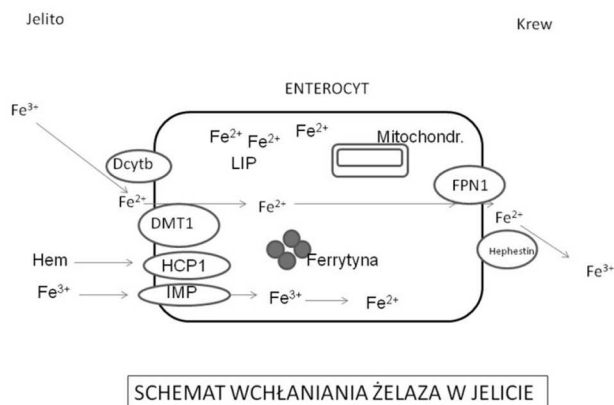


Ryc. 1. VHL białko von Hippel Lindau, PHD prolyl hydroxylase domain containing proteins, Epo-erythropoetyna, cz. angiopoet.-czynniki angiopoetyczne

W gospodarce żelazem wiele poznano, ale też nadal są tutaj białe plamy wymagające dalszych badań. U dobrze odżywionego człowieka 3 - 4 g żelaza jest związane z hemoglobina, codziennie potrzeba 20 - 25 mg dla syntezy hemoglobiny. Żelazo jest reutilizowane w większości z rozpadłych erytrocytów, a bezpowrotne straty z przewodu pokarmowego i powłok skórnych są uzupełniane w diecie codziennej w ilości 1 mg dla mężczyzn i 1 - 3 mg dla kobiet (więcej z powodu dodatkowej utraty przez miesiączki) i wzrasta przy niedoborze żelaza. Oprócz hemoglobiny żelazo zawierają: mioglobina, cytochromy, redukaza rybonukleotydowa, akonitaza, zlepy żelazowo - siarkowe (ISC - iron - sulphur clusters) tj. białka z Fe-S przenoszące elektrony (2, 3, 9). Żelazo znajduje się również w mózgu, gdzie podlega podobnym mechanizmom transportu i wchłaniania jak opisano poniżej. W diecie żelazo występuje w dwóch postaciach: nieorganiczne co stanowi 90% i organiczne w postaci hemu 10%. Wchłanianie żelaza zależy od rodzaju diety, zawartego w niej żelaza. W diecie bogatej w mięso, żelazo w połowie pochodzi z hemu hemoglobiny czy mioglobiny, a w innych częściach świata przy diecie ubogiej w mięso, pochodzi z roślin jako Fe^{3+} . Kwas askorbinowy redukując żelazo do dwuwartościowego Fe^{2+} zwiększa jego wchłanianie. Fityny i polifenole zawarte w pokarmach roślinnych hamują resorpcję (3).

Dotychczas zidentyfikowano trzy drogi wchłaniania żelaza:

1. nieorganiczne Fe^{3+} po redukcji do Fe^{2+} transportowane do enterocyta przez DMT1 (Divalent Metal Transporter 1-Transporter Dwu wartościowego Metalu)
2. hem transportowany jest przez białko HCPI (Heme Carrier Protein I- Białko nośnikowe hemu 1)
3. transport żelaza trójwartościowego (Fe^{3+}) do enterocyta może też odbywać się drogą integrzynowo - mobiliferynową - IMP (Integrin - mobiliferin pathway) niezbyt dobrze poznana.



Ryc. 2. LIP - labile iron pool (zmienna pula żelaza), Mitochondr. - mitochondrium, reszta objaśnień w tekście.

DMT1 przenosi żelazo dwuwartościowe przez szczytową błonę cytoplazmatyczną enterocyty. Opisano mutacje tego nośnika u chorych z niedającą się leczyć niedokrwistością z niedoboru żelaza. Żelazo pokarmowe trójwartościowe zostaje zredukowane przez cytochrom dwunastniczy b (Dcytb - Duodenalcytochrome b, reduktaza żelazowa) znajdujący się w szczycie enterocyty, choć wg niektórych nie jest to niezbędne dla przenoszenia przez DMT1 (1,3). Jak przenoszone jest żelazo wewnątrz komórki dokładnie niewiadomo. Z enterocyta żelazo jest przenoszone z powierzchni podstawowej - bocznej przy pomocy ferroportyny (FPN1 - Ferroportin 1). Transporter ten znajduje się również na powierzchni podstawowej -bocznej syncytiotrofoblasta łożyska jak i w makrofagach wątroby (włączając komórki Kupfera), śledziony i w hepatocytach. Żelazo dwuwartościowe jest utleniane do trójwartościowego przez oksydazę żelazową - hefestyne (hephestin), związaną z błoną komórkową i zawierającą liczne jony miedzi wymagane dla jej aktywności. Podobną rolę spełnia dla innych komórek ceruloplasmina produkowana w wątrobie i krążąca we krwi. Ułatwia ona uwalnianie żelaza z komórek. Uwolnione żelazo trójwartościowe we krwi jest transportowane przez transferynę, która składa się z dwóch globularnych płatów, każdy łączy się z jedną cząsteczką żelaza. Produkowana jest głównie w wątrobie ale też i w mózgu (Ryc. 2.).

Makrofagi, komórki odpornościowe odgrywają również rolę w gospodarce żelazem, fagocytują erythrocyty, a uwalnając żelazo, wpływają na jego stężenie we krwi. Sfagocytowane erythrocyty są transportowane przez wakuole fagocytarne do wnętrza komórki, a z wakuol żelazo transportowane jest do cytoplazmy przez homologiczne do DMT1 białko zwane Nramp1. Z kolei z makrofagów żelazo jest transportowane na zewnątrz przez ferroportynę.

Do innych homologów transferyny należy wymienić melanotransferynę i laktoferynę. Laktoferyna odgrywa głównie rolę obronną jako czynnik przeciwbakteryjny, a rola melanotransferyny nie jest dokładnie określona.

Żelazo transferyny jest przekazywane receptorom transferynowym drogą endocytozy. Receptory są obecne powszechnie na komórkach. Po związaniu receptora z Fe^{3+} - transferyną drogą endocytozy kompleks ten jest przenoszony do cytoplazmy, żelazo jest redukowane do dwuwartościowego przez reduktazę żelazową Steap3 i transportowane przez DMT1 do cytoplazmy, a kompleks receptor transferynowy i transferyna są przenoszone na zewnątrz komórki i transferyna uwalnia się. Cały ten proces trwa 3 minuty (3). Żelazo w komórce może być wbudowywane do hemu lub zlepek żelazowo-siarkowych lub składowane w ferrytynie, aby być zużytym później. Zarówno hem jak i zlepy żelazowo-siarkowe są syntetyzowane w mitochondriach, gdzie żelazo jest pobierane przez midoferynę, białko błony mitochondriów. Tutaj składowane jest w białku frataksynie, które przez to zapobiega powstawaniu wolnych rodników. Mutacje tego białka są odpowiedzialne m.in. za ataksję Friedreicha.

Ferrytyna jest cytoplazmatycznym, powszechnie wyrażanym (expressed), globularnym białkiem spichrzającym żelazo (w ilości około 4500 jonów) w swym wnętrzu po utlenieniu przez łańcuch L do trójwartościowego. W cytoplazmie ferrytyna jest związana z mikrotubulami. Ferrytyna niezwiązana z żelazem nazywana jest apoferrytyną, a związana holoferrytyną. Niewielka, glikozylowana część ferrytyny jest wydzielana do surowicy przez co możemy oceniać stan magazynów żelaza (12). Hemosyderyna również jest składowiskiem żelaza. Budowa nie jest dobrze poznana, składa się z ferrytyny, z denaturowanej ferrytyny i innych białek, żelazo stąd jest trudno dostępne.

Hem jak wspomniano jest przenoszony przez białko HCP1, które przenosi w całości cząsteczkę do cytoplazmy. Ekspresja tego białka zwiększa się pod wpływem hipoksji, a położenie w cytoplazmie zależy od zawartości żelaza w organizmie. Zwykle jest w cytoplazmie i przy błonie komórkowej, przy niedoborach żelaza znajduje się tylko przy błonie. W cytoplazmie hem jest degradowany przez oksygenazę L HCP1 również przenosi kwas foliowy (2,3).

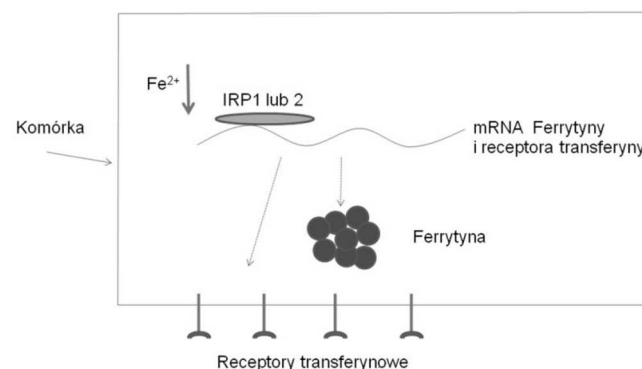
Żelazo trójwartościowe jest przenoszone przez białko opiekuńcze - mobiliferynę i adhezyjne - integrinę p3. W niedoborach żelaza mobiliferyna jest wydzielana do światła jelita, gdzie jedna cząstka wiąże 2 cząstki żelaza, w błonie komórkowej łączy się z integriną. Cały ten kompleks łączy się w cytoplazmie z flawinową

monoooksygenazą i DMT1. Kompleks ten nazywa się paraferrytyną. Redukuje on żelazo trójwartościowe do dwuwartościowego, które następnie jest transportowane przez DMT1 z wakuol (3).

Regulacja gospodarki żelazem

Komórki regulują gospodarkę żelazem zarówno podczas pobierania, składowania jak i zużywania. Ekspresja ferrytyny i receptora transferyny są regulowane na etapie postranskrypcyjnym przez stężenie żelaza wewnątrzkomórkowego. mRNA tych białek posiadają sekwencje regulowane przez żelazo - IRE (iron responsive elements). Obniżenie stężenia żelaza w komórce powoduje, że białka spokrewnione z enzymem akonitazą zwane IRP1 lub IRP2 (iron regulatory protein) wiążą się z IRE stymulując translację (Ryc. 3) (8,17). Transport żelaza wewnątrz komórki nie jest dobrze poznany, żelazo niezwiązane ani z ferrytyną ani z mitochondriami tworzy pulę labilną (LIP - labile iron pool). Głównym regulatorem gospodarki żelazem jest hepcydyna. Najpierw wyizolowano ją z ultrafiltratu osocza, a następnie z moczu i ze względu na pochodzenie z wątroby i własności bakteriobójcze nazwano ją hepcydyną (11). Hepcydyna jak się okazało jest głównym hormonem odpowiedzialnym za gospodarkę żelazem. Łącząc się z ferroportyną niszczy ją i w konsekwencji żelazo nie jest transportowane na zewnątrz komórek np. hepatocyta, enterocyta czy makrofaga. Ekspresja hepcydyny na poziomie transkrypcji jest modulowana przez stany zapalne, wysycenie transferyny żelazem, niedobór żelaza, hipoksję. Pod wpływem zapalenia IL-6 wiąże się z receptorem na hepatocycie i stymuluje czynnik transkrypcyjny Stat3, który zwiększa transkrypcję hepcydyny.

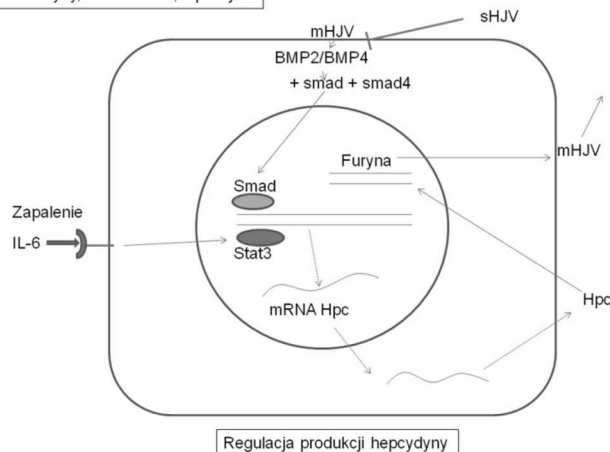
Schemat regulacji białek uczestniczących w gospodarce żelazem



Ryc. 3. Objasnienia w tekście.

Hemojuwelina (HJV) to następny regulator stężenia hepcydyny. Znajduje się on w wątrobie, sercu i mięśniach w dwóch formach: związanej, błonowej i wolnej. Obie te formy konkurują jeśli chodzi o indukcję transkrypcji hepcydyny wpływając ostatecznie na jej wynik. Forma związana hemojuwelina z wiązką kompleksu BMP2/BMP4 wzmagając wiązanie tego kompleksu do receptorów I i II kinaz serynowo -treoninowych, które fosforylują Smad regulowany przez te receptory, a ten z kolei łączy się ze Smad4 i kompleks ten przemieszcza się do jądra, gdzie indukuje transkrypcję hepcydyny. Rozpuszczalna hemojuwelina konkuruje o kompleks BMP2/BMP4 przez co hamuje transkrypcję. Ekspresja obu form hemojuweliny błonowej i wolnej zależy od stężenia żelaza związanego z transferyną (holotransferyny). Uwalnianie z błony komórkowej rozpuszczalnej hemojuweliny jest hamowane przez holotransferynę, natomiast niedobór żelaza i hipoksja stymulują produkcję formy rozpuszczalnej, stabilizując też hepcydynę. Hepcydyna natomiast indukuje ekspresję furyny, która uwalnia z błony komórkowej wolną hemojuwelinę (Ryc.4). Mutacje zarówno hemojuweliny, jak i hepcydyny prowadzą do nadmiernego gromadzenia żelaza, hemochromatozy typu II. Innym czynnikiem wpływającym pośrednio na regulację żelaza jest błonowa proteaza serynowa - matryptaza 2 (matriptase 2 -TMPRSS6), która rozkładając błonową hemojuwelinę hamuje transkrypcję hepcydyny. Opisano niedokrwistości odporne na leczenie żelazem (IRIDA - iron refractory iron deficiency anemia) wywołane mutacją matryptazy 2. (1, 3, 4, 8,11,12,15,16).

Stan zapalny np. IL-6, wysycenie transferyny, niedobór Fe, hipoksja



Ryc. 4. BMP - cytokina (bone morphogenetic protein), Stat3, Smad - czynniki transkrypcyjne

Hemochromatoza typu I jest mutacją białka HFE, które również uczestniczy w regulacji gospodarki żelazem, ale jego mechanizm działania nie jest dokładnie poznany jeszcze. Białko to jest wyrażone w niewielkim stopniu w większości komórek, a w dużej ilości w komórkach krypt jelita i wątrobie. Ekspresja ta jest odwrotnie proporcjonalna do absorpcji żelaza, brak tego białka wiąże się z nadmierną absorpcją, a nadmierna ekspresja hamuje. Białko to łączy się z $\beta 2$ mikro globuliną w cytoplazmie i kompleks ten pojawia się na powierzchni komórki gdzie reaguje z receptorem transferynowym 1 - TfR1. Uważa się, że białko HFE jest sensorem zawartości białka w organizmie używając do tego stężenie saturowanej transferyny (holo-transferyny). Połączenie z holotransferyną uwalnia HFE od TfR1 i łączy się z receptorem transferyny 2 - TfR2, który indukuje transkrypcję hepcydyny.

Trzeci typ hemochromatozy związany jest z mutacją receptora transferyny TfR2, który współpracuje z HFE.

Czwarty typ hemochromatozy dotyczy mutacji feroportyny i nazywany jest chorobą feroportynową(3, 10).

Jakie wynikają z tego praktyczne wskazówki diagnostyczno-laboratoryjne?

Niedobór żelaza tradycyjnie można podzielić na:

- niedokrwistość z niedoboru żelaza,
- niedobór żelaza tkankowego (opróżnione magazyny tkankowe - depleted iron stores).

Anemię z niedoboru żelaza diagnozuje się stwierdzając obniżone wysycenie transferyny (<15%), niskie stężenie ferrytyny (<12 μ g/L) oraz wzrost stężenia rozpuszczalnego receptora transferyny (>6mg/100ml), a w badaniu szpiku brak żelaza po zabarwieniu błękitem pruskim. Drugim narzędziem, którego punktat barwi się na obecność żelaza jest wątroba. Niedokrwistość ta reprezentuje ostatnie stadium opróżnienia magazynów tkankowych. Z drugiej strony pamiętając, że ferrytyna i stężenie żelaza w surowicy zmieniają się pod wpływem zapalenia (stężenie żelaza zmniejsza się, a ferrytyny wzrasta), dlatego w diagnostyce różnicowej niedoboru żelaza należy uwzględnić obecność procesu zapalnego.

Anemia chorób przewlekłych (ACD) lub inaczej zwana niedokrwistością z zapalenia/nowotworu (AI - anemia of inflammation/malignancy) w świetle przedstawionej gospodarki żelazem staje się też bardziej zrozumiała. W tej niedokrwistości dochodzi do zmniejszenia produkcji erytropoetyny, uszkadzającego działania cytokin na erytoblasty, a zwiększona ekspresja hepcydyny zmniejsza uwalnianie żelaza z komórek w których ono się znajduje, a głównie z makrofagów i jest ono przez to niedostępne dla erytoblastów. Niedokrwistość ma charakter mikrocytowy z niedoborem żelaza, stężenie ferrytyny jest prawidłowe lub podwyższone, ale nie wyższe niż 100 μ g/L, a stężenie receptora transferyny prawidłowe. Niedobór żelaza potrzebny dla

erytoblastów przy prawidłowo zaopatrzonych magazynach jak to ma miejsce np. u chorych dializowanych nazywa się funkcjonalnym niedoborem żelaza (functional iron deficiency) i można je ocenić przy pomocy wysycenia transferyny. W różnicowaniu ACD z niedokrwistością z niedoboru żelaza może pomóc obliczenie wskaźnika rTf/f (stosunek rozpuszczalnego receptora transferyny do logarytmu ferrytyny). Wartość większa niż 2 sugeruje niedobór żelaza, mniejsza od 1 wskazuje na ACD.

Z kolei podwyższenie stężenia ferrytyny i zwiększona saturacja transferyny żelazem plus odpowiedni wywiad (nie było przetoczeń krwi) stwarza podejrzenie wrodzonej hemochromatozy (2, 3, 6, 9,17). W monitorowaniu niedoboru żelaza używane są następujące parametry (5):

- stężenie ferrytyny w surowicy,
- barwienie szpiku (wymagana jest obecność grudek w preparacie) na żelazo oceniana półilościowo w skali: 0-4+,
- wysycenie transferyny żelazem,
- wolna protoporfiryna w erytrocytach (FEP -free erythrocyte protoporphyrin),
- stężenie hemoglobiny,
- MCV,
- MCHC.

Niskie stężenie żelaza i ferrytyny i wzrost wiązania żelaza przez transferynę świadczą o dalszym niedoborze żelaza po tym jak magazyny sieciowe zostały opróżnione. Gradację tego niedoboru pozwalają ocenić wyżej wymienione parametry. Niedobór żelaza jak wspomniano dotyczy początkowo magazynów tkankowych, a następnie objawu dalszego niedoboru w postaci niedokrwistości. W przedstawionym poniższym opisie podane są nieprawidłowe parametry dla poszczególnych etapów niedoboru żelaza i przy nasilaniu się objawów przy kolejnych etapach dodawane są kolejne pojawiające się nieprawidłowe parametry. Za Conradem(5) można wyróżnić sześć etapów w powstawaniu niedoboru żelaza:

- zmniejszenie żelaza w magazynach: zmniejszone stężenie ferrytyny w stosunku do normy i zmniejszenie żelaza w barwieniu szpiku na żelazo
- opróżnienie magazynów: przejawia się obniżeniem stężenia ferrytyny <12fag/100ml i brakiem żelaza w barwieniu szpiku,
- ukryty niedobór żelaza: dodatkowo pojawia się zmniejszenie wysycenia transferyny i wzrost wolnej protoporfiryny w erytrocytach
- erytropoeza w niedoborze żelaza: dalsze zmniejszenie wysycenia transferyny, zwiększenie wolnej protoporfiryny w erytrocytach, zmniejszenie Hb o około 1 g i nieznaczne zmniejszenie MCV12
- niedokrwistość wczesna z niedoboru żelaza: dalsze zmniejszenie o 1 g Hb, a także zmniejszenie MCV i MCHC
- niedokrwistość późna z niedoboru żelaza: dalsze zmniejszenie MCV i MCHC

W leczeniu niedokrwistości z niedoborem żelaza stosuje się preparaty tego pierwiastka w miarę możliwości doustnie wyjątkowo dożylnie. Odpowiedzią na leczenie jest retikulocytoza w 5 - 10 dniu stosowania, a hemoglobina wzrasta o 1,0 g tygodniowo. Leczyć powinno się dodatkowo 1-2 miesiące po ustąpieniu niedokrwistości, aby uzupełnić magazyny tkankowe.

W leczeniu niedokrwistości chorób przewlekłych głównym postępowaniem jest leczenie chorób będących przyczyną tej anemii. Reasumując, przybyło wiele danych dotyczących niedoboru żelaza i jego regulacji co pomaga w diagnostyce i leczeniu. Nadal też jest wiele białych plam, które, jak sądzę, będą systematycznie zamalowywane gromadzącą się wiedzą.

Piśmiennictwo

(podano w większości artykuły przeglądowe):

1. Andrews, NC., Schmidt, P.J.: Iron homeostasis: Annu Rev Physiol 69: 69 - 85, 2007,
2. Beard, J., Hań, O.: Systemie iron status. Biochim Biophys Acta 1790: 584 - 588, 2009-08-23,

3. Bleackley, MR., Wong, AYK, Hudson, DM, Wu, CHY, MacGillivray, RTA.: Blood iron homeostasis: newly discovered proteins and iron imbalance. *Transfusion Med Rev* 23: 103-123, 2009,
4. Casanovas, G., Mleczo - Sanecka, K., Altamura, S., Hentze, MW., Muckenthaler, MU.: Bone morphogenetic protein (BMP) - responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJY/BMP / SMAD. *J Mol Med*. 87: 471 - 480, 2009,
5. Conrad, ME.: Iron deficiency anemia. Updated: Aug4, 2009, e-medicine. medscape.com,
6. Dunn, LL., Rahmanto, YS., Richardson, DR.: Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in Cell Biol* 17: 93 - 100, 2006,
7. Fong, GH.: Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med*. 87: 549 - 560, 2009,
8. Hentze, MW., Kuhn, LC.: Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8175 - 8182, 1996,
9. Iolascon, A., De Falco, L., Beaumont, C.: Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Haematologica* 94: 395 - 408, 2009,
10. Janssen, MCH., Swinkels, DW.: Hereditary hemochromatosis. *Best Pract & Res Clin Gastroenterol* 23: 171 - 183, 2009,
11. Kemna, EHJM, Tjalsma, H., Willems, HL., Swinkels, DW.: Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 93: 90 - 97, 2008,
12. Knovich, MA., Storey, JA., Coffman, LG., Torti, SV., Torti, FM.: Ferritin for the clinician. *Blood Rev* 23: 95 - 104, 2009,
13. Luft, FC.: What regulates the iron regulator? *J Mol Med* 87: 447 - 449, 2009,
14. Mole, DR., Ratcliffe, PJ.: Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatr Nephrol* 23: 681-694, 2008,
15. Nementh, E.: Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 15: 169 - 175, 2008,
16. Ramsay, AJ., Hooper, JD., Folgueras, AR., Yelasco, G., Lopez - Otin, C.: Matriptase - 2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica* 94: 840 - 849, 2009,
17. Rouault, TA.: The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2: 406 - 414, 2006.

Wybrane testy czynnościowe w laboratoryjnej diagnostyce endokrynologicznej

Marta Faryna

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Wydziału Nauki o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

W diagnozowaniu chorób endokrynologicznych często oznaczanie hormonów w warunkach podstawowych nie jest wystarczające. Powodem może być krótki okres półtrwania i epizodyczny charakter wydzielania hormonu. Uzyskiwanie wyników prawidłowych bądź granicznych stężenia hormonów w diagnozowaniu endokrynopatii wymaga stosowania testów czynnościowych. Są to przede wszystkim testy oceniające rezerwę przysadkową, wykorzystujące GnRH (gonadoliberynę), która stymuluje uwalnianie gonadotropin, TRH (tyreoliberynę), stymulującą uwalnianie TSH (tyreotropiny) i prolaktyny oraz hipoglikemię poadynową, pobudzającą uwalnianie hormonu wzrostu i ACTH (kortykotropiny). Innymi często wykonywanymi testami jest test z ACTH, stymulujący korę nadnerczy, wykorzystywany w diagnozowaniu niedoczynności kory nadnerczy oraz test hamowania uwalniania ACTH i kortyzolu deksametazonem, stosowany w diagnostyce nadczynności kory nadnerczy.

Ocena wydzielania hormonu wzrostu jest istotna u dzieci z niskim wzrostem i u osób dorosłych z podejrzeniem niedoczynności przysadki.

GH (hormon wzrostu) charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania (20-50 minut), epizodycznym wydzielaniem z maksymalnym wyrzutem w czasie pierwszych godzin snu. Stąd oznaczanie jego stężenia w surowicy ma ograniczoną wartość diagnostyczną. Bardziej przydatne jest oznaczanie IGF-1 (insulinopodobnego czynnika wzrostowego-1), który wykazuje

większą stabilność stężenia we krwi ze względu na wiązanie się z białkami nośnikowymi. Stężenie IGF-1 jest podwyższone w stanach zwiększonego wydzielania hormonu wzrostu, ale bywa prawidłowe w stanach jego niedoboru. Dlatego do oceny rezerwy wydzielniczej hormonu wzrostu wykorzystuje się następujące testy dynamiczne;

- **test z GHRH (somatoliberyną)**, wykorzystujący podwzgorzowy czynnik uwalniający. Wklucie się do żyły powinno być wykonane 30 minut przed rozpoczęciem testu, a krew pobrana do oznaczenia GH w - 30 i 0 minucie testu. Następnie w szybkiej iniekcji dożylniej podaje się GHRH w ilości 1 µg/kg i pobiera krew do oznaczenia GH w czasie 15, 30, 45 i 60 minut po iniekcji.

U większości zdrowych pacjentów wzrost GH, wynoszący powyżej 10 ng/ml pojawia się po 30-60 minutach. Niektórzy autorzy podkreślają jednak, że chociaż GHRH wydaje się być bardzo dobrym bodźcem, to test wykorzystujący ten hormon charakteryzuje się małą powtarzalnością.

- **test z arginina**, która jest najczęściej wykorzystywanym aminokwasem do pobudzenia wydzielania hormonu wzrostu. Wklucie się do żyły powinno być wykonane 30 minut przed rozpoczęciem testu, a krew pobrana do oznaczenia GH w tym samym czasie i 0 minucie testu. Później podaje się 10% roztwór argininy w ilości 0,5 g/kg w ciągu 30 minut.

Krew pobierana jest co 30 minut w czasie 2 godzin trwania testu.

Zwiększenie stężenia GH obserwuje się u około 70% zdrowych osób. Stwierdzono, że wstępne leczenie estrogenami kobiet w okresie pomenopauzalnym i mężczyzn nasila odpowiedź GH na wlew argininy. Prawidłowe wartości testu to wzrost GH powyżej 6 ng/ml u pacjentów nieleczonych estrogenami i powyżej 10 ng/ml u pacjentów, którzy przyjmowali estrogeny i u kobiet w okresie przedmenopauzalnym.

- **test hipoglikemii poadynowej**, wykorzystujący hipoglikemię jako silny bodziec uwalniający GH. Wykonanie testu polega na podaniu pacjentowi insuliny o krótkim czasie działania (insuliny krystalicznej) w dawce koniecznej do uzyskania glikemii < 40 mg/dl. Dawka ta wynosi 0,1 j.m./kg u osób zdrowych, 0,2 j.m./kg u osób otyłych i z zespołem Cushinga oraz 0,05 j.m./kg w przypadku niewydolności nerek lub podejrzenia niedoczynności przysadki. Krew pobierana jest 15 minut przed podaniem insuliny, a potem w odstępach 15-minutowych do 2 godzin po podaniu insuliny.

Wzrost wartości GH, przekraczających 10 ng/ml wyklucza rozpoznanie niedoboru tego hormonu. Wartości poniżej 5 ng/ml potwierdzają niedobór GH. Wyniki pośrednie są trudne do interpretacji.

Mimo, że test hipoglikemii poadynowej jest najpewniejszym sposobem wykrycia zmniejszonej sekrecji hormonu wzrostu, wykonuje go się rzadko i to tylko w obecności lekarza w ośrodkach endokrynologicznych o odpowiednim doświadczeniu. Mogą bowiem wystąpić objawy ciężkiej hipoglikemii ze strony ośrodkowego układu nerwowego. Istnieją także przeciwwskazania do wykonania testu jak choroby sercowo-naczyniowe, naczyniowo-mózgowe przebiegające z drgawkami, niedoczynność tarczycy, hipokortyzolemia. Nie powinno się go także wykonywać u osób starszych.

Uważa się, że niedobór lub brak GH może być rozpoznany, jeśli 2 z 3 opisanych powyżej testów dają wyniki nieprawidłowe.

Obecnie u osób dorosłych z podejrzeniem niedoboru GH można stosować łączne podanie argininy i GHRH, gdyż wyniki są porównywalne z tymi, które są uzyskiwane w teście hipoglikemii poadynowej. Do oceny niedoboru hormonu wzrostu wykorzystywane są też **testy z L-DOPA, klonidyną, glukagonem i test wysiłkowy**. Uważa się jednak, że mają one mniejszą wartość diagnostyczną od testów omówionych powyżej.

Należy podkreślić, że uzyskanie w teście stymulacyjnym stężenia GH powyżej 10 ng/ml wyklucza brak lub niedobór GH. Z drugiej strony u osób zdrowych możemy nie obserwować wzrostu stężenia GH w teście stymulującym.

Z kolei do oceny nadmiernego wydzielania GH wykorzystuje się:

- **test z doustnym podaniem glukozy**. Pacjentowi, będącemu na czczo, podaje się glukozę w dawce 75-100 gramów. Krew w celu oznaczenia GH i glukozy pobierana jest w odstępach 30-minutowych w ciągu 2 godzin testu. U osób zdrowych obserwuje się silne

hamowanie wydzielania GH do stężenia poniżej 2 ng/ml. Brak supresji występuje w akromegalii, ale także w głodzeniu, niewydolności nerek i wątroby oraz w niewyrównanej cukrzycy.

Hiperprolaktynemia jest częstym zaburzeniem endokrynologicznym. Rozróżniamy hiperprolaktynemię organiczną, spowodowaną gruczolakami przysadki i hiperprolaktynemię czynnościową - psychogenną czy występującą w wyniku działania leków np. antagonistów receptora dopaminowego. Przy granicznych wartościach prolaktyny lub przy podejrzeniu utajonej hiperprolaktynemii wykonuje się testy dynamiczne:

- **test z metoklopramidem**, w którym blokowane są receptory dopaminowe. Ze względu na wzrost stężenia prolaktyny po wystąpieniu różnych czynników stresowych krew na jej oznaczenie pobierana jest 10 minut przed rozpoczęciem testu i tuż przed podaniem preparatu. Metoklopramid podaje się dożylnie w ilości 10 mg, a następnie pobiera krew po 15 i 30 minutach.

W warunkach fizjologicznych prolaktyna powinna wzrosnąć nie więcej niż 10-krotnie. Zwiększenie stężenia prolaktyny ponad 10-krotną wartość wyjściową przemawia za zwiększonym uwalnianiem prolaktyny.

- **test z TRH**, wykorzystujący fizjologiczny stymulator wydzielania prolaktyny. TRH podaje się dożylnie w ilości 200 µg, a krew pobierana jest w czasie -10, 0, 30 i 60 minut.

W warunkach fizjologicznych prolaktyna powinna wzrosnąć nie więcej niż 3-krotnie. Test z TRH może być także wykorzystywany do oceny rezerwy wydzielniczej TSH. Stężenie hormonu tyreotropowego powinno wzrosnąć co najmniej 2,5-krotnie, nie przekraczając wartości 18 µIU/ml. Obecnie test jest wykonywany w diagnostyce takich jednostek chorobowych jak niedoczynność tarczycy pochodzenia ośrodkowego (brak lub zmniejszony wzrost TSH albo odpowiedź opóźniona i przedłużona), zespoły oporności na hormony tarczycy (prawidłowy lub nadmierny wzrost TSH), gruczolak przysadki mózgowej wydzielający TSH (brak wzrostu TSH).

Test można również wykorzystać w diagnostyce akromegalii, gdzie niekiedy obserwowany jest wzrost stężenia hormonu wzrostu przy braku takich zmian u ludzi zdrowych.

W zaburzeniach podwzgórzowo-przysadkowych, dotyczących wydzielania gonadotropin, często uzyskuje się stężenia FSH i LH w zakresie wartości referencyjnych lub nieznacznie obniżone. Wówczas bardzo pomocny jest test, służący do oceny rezerwy wydzielniczej gonadotropin:

- **test z GnRH**. Gonadoliberynę podaje się dożylnie w ilości 100 µg. Próbkę w celu oznaczenia stężenia FSH i LH pobierane są w czasie 0, 30 i 60 minut.

Wzrost stężenia LH o 12-23 IU/l uważa się za prawidłowy. Stężenie FSH wzrasta wolniej i w mniejszym stopniu. Test stosuje się przede wszystkim w diagnostyce hipogonadyzmu hipogonadotropowego, gdzie wzrost stężenia gonadotropin po podaniu GnRH wyższy od uznanego za prawidłowy świadczy o uszkodzeniu podwzgórza, a niższy - o uszkodzeniu przysadki.

Niedoczynność kory nadnerczy może wynikać z pierwotnego uszkodzenia kory nadnerczy lub niedoboru ACTH. Oznaczenie stężenia ACTH w osoczu nie jest wystarczające ze względu na krótki okres półtrwania hormonu i epizodyczny charakter jego wydzielania. Zwykle wyniki są interpretowane łącznie z wynikami oznaczeń kortyzolu. Należy jednak podkreślić znaczne nakładanie się wyników oznaczeń kortyzolu u osób z niedoczynnością kory nadnerczy z wynikami, uzyskanymi u osób zdrowych. Stąd istnieje konieczność wykonania testów czynnościowych takich jak:

- „**szybki**” **test z ACTH (syntetycznym ACTH - Synacthenem)**, który służy do bezpośredniej oceny wydzielania hormonów przez korę nadnerczy, ale pośrednio ocenia też wydzielanie ACTH. Oceniany jest jako bardzo dobry test do diagnozowania pierwotnej i wtórnej niedoczynności kory nadnerczy. 250 (µg ACTH podaje się dożylnie w „bolusie”, a krew pobierana jest w czasie 0, 30 i 60 minut testu w celu wykonania oznaczenia stężenia kortyzolu.

W warunkach prawidłowych stężenie kortyzolu powinno przekroczyć 20 µg/dl. Brak pożądanego wzrostu kortyzolu potwierdza pierwotną lub wtórną niedoczynność nadnerczy. Wynik oznaczenia ACTH może różnicować te dwie jednostki chorobowe. Przy prawidłowym wyniku „szybkiego” testu z ACTH a dużym

podejrzeniu wtórnej niedoczynności kory nadnerczy można wykonać „**długi**” **test z ACTH**. Podaje się wówczas 1 mg preparatu depot ACTH i pobiera krew w celu oznaczenia stężenia kortyzolu nie tylko w czasie 0, 30 i 60 minut po podaniu ACTH, ale także po 2, 4, 6, 8, 12 i 24 godzinach. We wtórnej niedoczynności nadnerczy stężenie kortyzolu wzrasta zwykle po 24 godzinach testu.

W celu bezpośredniej oceny rezerwy wydzielania ACTH wykonuje się trzy następujące testy: hipoglikemii poinsulinowej, z metopironem i z CRH. Wykonanie tych testów nie jest przydatne, jeśli wynik „szybkiego” testu z ACTH jest nieprawidłowy.

- **test hipoglikemii poinsulinowej**, opisany powyżej służy nie tylko do oceny wydzielania hormonu wzrostu, ale także do oceny wydzielania ACTH, gdyż hipoglikemia jest bodźcem do wydzielania zarówno hormonu wzrostu jak i hormonu adrenokortykotropowego. Hormonem oznaczanym jest jednak kortyzol, a nie ACTH ze względu na pulsacyjny charakter jego wydzielania.

Wartości kortyzolu, przekraczające 20 (µg/dl występują u osób zdrowych i świadczą o prawidłowej rezerwie ACTH. Należy pamiętać, że u pacjentów z hipokortyzolemią może wystąpić ciężka hipoglikemia podczas wykonywania testu, dlatego wcześniej należy wykonać test pobudzający z ACTH.

- **test z metopironem**. Metopiron jest związkiem, hamującym aktywność 11β-hydroksylazy, enzymu katalizującego ostatni etap syntezy kortyzolu, czyli hydroksylację 11-deoksokortyzolu do kortyzolu. Spadek stężenia kortyzolu prowadzi do wzrostu wydzielania ACTH i prekursorów kortyzolu w tym 11-deoksokortyzolu. Obecnie preferowana procedura wykonania tego testu to doustne podanie o północy metopironu w dawce 30 mg/dl i pobranie krwi rano w celu oznaczenia kortyzolu i 11-deoksokortyzolu.

Stężenie kortyzolu powinno wynosić poniżej 10 (µg/dl, aby można było uznać za wystarczające zahamowanie 11β-hydroksylacji. Natomiast stężenie 11-deoksokortyzolu powinno wzrosnąć powyżej 7 µg/dl. Początkowo test ten był wykorzystywany w różnicowaniu choroby Cushinga, spowodowanej nadmiernym wydzielaniem ACTH od zespołu Cushinga w przebiegu guza kory nadnerczy. W chorobie Cushinga wydzielanie ACTH wzrasta po podaniu metopironu, tak jak u osób zdrowych, a w przypadku guza nadnerczy nie obserwuje się zmian. Obecnie ze względu na możliwość oznaczania ACTH i wykonania testu z CRH nie jest już wykorzystywany w tym celu. Nie stracił jednak znaczenia przy podejrzeniu częściowego niedoboru ACTH, gdzie „szybki” test z ACTH jest prawidłowy.

- **test z CRH (kortykoliberyną)**, wykorzystujący fizjologiczny związek do pobudzania wydzielania ACTH, różnicuje drugo- i trzeciorzędową niewydolność kory nadnerczy. Wykorzystywany jest też także do różnicowania przyczyn hiperkortyzolemii. CRH podaje się dożylnie w dawce 1 µg/kg (u dorosłych zwykle 100 µg), a krew pobiera się w celu oznaczenia kortyzolu w surowicy i ACTH w osoczu przed podaniem preparatu oraz 15, 30, 45, 60 i 90 minut po iniekcji CRH.

Za prawidłowy uważa się wzrost ACTH do stężenia większego niż 50% wartości wyjściowej (najbardziej typowy wzrost - przekroczenie dwu-, trzykrotne wartości wyjściowych), a kortyzolu powyżej 7,5 µg/dl. We wtórnej drugorzędowej niewydolności kory nadnerczy nie obserwuje się wzrostu stężenia ACTH i kortyzolu. Należy podkreślić, że test ten jest najmniej użyteczny z opisanych testów do oceny rezerwy wydzielniczej ACTH ze względu na nakładanie się wartości stężeń hormonów u ludzi zdrowych i z niedoczynnością przysadki pod względem wydzielania ACTH. Obecnie główne wykorzystanie testu to różnicowanie zespołów Cushinga ACTH-zależnych - w chorobie Cushinga obserwuje się wzrost ACTH i kortyzolu po CRH, a w ektopowym wydzielaniu ACTH jest brak odpowiedzi.

W diagnostyce hiperkortyzolemii ważne miejsce zajmuje:

- **test z małą dawką deksametazonu**. Nocny test z 1 mg deksametazonu jest dobrym badaniem przesiewowym. Pacjentowi przed snem podaje się 1 mg deksametazonu, a następnie rano pobiera się krew w celu oznaczenia kortyzolu. Stężenie kortyzolu nie powinno przekraczać 1,8 (µg/dl (do niedawna za wartość progową uznawano 5 µg/dl). Potwierdzeniem zespołu Cushinga po dodatnim wyniku testu jest oznaczenie wydalania wolnego kortyzolu z moczem.

- **test z dużą dawką deksametazonu** polega na oznaczeniu stężenia kortyzolu rano, podaniu tego samego dnia późno wieczorem przed snem 8 mg deksametazonu i oznaczenie kortyzolu następnego dnia rano.

U 95% pacjentów z chorobą Cushinga stężenie kortyzolu obniża się ponad 50%. U chorych z guzem kory nadnerczy lub ekotopowym wydzielanie ACTH stężenie kortyzolu nie ulega zmianie.

Testy z małą i z dużą dawką deksametazonu mogą być wykonane z wykorzystaniem oznaczenia dobowego wydalania 17-hydroksykortykosteroidów z moczem, a nie kortyzolu w surowicy. W teście z małą dawką podaje się deksametazon w ilości 0,5 mg co 6 godzin przez 2 dni, a w teście z dużą dawką - w ilości 2 mg co 6 godzin przez 2 dni. Dobowe zbiórki moczu przeprowadza się przed podaniem preparatu i w ciągu drugiej doby testu. Wykorzystuje się je do oznaczania dobowego wydalania 17-hydroksykortykosteroidów.

Mimo że testy czynnościowe często są niezbędne w diagnostyce endokrynopatii musimy pamiętać, że ich interpretacja może być niewłaściwa w niektórych zaburzeniach takich jak otyłość, cukrzyca, mocznica, jadłowstręt psychiczny czy depresja. Przykładowo w ciężkiej otyłości zmniejszone jest uwalnianie hormonu wzrostu w odpowiedzi na bodźce stymulacyjne a w cukrzycy typu I stężenie hormonu wzrostu wzrasta po podaniu glukozy. Również niektóre leki, jak sterydy, estrogeny, fenytoina i wiele innych, mają wpływ na oś podwzgórzowo-przysadkową i tym samym zmieniają wyniki testów czynnościowych.

Piśmiennictwo dostępne u autora.

Wpływ potranslacyjnych modyfikacji hormonów białkowych

na wyniki oznaczeń immunochemicznych

Zbigniew Bartoszewicz^{1,2)} i Agnieszka Kondracka¹⁾

1) Laboratorium Naukowe; Katedra i Klinika Chorób
Wewnętrznych i Endokrynologii Warszawski Uniwersytet
Medyczny

2) Zakład Badawczo Leczniczy Endokrynologii; Instytut
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej; Warszawa

Wstęp

Hormony białkowe są jednymi z najczęściej oznaczanych metodami immunochemicznymi markerów diagnostycznych. Na wynik pomiaru wpływa wiele czynników, niektóre są nierozdzielnie związane z użytą metodą i wynikają z jej technicznych ograniczeń, użytych przeciwciał, analogów, sposobu wprowadzania znaczników i ich detekcji, problemów ze standaryzacją wieloetapowych reakcji; przy interpretacji wyników należy zwrócić baczna uwagę na dobór grupy referencyjnej. Rzadko jednak zdajemy sobie sprawę z tego, że istotne różnice w wynikach oznaczeń ilościowych w zależności od zastosowania konkretnego testu immunochemicznego mogą być spowodowane heterogennością hormonów lub innych białek, których stężenia oznaczamy. Może to prowadzić do niezgodności pomiędzy uzyskanym wynikiem a stanem klinicznym pacjenta i skutkować nieprawidłowym wyborem metody leczenia.

W niniejszej publikacji chcielibyśmy przybliżyć zagadnienie wpływu na wynik oznaczenia stężenia hormonów białkowych ich modyfikacji potranslacyjnych (PTM - ang. *posttranslational modifications*), czyli zmian w strukturze chemicznej hormonów następujących po zsyntetyzowaniu głównego łańcucha polipeptydowego białka (1). PTM prowadzą do powstawania różnych izoform tego samego hormonu białkowego (izoform wysokocząsteczkowych, niskocząsteczkowych oraz izoform o ciężarze podobnym do podstawowej izoformy monomerycznej hormonu białkowego ale o zmodyfikowanym składzie chemicznym), które najczęściej są utożsamiane z heterogennością białka (Rys.1). Należy jednak pamiętać, że izoformy tego samego hormonu białkowego mogą powstawać również w wyniku udziału w jego syntezie więcej niż jednego genu kodującego. Poza tym niektóre geny w czasie obróbki mRNA podlegają procesowi pomijania egzonu (ang. *exon skipping*), który prowadzi do powstawania krótszych izoform danego białka (1).

PTM zwykle wpływają na bioaktywność hormonów białkowych, przede wszystkim zmieniając ich trwałość w układzie krążenia, transport oraz powinowactwo do odpowiednich receptorów, co w konsekwencji wpływa na bezpośredni efekt biologiczny, który te

hormony wywierają na tkanki docelowe. Bez szczegółowej wiedzy dotyczącej możliwych modyfikacji potranslacyjnych i innych mechanizmów wpływających na wielość form hormonów białkowych we krwi obwodowej pacjentów, może być trudno prawidłowo interpretować wynik pomiaru stężenia tych hormonów.

Wpływ wysokocząsteczkowych izoform hormonów białkowych na wyniki oznaczeń immunochemicznych

Materiałem do immunochemicznych oznaczeń hormonalnych są przede wszystkim płyny takie jak krew, mocz, ślina, płyn mózgowo rdzeniowy i płyny wysiękowe. Zdecydowana większość oznaczeń wykonywana jest z surowicy lub osocza krwi obwodowej, w których występują związki swoiste lub w sposób nieswoisty wiążące się z hormonami białkowymi. Niektóre hormony mają również naturalną tendencję do agregacji tworząc dimery, oligomery i multimery. Powstałe izoformy wysokocząsteczkowe w różnym stopniu są rozpoznawalne przez przeciwciała użyte w teście immunochemicznym, co w konsekwencji prowadzi do uzyskania różnych wyników dla tej samej próbki pacjenta w zależności od rodzaju użytego testu. Często nie zdajemy sobie sprawy, że udział izoform wysokocząsteczkowych w całkowitej puli izoform danego hormonu może być dominujący i one same mogą stanowić użyteczne markery diagnostyczne.

Dobrym przykładem ilustrującym znaczenie kliniczne występowania form wysokocząsteczkowych jest prolaktyna (PRL). Ten niewielki hormon białkowy występuje we krwi obwodowej głównie w postaci monomerycznej izoformy podstawowej o ciężarze cząsteczkowym około 22 kDa (2). U części pacjentów z hiperprolaktynemią idiopatyczną nagromadzeniu ulegają izoformy prolaktyny wysokocząsteczkowej tzw. makroprolaktyny o ciężarze powyżej 150 kDa (3). W skład makroprolaktyny poza prolaktyną monomeryczną wchodzi krążące we krwi przeciwciała przeciwprolaktynowe klasy IgG lub IgM, glikozylowana izoforma prolaktyny oraz prawdopodobnie również rozpuszczalny fragment receptora dla prolaktyny. Dla surowic zawierających makroprolaktynę wyniki pomiaru stężeń prolaktyny w tej samej próbce pacjenta mogą różnić się nawet 5-krotnie ze względu na to, że testy jednych producentów rozpoznają cząsteczkę makroprolaktyny bardzo dobrze, a innych bardzo słabo. Problem w rozpoznawalności wysokocząsteczkowych izoform prolaktyny jest istotny z klinicznego punktu widzenia, ponieważ pacjenci z makroprolaktynemią wymagają innego postępowania terapeutycznego. Udział wysokocząsteczkowych izoform prolaktyny w całkowitej puli prolaktyny można oszacować poprzez wytrącenie frakcji wysokocząsteczkowych białek glikolem polietylenowym, odwirowanie próbki i ponowny pomiar stężenia prolaktyny w supernatancie (4).

Zjawisko tworzenia się izoform wysokocząsteczkowych nie ogranicza się do prolaktyny, występuje również dla innych hormonów białkowych np. gonadotropin (LH i FSH) czy insuliny.

W przypadku adiponektyny okazało się, że stosunek stężeń wysokocząsteczkowych izoform adiponektyny do adiponektyny całkowitej jest lepszym wskaźnikiem patogenezy zespołu metabolicznego, oporności na insulinę i niektórych chorób naczyńnych niż pomiar stężenia adiponektyny całkowitej (5).

W surowicy adiponektyna występuje w formie trimery, heksamery oraz wysokocząsteczkowego multimeru. Początkowo oznaczano tylko stężenie adiponektyny całkowitej, później zaczęto oznaczać stężenie izoform wysokocząsteczkowych po wstępnej degradacji izoform monomerycznych oraz oligomerycznych proteazą (6). Ostatnio doceniając wartość diagnostyczną wysokocząsteczkowych izoform adiponektyny opracowano test immunochemiczny do ich selektywnego oznaczania, w którym wykorzystuje się przeciwciała rozpoznające epitopy konformacyjne IV rzędowej struktury adiponektyny (7).

PTM prowadzące do powstania izoform wysokocząsteczkowych są szczególnie częste w sytuacjach, gdy w krwiobiegu występuje wysokie stężenie przeciwciał np. w chorobach autoimmunologicznych, w stanach zapalnych, terapii przeciwciałami, u pacjentów po długotrwałym kontakcie z alergenami roślinnymi i zwierzęcymi. Powstałe wysokocząsteczkowe izoformy immunokompleksu hormon białkowy - przeciwciało mogą w istotny sposób zmienić wynik oznaczenia stężenia niezwiązanego hormonu. Przykładowo

obecność przeciwciał przeciw tyreoglobulinie (TgAb) w chorobach autoimmunologicznych tarczycy powoduje zaniżenie wyniku oznaczenia stężenia tyreoglobuliny w surowicy. Szczególnie podatne na TgAb są testy bazujące na metodach immunometrycznych, dlatego niektóre laboratoria nadal używają technik radioimmunologicznych do oznaczeń tyreoglobuliny (8).

Hormony białkowe często powstają z większych cząsteczek prekursorów i prohormonów, których stężenia w krwi obwodowej mogą znacznie przekraczać stężenie samego hormonu. Prekursory i prohormony mogą być rozpoznawane przez przeciwciała w teście immunochemicznym, którym mierzymy stężenie właściwego hormonu i zawyżać wynik oznaczenia. Przykładem jest hormon adenokortykotropowy (ACTH), który powstaje z dużego białka proopiomelanokortyny (POMC). Pod wpływem działania enzymu prohormonalnej konwertazy 1 POMC poprzez pro-ACTH jest degradowany do biologicznie czynnej 39-aminokwasowej cząsteczki właściwego hormonu (9). Stężenie pro-ACTH w prawidłowej surowicy ludzkiej jest 5-krotnie wyższe, a u pacjentów z ektopowym wydzielaniem ACTH nawet 10-krotnie wyższe niż samego ACTH. Dlatego nawet niewielka reakcja krzyżowa ACTH z POMC lub pro-ACTH może wpłynąć na wynik oznaczenia ACTH. Istotnym zadaniem dla diagnosty jest więc dokładne przeczytanie informacji z ulotki producenta testu dotyczącej swoistości użytych w teście przeciwciał i zdawanie sobie sprawy z wpływu reakcji krzyżowych na końcowy wynik stężenia hormonu.

Sam prekursor lub prohormon może też być użytecznym markerem diagnostycznym. Pomiar stężenia proinsuliny obok insuliny i C-peptydu jest pomocniczym oznaczeniem m.in. w nowotworach trzustki (10).

Wpływ niskocząsteczkowych izoform hormonów białkowych na wyniki oznaczeń immunochemicznych

Izoformy niskocząsteczkowe powstają przede wszystkim na skutek działania enzymów degradujących hormony białkowe (proteazy, konwertazy prohormonalne) obecnych w płynach obwodowych, tkankach i komórkach, znacznie rzadziej są efektem działania genu odpowiedzialnego za syntezę niepełnej sekwencji hormonu pozbawionego części łańcucha polipeptydowego. Izoformy niskocząsteczkowe, najczęściej o obniżonej aktywności biologicznej zmniejszają pulę aktywnych hormonów natywnych, dlatego wskazane jest hamowanie aktywności enzymów powodujących ich degradację poprzez dodanie do próbek pacjentów odpowiednich inhibitorów, skrócenie do minimum czasu obróbki próbki oraz obniżenie temperatury jej przechowywania. Szczególnie ważne jest hamowanie procesu degradacji w przypadkach tzw. hormonów labilnych mających w swojej sekwencji aminokwasowej szereg miejsc podatnych na działanie enzymów proteolitycznych. Jakkolwiek większość białek krwi jest stabilna trzeba pamiętać, że procesu degradacji enzymatycznej nie da się uniknąć ze względu na obecność we krwi enzymów proteolitycznych, które biorą udział w naturalnym mechanizmie metabolizowania hormonów i usuwania ich z obiegu. Proces ten można jedynie zahamować poczynając od etapu pobrania próbki od pacjenta. Niektóre niskocząsteczkowe fragmenty hormonów białkowych niezależnie od ich aktywności biologicznej mogą mieć znaczenie diagnostyczne.

Dobrym przykładem opisującym złożoność składu izoform hormonów białkowych jest parathormon (PTH). 84-aminokwasowy, bioaktywny parathormon (1-84 PTH), który aktywuje cyklazę adenylową (CAP - ang. *cyclase activating parathormone*) syntetyzowany jest w przystarczających z większej cząsteczki pro-PTH. Obok izoformy 1-84 PTH, która stanowi 10-20% krążących we krwi cząsteczek PTH w obiegu występuje izoforma 7-84 PTH inaktywująca cyklazę adenylową (CIP - ang. *cyclase inactivating parathormone*). Izoforma 7-84 PTH działająca antagonistycznie do 1-84 PTH ma duże znaczenie diagnostyczne, szczególnie w nefrologii (między innymi nagromadza się w schyłkowej niewydolności nerek) (11). We krwi obwodowej występują również środkowe (35-64 i 44-68) oraz C-terminalne (35-84) fragmenty PTH, które także mogą mieć potencjalne znaczenie diagnostyczne (12). W niektórych nowotworach (np. płuca, nerki, jajnika) nagromadza się również białko podobne do parathormonu (PTHrP- ang. *parathyroid hormone-related protein*) - związek o dużej homologii do PTH, ale za którego syntezę odpowiedzialny jest inny gen niż dla PTH (13).

Dodatkowo PTHrP na skutek mutacji występuje w co najmniej 3 izoformach. Parathormon jest hormonem labilnym, podatnym na działanie proteolizy, którego oznaczenie powinno być wykonywane w laboratorium w pierwszej kolejności. Z naszych doświadczeń wynika, że 3 godzinne przechowywanie surowicy nad skrzepem obniża wynik stężenia PTH o ponad 10 %. Niektóre fragmenty powstałe w wyniku proteolitycznego rozpadu PTH mogą reagować z przeciwciałami w teście immunochemicznym. Tak niezwykle złożona sytuacja odzwierciedla trudności, które musimy pokonać, aby wiarygodnie oznaczyć stężenie parathormonu. Wiarygodność tych oznaczeń zależy przede wszystkim od swoistości przeciwciał w stosunku do występujących izoform PTH i PTHrP oraz ich procentowego udziału w próbce, co w pewnym stopniu związane jest z rodzajem schorzenia pacjenta (12,13).

Wpływ izoform o ciężarze cząsteczkowym podobnym do podstawowej izoformy hormonu monomerycznego na wyniki oznaczeń immunochemicznych.

Izoformy tego samego hormonu białkowego o ciężarze cząsteczkowym podobnym do podstawowej izoformy hormonu monomerycznego powstają na skutek działania szeregu enzymów (np. transferaz i hydrolaz) odpowiedzialnych za dołączenie lub usunięcie z cząsteczki hormonu niewielkich grup funkcyjnych takich jak reszty fosforanowe, siarczanowe, amidowe, hydroksylowe lub cukrowe. Grupy te w sposób zasadniczy mogą modyfikować funkcję biologiczną hormonu. Izoformy o ciężarze podobnym do podstawowej izoformy hormonu białkowego wydają się mieć mniejszy wpływ na zmianę wyniku stężenia ze względu na to, że wprowadzone grupy funkcyjne w niewielkim stopniu zmieniają powinowactwo przeciwciał użytych w teście immunochemicznym. Wyjątek stanowią reszty cukrowe (izoformy glikozylowane), które w zależności od budowy hormonu (ilość potencjalnych miejsc glikozylacji) oraz możliwości enzymatycznych komórek i tkanek znacznie przewyższają ciężarem cząsteczkowym główną izoformę nieglikozylowaną. Dołączone cukry mogą maskować epitopy rozpoznane przez przeciwciała i ograniczać rozpoznawalność izoformy glikozylowanej w teście immunochemicznym.

Niektóre grupy funkcyjne mają zasadniczy wpływ na mechanizm działania hormonów białkowych. Na przykład mikroheterogenności w glikozylacji gonadotropin są odpowiedzialne za ich działanie biologiczne i nawet niewielkie modyfikacje kwasu sialowego w cząsteczce gonadotropiny kosmówkowej wpływają na zmianę transdukcji sygnału (14). Z tego powodu izoformy z dołączoną małą grupą funkcyjną mogą być użytecznymi markerami diagnostycznymi. Dobrym przykładem są ostatnio opracowane testy immunochemiczne swoiste dla aktywnej biologicznie izoformy greliny acetylowanej grupą oktanylową (AG), które nie reagują z izoformą nieacetylowaną (DG). Należy mieć jednak na uwadze fakt małej trwałości izoformy AC w surowicy, która łatwo hydrolizuje do izoformy DG (15,16).

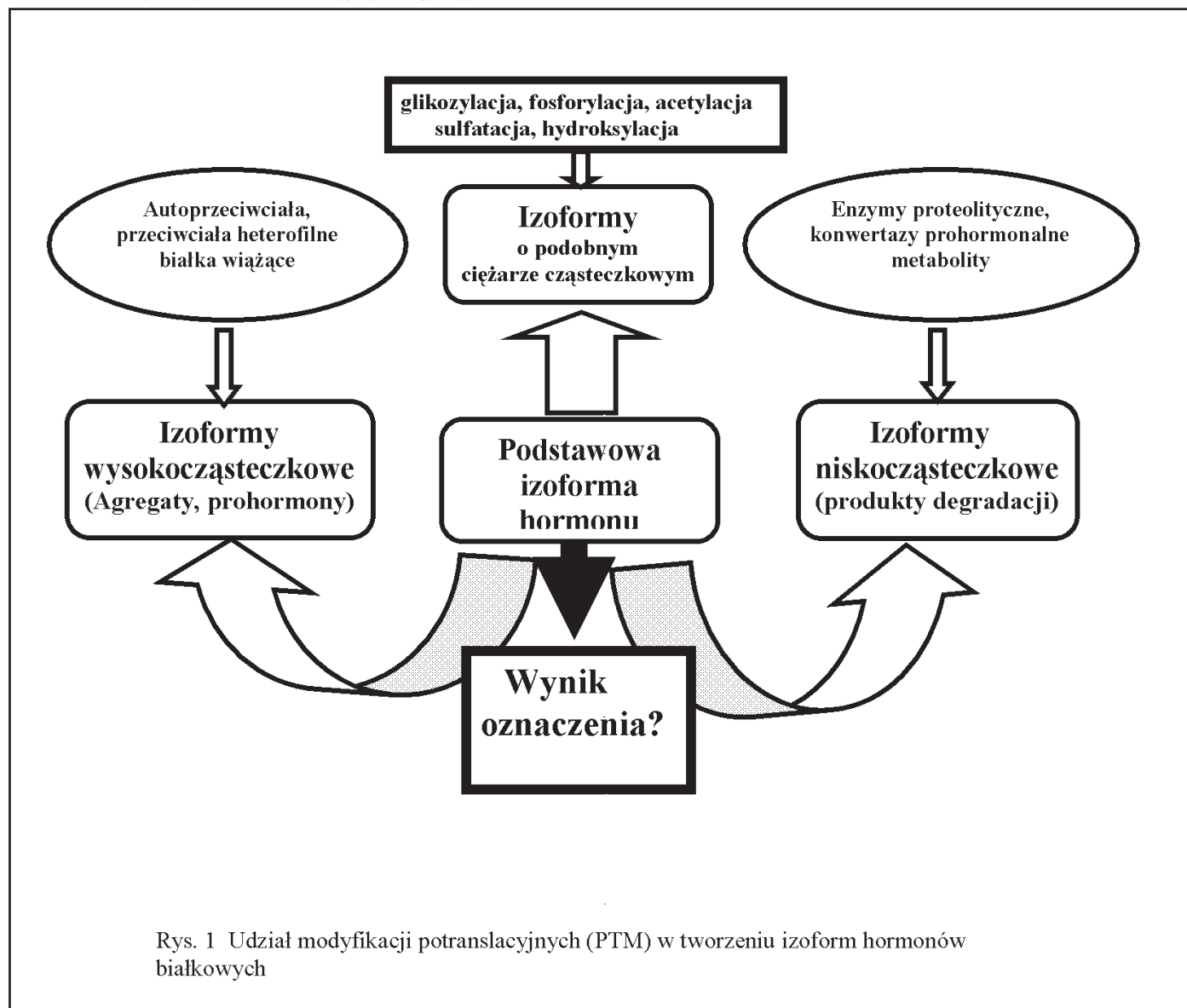
Podsumowanie

Podstawą konstrukcji testów immunochemicznych, niezależnie od rodzaju testu immunochemicznego (testy kompetycyjne lub kanapkowe) oraz użytej technologii znakowania i pomiaru analitu jest utworzenie kompleksu immunologicznego pomiędzy hormonem a swoistym monoklonalnym lub poliklonalnym przeciwciałem. Przeciwciała te są najczęściej otrzymywane poprzez wielokrotną immunizację zwierząt główną izoformą hormonu monomerycznego lub jego fragmentem peptydowym związanym kowalencyjnie z dużym nieimmunogennym białkiem. W konsekwencji powstałe przeciwciała swoiście rozpoznają główną izoformę hormonu monomerycznego lub określone jej epitopy odpowiadające wybranej sekwencji peptydu użytego do immunizacji. Z jakim powinowactwem i czy w ogóle przeciwciało będzie się wiązać z innymi powstałymi na skutek modyfikacji potranslacyjnych izoformami hormonu zależne jest od ich budowy oraz dostępności konkretnego epitopu. Biorąc pod uwagę, że w płynach obwodowych występuje mieszanina izoform hormonów białkowych końcowy wynik stężenia, który uzyskujemy w teście immunochemicznym może być inny dla producentów używających przeciwciał o różnej specyficzności.

Piśmiennictwo

- Walch CT Posttranslational modifications of proteins: Expanding nature's of inventory ed. Roberts and co. publisher 2006,
- Michalik J., Bartoszewicz Z.; Prolaktyna (PRL) wielofunkcyjny, przysadkowy hormon peptydowy. Postępy Biochem. 2002;48 (4):296-305,
- Bartoszewicz Z. Makroprolaktynemia hiperprolaktynemia charakteryzująca się obecnością wysokocząsteczkowej makroprolaktyny 2003; Lab Forum 14: 4-6,
- Jeske W., Zdunowski P., Bartoszewicz Z., Kondracka A., Gorzelak K., Zgliczyński W., Szczupacka I.; Large molecular weight prolactin in patients with hyperprolactinaemia Endokrynologia Polska 2000; 51:237-248,
- Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T et. al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin: implications for metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem. 2003;278:9073-85,
- Nakano Y., Tajima S., Yoshimi A., Akiyama H., Tsushima M., Tanioka T., Negoro T., Tomita M., Tobe T.; A novel enzyme-linked immunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin. J Lipid Res. 2006; 47:1572-1582,
- Sinha M.K., Songer T., Xiao Q., Sloan J.H., Wang J., Ji S., Alborn W.E., Davis R.A., Swarbrick M.M., Stanhope K.L., Wolfe B.M., Havel P.J., Schraw T., Konrad R.J., Scherer P.E., Mistry J.S., HighMolecular-Weight Adiponectin ELISA Clin Chem. 2007;53(12):2144-2151,
- Udział laboratorium w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorób tarczycy cz. 5 (zalecenia National Academy of Clinical Biochemistry dotyczące laboratoryjnej diagnostyki chorób tarczycy) Abott Voice 2004;3(9):2-12,
- Bartoszewicz Z. Hormon adenokortykotropowy budowa oraz zastosowanie w diagnostyce chorób przysadki i nadnerczy. LabForum 2006;28: 9-8,
- Krysiak R., Okopień B., Herman Z.S.; Wyspiak wydzielający insulinę. Pol Merk Lek. 2007:70-74,
- Gensure R.C., Gardella T.J., Juppner H.; Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors BBRC 2005; 328: 666-678,
- Brighurst FR Circulating forms of parathyroid hormone: peeling back the onion. Clin Chem. 2003; 49 (12):1973-1975,
- Bielec A., Czarkowski M., Gierej B., Bartoszewicz Z.; Przełom hiperkalcemiczny w przebiegu raka płaskonabłonkowego kolczystokomórkowego skóry wydzielającego PTH-rP opis przypadku Pol Merk Lek. 2005:788-790,
- Reddy B.V., Bartoszewicz Z., Rebois R.V.; Modification of the sialic acid residues of choriogonadotropin affects signal transduction. Cell Signal. 1996;8 (1):35-41,
- Hosoda H., Kojima M., Mizushima T., Shimizu S., Kangawa K.; Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. J Biol Chem. 2003;278:6470,
- Liu J., Prudom C.E., Nass R., Pezzoli S.S., Oliveri M.C., Johnson M.L., Veldhuis P., Gordon D.A., Howard A.D., Witcher D.R., Geysen H.M., Gaylinn B.D., Thorner M.O.; Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93:1980-1987;

Pełny wybór piśmiennictwa dostępny u autorów



**Oznaczanie wolnych i biodostępnych
hormonów drobnocząsteczkowych**Agnieszka Kondracka¹⁾ i Zbigniew Bartoszewicz^{1,2)}1) Laboratorium Naukowe; Katedra i Klinika Chorób
Wewnętrznych i Endokrynologii

Warszawski Uniwersytet Medyczny

2) Zakład Badawczo Leczniczy Endokrynologii; Instytut
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej; Warszawa

Hormonami drobnocząsteczkowymi będziemy określać hormony nie będące białkami ani peptydami, o niskiej masie cząsteczkowej. Bieżące opracowanie dotyczyć będzie głównie hormonów tarczycy i hormonów sterydowych, które występują we krwi w postaci związanej z różnorodnymi białkami i w znacznie mniejszych ilościach w formie niezwiązanej (wolnej); podobne zasady dotyczą wielu innych hormonów niebiałkowych oraz leków.

**Frakcja związana, wolna i biodostępna
hormonów drobnocząsteczkowych**

W wiązaniu i transporcie hormonów drobnocząsteczkowych we krwi biorą udział różne białka o wysokim lub niskim powinowactwie do wiązanych hormonów, czego skutkiem jest różna łatwość rozdysocjowywania takich kompleksów. Hormony wolne, a także związane przez białka o niskim do nich powinowactwie łatwo dyfundują z naczyń włosowatych do komórek tkanki docelowej, gdzie łączą się z receptorami obecnymi w cytoplazmie i zapoczątkowują reakcje biochemiczne (8). Na określenie tej frakcji używa się pojęcia **frakcja biodostępna**, czyli podlegająca wychwytowi w tkankach lub **frakcja bioaktywna**, czyli wywołująca efekt biologiczny na poziomie komórkowym. Trzeba przy tym pamiętać, że efekt biologiczny hormonu zależy nie tylko od stężenia formy biodostępnej, lecz także od ilości i potencjalnej aktywności receptorów dla danego hormonu.

Uważa się, że biodostępna frakcja hormonów wywołuje efekt fizjologiczny, pełni rolę w systemie zwrotnej regulacji produkcji i wydzielania hormonów oraz podlega metabolizmowi. Stężenie frakcji wolnej lub biodostępnej lepiej niż stężenie całkowitej puli hormonów koreluje ze stanami klinicznymi niedoboru lub nadmiaru hormonów (3,20). Należy także zwrócić uwagę, że określenie „wolne hormony” stosuje się w dwu znaczeniach: jako określenie frakcji wolnej, czyli niezwiązanej z białkami oraz dla odróżnienia od form skoniugowanych np. z kw. glukuronowym lub siarkowym i w tym znaczeniu stosowane jest w takich określeniach jak wolny kortyzol w moczu, wolny estriol w surowicy lub wolne katecholaminy.

**Białka wiążące i transportowe
dla hormonów drobnocząsteczkowych**

Hormony drobnocząsteczkowe wiązane są przez białka specyficzne, o dużym powinowactwie do poszczególnych hormonów oraz białka mniej specyficzne jak np. albumina, stanowiąca ponad połowę białek surowicy krwi. W tabeli 1 podano stężenia głównych białek wiążących i ich udział w wiązaniu osoczowej puli wybranych hormonów.

W wielu sytuacjach fizjologicznych u różnych osób udział puli biodostępnej hormonów może wahać się w szerokich granicach z powodu zmiennej ilości białek oraz w wyniku działania czynników wpływających na ich wiązanie z białkami. Do takich czynników należą niektóre leki, wolne kwasy tłuszczowe, oddziaływania z innymi białkami, zmienny poziom glikozylacji białek wiążących lub występowanie ich wariantów genetycznych oraz współzawodniczenie z innymi hormonami lub cząsteczkami o podobnych własnościach chemicznych (3,20).

Dotychczas uważano, że frakcja hormonów związana we krwi z białkami o wysokim powinowactwie nie podlega przemieszczaniu do cytoplazmy i jest dla receptorów niedostępna. Jednakże w świetle najnowszych badań sytuacja wydaje się być bardziej złożona, wykazano bowiem, że megalina (wielkocząsteczkowa forma receptora LDL) bierze udział w endocytozie SHBG (globuliny wiążącej hormony płciowe) wraz z przenoszonymi przez nią steroidami a hormony uwolnione w cytoplazmie łączą się tam z receptorami (1,22); podobny mechanizm może dotyczyć hormonów tarczycy związanych z apolipoproteinami.

Funkcje białek wiążących to przede wszystkim przenoszenie

hydrofobowych, nierozpuszczalnych w wodzie cząsteczek steroidów, utrzymywanie rezerwowej, buforującej puli hormonu we krwi oraz zapewnianie równomiernego wysycenia tkanki docelowej hormonem dzięki stopniowemu jego uwalnianiu podczas przepływu krwi w naczyniach włosowatych przez tkankę. Związanie przez białka zabezpiecza przed szybkim metabolizmem hormonów, co w przypadku hormonów tarczycy chroni organizm przed nadmierną utratą jodu „zgrupowanego” w krążących hormonach. Podawany w podcewnikach czas półtrwania hormonu dotyczy zwykle całkowitej puli hormonu (wszystkich jego frakcji), lecz frakcja wolna podlega znacznie szybszemu metabolizmowi. Szacuje się, że dla większości wolnych hormonów drobnocząsteczkowych czas półtrwania wolnej frakcji jest krótszy niż 10 min (8), patrz tabela 1. W przypadku miejscowej reakcji zapalnej elastaza uwalniana przez obecne w miejscu zapalenia neutrofile trawi białka transportujące, co prowadzi do uwalniania przenoszonych hormonów (tyroksyny i kortyzolu) i lokalnego zwiększenia stężenia ich form biodostępnych.

**Inne frakcje transportowe
hormonów drobnocząsteczkowych**

Hormony są dostarczane do tkanek przez pełną krew, a nie tylko przez osocze. Ta oczywista informacja znacząco zmienia obraz biodostępności niektórych hormonów drobnocząsteczkowych, ponieważ musimy wziąć pod uwagę rolę wszystkich składników krwi w ich przenoszeniu. Dotyczy to nie tylko wszelkich białek o odpowiednim powinowactwie, cząstek lipoproteinowych, ale także komórek krwi. Rola komórek krwi (gł. erytrocytów, które dominują ilościowo) jest prawdopodobnie istotna w przenoszeniu hormonów sterydowych *in vivo*. Uważa się, że powierzchnia błon komórkowych wiąże znaczne ilości steroidów obecnych we krwi (10). Jest to frakcja częściowo „niewidoczna” w badaniach analitycznych, ponieważ pozostaje w skrzepie bądź osadzie krwinek podczas uzyskiwania surowicy lub osocza. Wiązanie steroidów na powierzchni krwinek ma charakter wiązania o niskim powinowactwie, więc frakcja ta łatwo uwalnia się w tkankach. Podawana w piśmiennictwie i w tabeli 1 biodostępność dotyczy więc tylko frakcji zawartej w surowicy/osoczu, natomiast *in vivo* w odniesieniu do pełnej krwi sytuacja może się różnić.

**Pomiar stężenia frakcji wolnej
hormonów drobnocząsteczkowych**

Już od prawie 30 lat parametrem najlepiej charakteryzującym status tarczycowy pacjenta jest pomiar stężenia frakcji wolnej hormonów tarczycy. Coraz częściej potrzeba oznaczania stężenia wolnej frakcji formułowana jest także w stosunku do niektórych hormonów płciowych jak testosteron czy estradiol, ponieważ wyniki uzyskane dostępnymi w rutynowej diagnostyce metodami pomiaru frakcji całkowitej często nie są zadowalające dla klinicystów (5,17). Wcześniej dla oszacowania frakcji wolnej wykorzystywano różne metody wskaźnikowe jak np. wskaźnik wiązania hormonów tarczycy (THBR - thyroid hormone binding ratio) lub metodę wychwytu (uptake test), które jednak nie sprawdzały się dobrze przy występujących anomaliach w stężeniach białek wiążących lub przy ciężkich schorzeniach pozataczycowych. Znacznie trudniejsze do stosowania było wyliczanie wskaźników wolnych hormonów (free hormone index), ponieważ wymagało pomiaru stężenia głównego białka wiążącego, a wyznaczone wartości referencyjne odnosiły się do ograniczonych grup pacjentów i warunków fizjologicznych (9,20,21).

Metodą referencyjną dla pomiaru frakcji wolnej jest metoda dializy równowagowej (używana jest także metoda ultrafiltracji równowagowej) w wariantach: metoda bezpośrednia lub ze znacznikiem radioaktywnym. Metody te opierają się na fizycznym oddzieleniu frakcji związanej z białkami od frakcji wolnej dzięki zastosowaniu błony dializacyjnej lub filtrów molekularnych z porami o wielkości przepuszczającej wyłącznie związki drobnocząsteczkowe. Techniki te są dość skomplikowane i pracochłonne, wymagają m.in. precyzyjnej kontroli temperatury (37°C), ponieważ wiązanie związków drobnocząsteczkowych z białkiem silnie zależy od temperatury. Mimo, że są to metody referencyjne uzyskuje się różne wyniki w zależności od wariantu metodycznego, składu białkowego surowicy lub użytego znacznika radioaktywnego (14).

Od lat rozwijane są metody immunochemiczne umożliwiające pomiar frakcji wolnej; stosuje się trzy metody konstrukcji testu immunochemicznego (7,20):

1. metoda ze znakowanym analogiem: próbka i analog dodawane są jednocześnie do przeciwciała immobilizowanego na fazie stałej, gdzie hormon i analog współzawodniczą o ograniczoną liczbę miejsc wiążących; w tej i kolejnej metodzie stosowany analog nie powinien mieć powinowactwa do żadnego z białek obecnych w próbce, najczęściej uzyskuje się to przez skoniugowanie analogu z dużymi białkami (lub wielocukrami) stanowiącymi zawadę przestrzenną dla białek wiążących;

2. metoda ze znakowanym przeciwciałem: hormon identyczny lub podobny do mierzonego (np. T3 dla pomiarów fT4, T2 dla pomiarów fT3) zostaje immobilizowany na fazie stałej, dodawana jest próbka oraz znakowane przeciwciała przeciwko wolnej frakcji hormonu; podczas inkubacji wolne hormony obecne w środowisku reakcji konkurują o miejsce wiązania do znakowanego przeciwciała z cząsteczkami hormonu związanymi z fazą stałą; w metodzie tej mierzymy ilość znakowanego przeciwciała związanego do fazy stałej;

3. metoda dwustopniowa: pierwszy etap to inkubacja próbki z przeciwciałem immobilizowanym na fazie stałej, po usunięciu próbki i przepłukaniu fazy stałej niezajęte miejsca zostają wysyczone znakowanym analogiem; analog musi mieć mniejsze powinowactwo do przeciwciała niż hormon, co zapobiega wyparciu hormonu z miejsc wiążących.

Wskazane jest, aby przeciwciała użyte do konstrukcji testu miały powinowactwo do hormonu nie większe niż białka wiążące, by zminimalizować konkurencję o frakcję związaną hormonu. Inkubacja próbki z przeciwciałem musi zachodzić w 37°C (19).

Na przestrzeni ostatnich lat w odpowiedzi na zastrzeżenia odnośnie zbyt dużej zależności wyniku oznaczenia od indywidualnego składu białkowego próbki metody są stale modyfikowane (4,12,14). Metody immunochemiczne muszą uwzględniać fakt, że w środowisku oznaczenia składniki mieszaniny reakcyjnej (dodane przeciwciała i ew. albumina) konkurują ze składnikami surowicy/osocza w wiązaniu hormonów obecnych w mieszaninie. Tworzy się więc nowa równowaga między frakcją wolną i związaną. Znajomość stałych powinowactwa pomiędzy wszystkimi składnikami reakcji pozwala matematycznie skorygować zachodzące zmiany i uwzględnić je w obliczeniach końcowego wyniku. Jednak korekta taka jest prawdziwa dla próbek nie odbiegających składem od przeciętnej w populacji (18). Wyniki uzyskane dla próbek znacząco różniących się składem białkowym lub o granicznych stężeniach hormonów trudno wiarygodnie skorygować bez szczegółowej wiedzy o stężeniu i własnościach białek wiążących obecnych u danego pacjenta. Zmienne, które mogą wpłynąć na wyniki to:

- znacząco odmienny skład białkowy próbki (np. dysalbuminemia, bardzo niska lub wysoka ekspresja TBG globuliny wiążącej tyroksynę),

- znacznie zmienione powinowactwo białek wiążących np. uwarunkowane genetycznie; znane są liczne takie przypadki dla TBG i transtyrektyny, które nie powodują patologii i występują również u osób zdrowych,

- charakterystyczna dla konkretnej surowicy pojemność białek wiążących dla hormonu (tzn. ilość niezajętych miejsc wiążących) im ta pojemność większa tym większy jest spadek stężenia w wyniku rozcieńczenia próbki w trakcie oznaczenia.

Alternatywą do różnych metod bezpośredniego pomiaru frakcji wolnej są metody matematyczne, opierające się na prawie działania mas i wykorzystujące wyznaczone wartości stałych wiązania hormonów do białek wiążących oraz zmierzone całkowite stężenie hormonu, głównych białek wiążących i albuminy. Dla testosteronu najłatwiejszy do użycia jest kalkulator Vermeulena (21) uwzględniający oddziaływania ligand-dwa białka wiążące, dostępny pod adresem internetowym <http://www.issam.ch/freetesto.htm>. Uzyskane wyniki wykazują dobrą zgodność z referencyjną metodą dializy równowagowej, z wyjątkiem wyników dla kobiet ciężarnych. Znacznie bardziej złożony model dla wybranych androgenów, estrogenów i kortyzolu opracował Mazer (11). Model uwzględnia fakt współzawodniczenia różnych steroidów o miejsca wiązania na białkach surowicy (SHBG, CBG-globulinie wiążącej kortyzol i albuminie) i wymaga znajomości stężeń wszystkich

uwzględnionych w nim hormonów i białek. Publikacji towarzyszy arkusz w programie Excel, do pobrania pod adresem doi:10.1016/j.steroids.2009.01.008. Konkurencja pomiędzy testosteronem i estrogenami o miejsca wiążące na SHBG wyjaśnia nieprzydatność modelu Vermeulena dla kobiet ciężarnych. Metoda Mazera może mieć też większą przydatność w sytuacjach suplementacji hormonalnej, leczenia hydrokortyzonem itp. Niestety nie istnieją jeszcze modele uwzględniające wpływ innych czynników drobnocząsteczkowych konkurujących o miejsca wiązania z białkami, jak kwasy tłuszczowe lub leki.

Opracowano również wzory empiryczne np. dla testosteronu (9,13,16) lub kortyzolu (2), które wymagają pomiaru stężenia całkowitych hormonów i głównego białka wiążącego, oraz wykorzystują wyznaczone doświadczalnie współczynniki odzwierciedlające współzależności tych czynników. Zastosowanie takich wzorów jest jednak ograniczone do grupy pacjentów, dla jakich je wyznaczono i nie nadają się one do wykorzystywania w różnorodnych sytuacjach klinicznych.

Możliwości pomiaru stężenia frakcji biodostępnej hormonów drobnocząsteczkowych

Omówione powyżej metody matematyczne umożliwiają obliczenie nie tylko wielkości frakcji wolnej, lecz również wielkości i udziału frakcji biodostępnej w surowicy, liczonej jako suma frakcji wolnej i związanej z albuminą.

Z drugiej strony bioaktywność hormonu zawartego w surowicy lub osoczu można oceniać przy użyciu testów biologicznych. Obecnie aktywność hormonu *in vitro* bada się najczęściej podczas inkubacji komórek o wysokiej ekspresji receptorów dla badanego hormonu (nowotworowych lub rekombinowanych) z surowicą pacjenta i mierzy parametr charakteryzujący reakcję komórek na hormon stymulujący jak np. stężenie cAMP, intensywność proliferacji itp. (15).

Dla hormonów sterydowych interesującą i obiecującą metodą oceny wielkości frakcji biodostępnej może być oznaczanie w ślinie.

Oznaczanie hormonów sterydowych w ślinie

Ślina jest naturalnym produktem ultrafiltracji osocza a transport nieskoniugowanych steroidów do śliny zachodzi na zasadzie biernej dyfuzji według prawa działania mas, praktycznie niezależnie od szybkości wytwarzania śliny. Można przypuszczać że ten sam mechanizm ma miejsce w tkance i dotyczy frakcji, którą określamy jako biodostępną. W przypadku hormonów sterydowych uważa się, że aktywność biologiczną wykazuje frakcja wolna steroidów oraz znaczna część puli niespecyficycznie związanej z białkami. Należy jednak zwrócić uwagę, że procesy zachodzące w śliniankach dotyczą równowagi między pełną krwią a tkanką docelową, więc uwzględniają również udział erytrocytów w przenoszeniu i uwalnianiu hormonów. Uważa się, że szczególnie w przypadku suplementacji hormonami sterydowymi (m.in. hormonalna terapia zastępcza lub antykoncepcja hormonalna) prowadzonej przez skórę jako żel, krem czy w postaci plastrów lub zastrzyków znaczna część podanego hormonu jest adsorbowana na powierzchni erytrocytów i w tej formie rozprowadzana po organizmie. Jest to również frakcja o dużej biodostępności, jednak nie jest oznaczana w standardowych procedurach diagnostycznych opartych na surowicy. Dlatego wydaje się, że pomiar w ślinie najlepiej informuje o biodostępności steroidów. Można powiedzieć, że jest to zachodząca *in vivo* „dializa równowagowa pełnej krwi”. W przypadku szybkich zmian w wydzielaniu hormonów (stres, rytm dobowy, działanie leków) przemieszczanie hormonów do śliny najlepiej odzwierciedla zmiany ich stężenia obwodowego. Zaletą oznaczeń w ślinie jest łatwa dostępność materiału i nieinwazyjne jego pobieranie. Wiele laboratoriów na świecie stosuje oznaczenia hormonów sterydowych w ślinie, lecz wciąż jeszcze metody te nie uzyskały powszechnej akceptacji lekarzy (6).

Pewną komplikacją jest możliwość przemian metabolicznych hormonów w śliniankach, np. kortyzol w ślinie stanowi ok. 70% puli biodostępnego kortyzolu w surowicy, co jest wynikiem działania w śliniankach dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidów katalizującej jego utlenienie do kortyzonu.

Podsumowanie

Oznaczenia wolnych hormonów tarczycy znacznie lepiej charakteryzują aktywność gruczołu tarczowego, niż oznaczenia ich całkowitej frakcji. W rekomendacjach międzynarodowych towarzystw lekarskich coraz częściej pojawiają się również zalecenia oznaczania biodostępnej frakcji hormonów sterydowych np. testosteronu (17). Jednak jakość testów immunochemicznych do oznaczania wolnych hormonów, innych niż tarczycowe, nie jest wystarczająca do wprowadzenia ich jako rutynowych metod diagnostycznych, natomiast wiele alternatywnych metod jest zbyt skomplikowanych technicznie. Zastosowanie metod matematycznych możliwe jest w ograniczonym zakresie i wyłącznie przy ścisłej współpracy lekarza z laboratorium, ponieważ niezwykle trudno jest stosować wartości referencyjne wyznaczone w innych laboratoriach przy zastosowaniu innych metod pomiaru. Można mieć nadzieję, że w najbliższych latach postęp w diagnostyce doprowadzi do nowych, lepszych rozwiązań oznaczania frakcji biodostępnych hormonów.

Piśmiennictwo

- Adams JS. „Bound” to work: the free hormone hypothesis revisited, J. Cell. 2005; 122 (5), 647-649.
- Coolens JL, van Baelen H, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. J Steroid Biochem. 1987; 26: 197-202.
- Demers LM, Spencer CA. NACB. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease (<http://www.nacb.org/>), 2002, National Academy of Clinical Biochemistry.
- Ekins R Validity of analog free thyroxine immunoassays. Clin Chem. 1987; 33(12): 2137-2152.
- Giton F, Fiet J, Guehot J et al. Serum bioavailable testosterone: assayed or calculated? Clin Chem. 2006; 52(3): 474-481.
- Gröschl M. Current status of salivary hormone analysis. Clin Chem. 2008; 54(11): 1759-1768.
- The Immunoassay Handbook, Wild D ed, 2007 Elsevier.
- Kurbel S, Zucic D, Kurbel B et al. Interia of endocrine systems due to hormone binding to circulatory proteins. Med Hypotheses 2003; 60(3): 430-438.
- Lam PL, Handelsman DJ. Empirical estimation of free testosterone from testosterone and sex hormone-binding globulin immunoassays. Eur J Endocrinol. 2005; 152: 471-478.
- Lentjes EGWM, Romijn FHTPM. Temperature dependent

cortisol distribution among the blood compartments in man. J Clin Endocrinol Metabol. 1999; 84(2): 682-687.

11. Mazer NA. A novel spreadsheet method for calculating the free serum concentrations of testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, estrone and cortisol: with illustrative examples from male and female populations. Steroids 2009; 74: 512-519.

12. Midgley JEM. Direct and indirect free thyroxine assay methods: theory and practice. Clin Chem. 2001; 47(8): 1353-1363.

13. Morris PD, Malkin CJ, Channer KS et al. A mathematical comparison of techniques to predict biologically available testosterone in a cohort of 1072 men. Eur J Endocrinol. 2004; 151: 241-249.

14. Nelson JC, Wilcox RB, Pandian MR. Dependence of Free Thyroxine Estimates Obtained with Equilibrium Tracer Dialysis on the Concentration of Thyroxine-Binding Globulin. Clin Chem. 1992; 38(7): 1294-1300.

15. Raivio T, Palvimo JJ, Dunkel L et al. Novel assay for determination of androgen bioactivity in human serum. J Clin Endocrinol Metabol. 2001; 86(3): 1539-1544.

16. de Ronde W, van der Schouw YT, Pols HAP et al. Calculation of bioavailable and free testosterone in men: a comparison of 5 published algorithms. Clin Chem. 2006; 52 (9): 1777-1784.

17. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R et al. Position statement: utility, limitations and pitfalls in measuring testosterone: an endocrine society position statement. J Clin Endocrinol Metabol. 2007; 92(2): 405-413.

18. Sapin R, d'Herbomez M. Free thyroxine measured by equilibrium dialysis and nine immunoassays in sera with various serum thyroxine-binding capacities. Clin Chem. 2003; 49(9): 1531-1535.

19. van der Sluijs Veer C, Vermes I, Bonte HA et al. Temperature effects on free-thyroxine measurements: analytical and clinical consequences. Clin Chem. 1992; 38(7): 1327-1331.

20. Spencer C. Assay of thyroid hormones and related substances, Chapter 6a, in www.thyroidmanager.org, 2004, Published by Endocrine Education Inc, South Dartmouth.

21. Vermeulen J, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. J Clin Endocrinol Metabol. 1999; 84(10): 3666-3672.

22. Willnow TE, Hammes A, Nykjaer A. Endocytosis of sex steroids: the hypothesis of free hormones revisited. Ann Endocr. 2008; 69: 101-102.

Pełny wybór piśmiennictwa dostępny u autorów

Tabela 1

Średnia stężenia głównych białek wiążących i ich procentowy udział w wiązaniu wybranych hormonów w osoczu; udział frakcji wolnej i biodostępnej; czasy półtrwania puli całkowitej i frakcji wolnej hormonów.

TBG - globulina wiążąca tyroksynę, SHBG - globulina wiążąca hormony płciowe, CBG - globulina wiążąca kortyzol (transkortyna),
bd - brak danych

		Wybrane hormony drobnocząsteczkowe					
		tyroksyna	trijodotyronina	testosteron mężczyźni	testosteron kobiety	kortyzol	estradiol
Białka osocza		Udział białek osoczowych w wiązaniu poszczególnych hormonów					
Nazwa	Stężenie g/l	(% puli występującej w osoczu)					
Albumina	43	3-10	20	11-59	7-38	15	61
Transtyretyna	0,25	15-30	5	bd	bd	bd	bd
TBG	0,016	60-75	75	bd	bd	bd	bd
SHBG	0,005	bd	bd	40-88	60-91	bd	37
CBG	0,04	bd	bd	bd	bd	75	bd
		% udział frakcji wolnej i biodostępnej w osoczu					
Frakcja wolna		0,03-0,05	0,1-0,4	1,5-3	0,4-2,6	2-10	0,7-2,7
Frakcja biodostępna		bd	bd	35	7-63		17-81
		Czas półtrwania					
Pula całkowita		7 dni	1 dzień	0,5-64 godz (mediana 8 godz.)		70-90 min	2-36 godz
Frakcja wolna		4 min	5-7 min	3-10 min		7 min	bd

Organizacja laboratoriów prątką gruźlicy w Polsce, ich cele i zadania w programie zwalczania gruźlicy

**Prof. dr hab. Zofia Zwolska Kierownik Zakładu Mikrobiologii
Krajowego, Referencyjnego Laboratorium Prątką Gruźlicy,
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie**

Zadania laboratoriów prątką gruźlicy

Mikrobiologiczne potwierdzenie stanowi najważniejszy element diagnostyki chorego na gruźlicę, służąc: **1.** wykrywaniu źródła infekcji i transmisji zakażenia **2.** potwierdzeniu przypadku podejrzanego klinicznie, **3.** wyboru odpowiedniego režimu terapeutycznego, **4** monitorowaniu leczenia oraz **5.** odległym obserwacjom wyleczonego chorego (**1**).

Metody mikrobiologiczne są tańsze od innych, identyfikują szybko chorych prątkujących, pozwalają na włączenie leczenia przeciwpłatkowego i przerwanie łańcucha transmisji zakażenia w środowisku (**2**).

Głównymi odbiorcami wyników laboratoryjnych są lekarze pionu pulmonologicznego, ponieważ gruźlica w większości przypadków dotyczy układu oddechowego. Jednak z powodu występowania również postaci pozapłucnych (np. kości, nerek, układu rozrodczego, otrzewnej, opłucnej, skóry i innych) lekarze wszystkich specjalności powinni znać zasady hodowli i badań laboratoryjnych *Mycobacterium*. Powinni posiadać wiedzę o czułości i specyficzności różnych metod co ułatwia ich wybór do diagnostyki konkretnego przypadku (dziecko vs dorosły, postać płucna vs pozapłucna, przypadek do potwierdzenia gruźlicy vs do wykluczenia, materiały pobierane inwazyjnie vs wykrztuszone płwocina itp.) (**3**).

Jaki był stan diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy w Polsce 50 lat temu. W 270 laboratoriach prątką zorganizowanych we wspólną sieć pod nadzorem Instytutu Gruźlicy, prowadzono badania metodami z czasów Roberta Kocha. Wiele przypadków diagnozowano za pomocą próby biologicznej używając do tego celu świnki morskiej, czasami królików. Na wyniki oczekiwano miesiącami.

Nowoczesne systemy hodowlane, pracujące już w USA i na Zachodzie Europy były jeszcze niedostępne w krajach bloku wschodniego. Dopiero na początku lat 90-tych ubiegłego wieku (20 lat temu) pierwszy izotopowy system do szybkiej hodowli prątków został zakupiony do Referencyjnego Laboratorium Prątką w Warszawie, co spowodowało przełom w diagnostyce skracając oczekiwanie na wynik badania nawet do kilku dni. Świnka morska jako metoda hodowli stała się już nie potrzebna. Zwierzętarnie w laboratoriach uległy likwidacji, rozpoczął się proces modernizacji. Małe, źle wyposażone laboratoria ulegały likwidacji a do Polski powoli wprowadzano nowoczesne systemy genetyczne. Badania diagnostyczne uległy przyspieszeniu, wynik stał się dostępny w ciągu kilku dni, a nawet w tym samym dniu. Obecnie, gdy podniósł się poziom diagnostyki i zredukowano liczbę laboratoriów o połowę ze 180 (w 1990 r.) do 90 (obecnie) odnotowuje się stałe podnoszenie poziomu usług diagnostycznych. Coraz więcej przypadków podejrzanых klinicznie o gruźlicę potwierdza się w Polsce mikrobiologicznie, średnio w 65 % (48%-90 %). W najlepiej wyposażonych, europejskich laboratoriach potwierdza się mikrobiologicznie u 75-90 % chorych na gruźlicę (**4**). Należy dodać, że takie wyniki są efektem współpracy mikrobiologów i klinicystów.

Po odzyskaniu wolności otworzyły się możliwości bezpośredniej współpracy z partnerami na całym świecie. Łatwość podróżowania pozwala na bezpośrednie kontakty z najlepszymi specjalistami w dziedzinie mikrobiologii gruźlicy. Wreszcie można otrzymywać fundusze na badania naukowe z kraju i ze świata. W dziedzinie mikrobiologii i genetyki prątką gruźlicy jesteśmy równoważnymi partnerami, pracujemy w laboratoriach na świecie, wiele krajów stawia nas jako przykład. Jesteśmy beneficjentami grantów EU i uczestnikami konsorcjów międzynarodowych.

Przeszkodą do utrzymania dobrego poziomu jest brak specjalistów z dziedziny mikrobiologii. Zawód mikrobiologa jest zawodem deficytowym. Utrudniony dostęp do specjalizacji i bardzo drogie

kształcenie (na własny koszt) w Polsce powodują, że wielu absolwentów najlepszych uniwersytetów, wydziałów biologii, mikrobiologii i biotechnologii wyjeżdża na Zachód i do USA. Pensja mikrobiologa diagnosty w Polsce jest nie do zaakceptowania.. We wszystkich Zakładach Opieki Zdrowotnej w kraju, pracownicy laboratoriów są znacznie gorzej opłacani niż równorzędnie wykształceni lekarze. Jest to bariera zawodowa, która niestety powstała w czasach wolności

Nowym zjawiskiem jest oddawanie laboratoriów mikrobiologicznych w dzierżawę w prywatne ręce na krótki 3-4 letni okres. Zwykle nowy właściciel laboratorium rozpoczyna w nim pracę od remontu, który z powodu głębokich zaniedbań z przeszłości trwa co najmniej rok. Przez pozostały czas do następnego przetargu trudno jest radykalnie podnieść poziom laboratorium i nabrać doświadczenia. **Sztuka interpretacji wyniku mikrobiologicznego powstaje w wyniku wieloletniej pracy.** Stoi to w konflikcie z krótkokontraktowymi dzierżawami. Jest to jak na razie zjawisko nowe w mikrobiologii prątką, ale w innych dziedzinach diagnostyki laboratoryjnej już zaistniałe. Dobre zarządzanie powinno mieć na względzie najlepszą diagnostykę oferowaną choremu przy racjonalnym gospodarowaniu kosztami. Ważne jest, aby w procesie obniżania kosztów nie ograniczać się tylko do metod sprzed lat, nie możliwych do zaakceptowania obecnie. **Badanie musi być wykonane w jak najkrótszym czasie przy użyciu najbardziej czułych metod.**

Kolejną kwestią związaną z jakością, pozostaje nieuregulowana sprawa dopuszczania ZOZ-ów, w których laboratoria nie prezentują wymaganego poziomu, do usług diagnostycznych. Źle pracujące laboratoria (nieprawidłowe metody, złe wyposażenie, niski poziom edukacji personelu) pracują nadal, ponieważ ZOZ-y otrzymują zamówienia na usługi diagnostyczne z NFZ. Jest to spowodowane brakiem spójnego systemu zarządzania jakością pracy. Pozostaje jeszcze sprawa BHP. Pracując z czynnikami zakaźnymi laboratoria muszą być wyposażone w podstawowe narzędzia zabezpieczające pracowników. Nie uwzględniano tego w PRL, a obecnie podchodzi się do tej kwestii bardzo niechętnie. Niezbędna do pracy z mikroorganizmami przenoszonym drogą aerogenną komora laminarna gwarantująca III poziom bezpieczeństwa biologicznego (hermetyczności) nie tylko zabezpiecza pracownika przed zakażeniem, zabezpiecza również próbkę od chorego przed krzyżową kontaminacją.

Krzyżowa kontaminacja laboratoryjna, możliwa do udowodnienia tylko metodami biologii molekularnej może mieć miejsce w laboratoriach prątką, co udowodniono wielokrotnie i opisano w literaturze (**5**).

Wśród wielu grup zawodowych pracowników służby zdrowia, pracownicy laboratoriów prątką stanowią grupę największego ryzyka zakażenia prątkami gruźlicy (**6,7,9**). **Dyrektorzy ZOZ-ów, którzy nie wyposażają swoich laboratoriów w komory laminarne narażają nie tylko zdrowie pracowników ale również chorych na błędne wyniki.**

Organizacja laboratoriów prątką

W Polsce, podobnie jak w innych krajach zgodnie z zaleceniami WHO laboratoria prątką od 50 lat są zorganizowane we wspólną sieć, są wyłączone z pracy laboratoriów ogólnych mikrobiologii klinicznej i znajdują się pod nadzorem merytorycznym Referencyjnego Laboratorium Prątką Gruźlicy, oraz Krajowego Konsultanta ds. Pneumonologii. Sieć laboratoriów prątką zorganizowana w Polsce w latach 60-tych XX w. stanowi najbardziej spójny, hierarchiczny system pracujący wśród innych laboratoriów wykrywających choroby zakaźne.

Zgodnie z zaleceniami WHO, laboratoria prątką dzielą się na trzy główne kategorie referencyjności, które różnią się do siebie zakresem wykonywanych badań, ilością personelu specjalistycznego i wyposażeniem, a co za tym idzie szybkością wykonania badania (**8**). Są to laboratoria I, II i III rzędu. Najniższy stopień referencyjności posiadają laboratoria I rzędu i ich liczba jest w wielu krajach świata nieograniczona.

Wykonują one mikroskopowe rozmazy, barwiąc je typową dla prątków metodą Ziehl-Neelsena i mikroskopowo oceniają licząc prątków, która świadczy o intensywności prątkowania chorego.

W wielu krajach rozwijających się **laboratoria I rzędu** są szeroko rozpowszechnione i mogą być zorganizowane w bardzo prymitywnych warunkach geograficznych, nawet w stepie. W Polsce nie ma tego typu laboratoriów, ponieważ bakterioskopia jako jedyna metoda potwierdzania gruźlicy nie jest akceptowana.

W **laboratoriach II rzędu** wykonuje się badanie bakterioskopowe, hoduje prątki na pożywkach i wstępnie identyfikuje gatunki. W **laboratoriach III rzędu** o najwyższym stopniu referencyjności wykonuje się wszystkie wymienione badania, a ponadto hoduje prątki w szybkich systemach automatycznych (izotopowych, kolorymetrycznych, fluorescencyjnych), wykonuje testy lekooporności, testy identyfikacji gatunkowej sondami genetycznymi, metodami chromatograficznymi (w chromatografii HPLC), wykrywa się materiał genetyczny prątków gruźlicy - ich DNA i/lub RNA.

Ilość, kompetencje i zakres pracy laboratoriów prątków powinny zależeć od populacji danego kraju. WHO rekomenduje otwieranie jednego laboratorium II rzędu na 1 mln. mieszkańców, III rzędu na 3-4 mln. mieszkańców.

Wszystkie laboratoria przechowują dodatkowo rozmazy mikroskopowe, kolekcjonują wyhodowane szczepy, konieczne czasami po kilku latach do weryfikacji chorych, zgłaszają chorych potwierdzonych mikrobiologicznie i/lub genetycznie do Inspektoratów Sanitarnych (zgodnie z Ustawą o chorobach Zakaźnych).

Wszystkie laboratoria prowadzą wewnętrzną kontrolę jakości i podlegają zewnętrznym sprawdzianom jakości (9)

W Polsce w 2009 r. zinventaryzowano 88 laboratoriów prątków gruźlicy. Są one niestety nierównomiernie rozmieszczone w kraju w stosunku do potrzeb ludności. Krajowe, Referencyjne Laboratorium powołało 3 regionalne referencyjne Laboratoria, które wyróżniają się bardzo wysokimi standardami pracy i najwyższymi odsetkami potwierdzeń gruźlicy, doskonałym wyposażeniem i doświadczoną kadrą.



- Ryc. 1. Sieć laboratoriów prątków w Polsce w 2009 r.

Spis i adresy wszystkich laboratoriów prątków w Polsce są w posiadaniu KRLP w Warszawie.

Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątków (KRLP)

KRLP pełni w każdym kraju nadrzędną rolę w sieci laboratoriów prątków współpracując ściśle ze specjalistami odpowiedzialnymi za efektywność programu zwalczania gruźlicy (8,9).

Do głównych zadań KRLP należy:

- Ścisła współpraca z Zakładem Epidemiologii Gruźlicy
- Prowadzenie kontroli jakości wykonywanych badań w laboratoriach podległych
- Nadzór nad odpowiednim poziomem badań bakteriologicznych we wszystkich typach laboratoriów, rekomendowanie nowych metod i instrumentów do diagnostyki

- Regularne prowadzenie badań dotyczących częstości występowania we własnym kraju gruźlicy lekoopornej. Dane te prowadzone są zgodnie z protokołem WHO i na ich podstawie tworzy się światowe mapy prevalencji gruźlicy lekoopornej.
- Weryfikacja trudnych diagnoz, np. w pozapłucnych postaciach gruźlicy, niepożądanych odczynów poszczepiennych BCG-ów, typowanie rzadko spotykanych gatunków prątków oraz ustalanie wzoru ich lekooporności, prowadzenie molekularnych dochodzeń epidemiologicznych.
- Prowadzenie badań naukowych dotyczących patogenetyczności prątków u ludzi, badania nad występowaniem prątków w środowisku człowieka, molekularne dochodzenia epidemiologiczne, badania lekooporności mykobakterii na nowe leki przeciwpłukowe, rejestracja i kolekcjonowanie szczepów lekooporności pochodzących od chorych z kraju.
- Prowadzenie międzynarodowych programów badawczych.
- Prowadzenie kursów szkoleniowych dla wyższego i średniego personelu laboratoryjnego.

Prace jednego Laboratorium Referencyjnego powinny obejmować populację 25 do 50 mln.

W Polsce KRLP ściśle współpracuje z WHO i IUATLD (Międzynarodową Unią Przeciwigruźliczą) oraz partnerami z UE, innymi referencyjnymi laboratoriami prątków w Europie i na innych kontynentach. Kierownik NRL jest członkiem Komisji Mikrobiologii i Immunologii IUATLD oraz członkiem grupy ekspertów ICDC.

Praca NRL jest weryfikowana przez międzynarodową kontrolę jakości w Międzynarodowym Laboratorium Prątków. WHO powołało 15 takich laboratoriów na świecie. Partnerem dla polskiego ośrodka jest Holenderski Narodowy Instytut Zdrowia i Ochrony Środowiska w Bilthoven, Holandia (*ang. National Institute of Public Health and the Environmental Protection*).

Kontrola jakości pracy i wiarygodności metod

Istnieje szereg metod, które służą sprawdzaniu jakości stosowanych metod, ich powtarzalności i wiarygodności. Do najważniejszych z nich należy nadzór.

Stały nadzór nad wszystkimi technikami i czynnościami wykonywanymi w laboratorium stanowi najważniejszy element kontroli jakości pracy.

Wszystkie techniki muszą podlegać wewnętrznym sprawdzianom. Np. w bakterioskopii jest to „test podwójnych odczytów” lub odczytywanie kontrolnych preparatów mikroskopowych, w lekooporności, określanie wzorów wg. szczepów standardowych, w identyfikacji wykorzystuje się szereg metod od barwienia metodą Z-N do sond gatunkowych. Ponadto sprawdza się czystość bakteriologiczną wszystkich odczynników przygotowywanych z H₂O, żywność pożywek hodowlanych, ujemne i dodatnie próbki z DNA prątków i wiele innych.

Błędne wyniki wychodzące z laboratorium prątków gruźlicy skutkują:

1. nie wykryciem chorego prątkującego, co niszczy zdrowie jednostki i zagraża osobom z otoczenia,
2. przypisaniem zdrowemu człowiekowi gruźlicy co skutkuje zaniechaniem jego dalszej diagnostyki i włączeniem mu wieloletowego 6-miesięcznego leczenia,
3. Błędne wyniki antybiogramów narażają chorego na progresję choroby, a skarb państwa na ogromne wydatki. Leczenie gruźlicy lekoopornej wymaga 10,000 do 20,000 USD.

Wyniki sprawdzianów jakości w polskich laboratoriach prątków będą przedmiotem innego opracowania.

Motywacja personelu w laboratorium prątków

Laboratoria prątków z powodu swojej ważnej roli jaką pełnią w narodowych programach walki z gruźlicą powinny być dobrze zorganizowane a personel odpowiednio umotywowany. Personel laboratoryjny musi sobie w pełni uświadamiać swoją rolę partnera dla innych służb medycznych w programach walki z gruźlicą. Praca w laboratorium prątków należy do bardzo trudnych co wynika ze specyficzności gatunkowej *Mycobacterium* tj. trudności na każdym etapie diagnostyki, długiego oczekiwania na wynik własnej pracy co bardzo utrudnia skorygowanie błędów i w końcu niebezpieczeństwa nabycia infekcji w trakcie pracy w laboratorium.

Należy pamiętać, że wielu diagnostów nie lubi pracować z plwociną, która stanowi 95% wszystkich materiałów nadsyłanych do laboratorium, a oglądanie w mikroskopie dziesiątków rozmazów jest zajęciem bardzo nużącym, powoduje bóle oczu i głowy. Ponadto personel prowincjonalnych laboratoriów często czuje się izolowany, lekceważony i nie ma łatwego dostępu do edukacji.

Jak więc motywować personel do dobrej pracy. Ogólnie wiadomo, że najlepszą motywację stanowi odpowiednie do obowiązków uposażenie. Niestety pracownicy laboratoriów są bardzo źle wynagradzani.

Zastępcze metody motywowania personelu mogą przebiegać w różny sposób np.

- poprzez nawiązanie i podtrzymywanie ścisłych kontaktów pomiędzy kliniką a laboratorium. Wspólne omawianie trudnych przypadków i okazywanie obopólnego zadowolenia z rozwiązywania problemów;
- włączanie personelu laboratorium do aktywnego uczestniczenia w spotkaniach i dyskusjach prowadzonych z innymi członkami zespołu zajmującego się gruźlicą tj. lekarzami, pielęgniarkami i epidemiologami i menadżerami;
- organizowanie międzylaboratoryjnych spotkań, w celu dyskutowania o problemach
- prowadzenie regularnych kursów „odświeżających” wiedzę na temat nowoczesnych metod i ich wartości w wykrywaniu chorych na gruźlicę, wydawanie odpowiednich certyfikatów osobom kończącym takie kursy.

Prawidłowo zorganizowana sieć laboratoriów prątków, stały nadzór nad jakością badań laboratoryjnych i poprawna współpraca z klinicystami stanowią najważniejsze elementy konieczne do walki z gruźlicą w Polsce. Wysiłki i starania służb medycznych zaangażowanych w zwalczanie gruźlicy dają wymierne rezultaty w postaci obniżania się wskaźników zapadalności i utrzymywanie się odsetków gruźlicy lekoopornej na stosunkowo niezłym poziomie.

Wybrane publikacje:

1. Zwolska Z: Współczesne problemy mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy. Med.Dypl. 2005, Supl.1. Wyd.specj; 49-55.
2. Onyebujoh P, i wsp.. Priorities in tuberculosis research. Lancet 2006; 367; 940-942
3. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997.
4. Augustynowicz-Kopeć E. Gruźlica lekooporna w Polsce. Analiza epidemiologiczna, mikrobiologiczna i genetyczna. Praca habilitacyjna AM w Warszawie 2007.
5. Ruddy M i wsp.: Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* in London microbiology laboratories. J.Clin Microb. 2002, 4100-4104.
6. Laboratory Service in Tuberculosis Control. Part I. Organization and management.. WHO/TB.98.258.
7. Zwolska Z.: Zasady organizacji i bezpiecznej pracy w laboratoriach prątków . w „Higiena i bezpieczeństwo pracy w laboratorium” 2008 (red) Benczek K, Zborowska H, wyd. Verlag Dashofer.
8. Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć E.: Ryzyko zawodowe narażenia na gruźlicę w placówkach diagnozujących i leczących gruźlicę oraz zalecane metody prewencji. W „Higiena w placówkach opieki medycznej 2003. (red) Dulny G., Lejbrandt E., (wyd.) Verlag Dashofer.
9. Rieder H.L., i wsp. The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National laboratory Network . Intern Union Against Tuberc and Lung Disease (IUATLD) 1998

UWAGA P.T. DIAGNOŚCI LABORATORYJNI!!!

OBLIGATORYJNA SKŁADKA Z TYTUŁU CZŁONKOWSTWA
W KIDL WYNOSI OD 1 KWIETNIA 2008 R. - 20,00 ZŁ(SŁOWNIE:
DWADZIEŚCIA ZŁOTYCH) MIESIĘCZNIE
(PODSTAWA PRAWNA : UCHWAŁA NR 48/II/2008 KRDL Z DNIA
29 LUTEGO 2008 R.)

Streszczenia wybranych prac z zakresu mikrobiologii klinicznej opublikowanych w czasopismach zagranicznych w 2009 r.

Emergence and characterization of community - associated methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* infections in Denmark, 1999 to 2006

Larsen A.R., Stegger M., Bocher M., Sorum D.L., Skov R.L.
Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47, 73-78

Metacyclinooporne szczepy *S.aureus* odpowiedzialne za zakażenia w środowisku pozaszpitalnym CA-MRSA po raz pierwszy opisano pod koniec lat 80 tych. Dopiero jednak śmierć 4 amerykańskich dzieci (1999 r.), wcześniej ogólnie zdrowych bez żadnych czynników ryzyka wywołana infekcją CA-MRSA nadała nowego znaczenia tym szczepom. W Danii pierwsze zakażenie CA-MRSA opisano w 1997 r. W roku 2006 w porównaniu do roku 1999 r. stwierdzono blisko 15-krotny wzrost liczby infekcji CA-MRSA (odpowiednio 153 vs 11 przypadków). Niepokojący jest również fakt, iż infekcje te dotyczą głównie najmłodszych tj. dzieci pomiędzy 1 a 10 rokiem życia oraz ludzi w wieku 30-40 lat. Kilkuletnie badania epidemiologiczne prowadzone w Danii nie potwierdziły, wcześniej uwypuklanych w literaturze takich czynników ryzyka zakażenia CA-MRSA jak przebywanie w więzieniach lub skoszarowanie, uprawianie sportu, szczególnie gier zespołowych. Stwierdzono natomiast, że ważnym czynnikiem ryzyka jest nosicielstwo CA-MRSA w rodzinie i łatwa transmisja tych szczepów na innych współmieszkańców. Kolejny czynnikiem ryzyka, z uwagi na szybko rozprzestrzeniający się świński szczep CA-MRSA należący do kompleksu klonalnego CC398, jest praca przy hodowli świń, ważnej gałęzi gospodarki duńskiej.. Izolowane szczepy CA-MRSA odpowiedzialne były w 90,5% za zakażenia skóry i tkanek miękkich a szczególnie ropnie, w około 2% za zakażenia w obrębie ucha i dróg oddechowych i w około 1% za zakażenia oka oraz inwazyjne, w tym krwi, stawów, kości i szpiku a także infekcje dróg moczowych. Zakażenia powodowane były głównie przez szczepy należące do kompleksu klonalnego charakterystycznego dla regionu Europy tj. CC-80, rzadziej przez CC-8 czy CC30 znamienne dla regionu Zachodniego Pacyfiku. Kaseta SCCmec typu IV została wykryta u blisko 82% szczepów . Toksyna PVL (Panton-Valentine leucidine) była wytwarzana przez 66,8% szczepów , w tym przez wszystkie należące do kompleksu CC-80. Kompleks ten również charakteryzowała w przeważającym odsetku (78%) wielolekooporność (oporność na więcej niż 2 grupy antybiotyków nie beta-laktamowych). W grupie szczepów CA-MRSA stwierdzono blisko 19% szczepów wrażliwych na wszystkie grupy antybiotyków poza beta-laktamami.

Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections.

Loens.K., Van Heirstraeten L., Malhotra-Kumar S., Gossens H., Ieven M.
Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47, 121-31

Autorzy zebrali aktualne dane na temat optymalnych metod detekcji najważniejszych patogenów zakażeń dolnych dróg oddechowych (LRTI). Wśród metod pozyskiwania próbek do badań mikrobiologicznych wyróżnili inwazyjne, w tym pozwalające na pobranie materiału w sposób jałowy (krew, płyn z opłucnej, aspirat z płuc) i próbek skontaminowanych florą górnych dróg oddechowych (PSB , BAL) oraz metody nieinwazyjne (pobieranie plwociny, wymazy z nosogardzieli i gardła, badanie antygenów w moczu). Posiew krwi należy do wysoce specyficznych metod, ale stosunkowo rzadko uzyskiwany jest wynik dodatni.

Uznaje się, że możliwość detekcji patogenu we krwi ulega zwiększeniu, gdy krew na posiew zostanie pobrana w pierwszych czterech dniach od wystąpienia początkowych objawów infekcji i znacznie spada w kolejnych dniach. Aspiracja igłowa przez klatkę piersiową jest sporadycznie stosowana, ale obecnie budzi coraz większe zainteresowanie z powodu wysokiej specyficzności i czułości metody (do 80% wyników dodatnich). Próbkę PSB i BAL jakkolwiek zanieczyszczone florą kolonizującą i kontaminującą stanowią wiarygodny materiał w diagnostyce zakażeń dolnych dróg oddechowych. Ilościowa ocena tych materiałów i uzyskanie wzrostu $\geq 10^4$ CFU/ml pozwala na potwierdzenie udziału wyhodowanych drobnoustrojów w zakażeniu. Wśród nieinwazyjnie pobranych próbek szczególne znaczenie ma nadal płwocina, najważniejszy materiał szczególnie w identyfikacji *Streptococcus pneumoniae*. Płwocina jest wartościową próbką, wymaga jednak wcześniejszego potwierdzenia jej przydatności w preparacie mikroskopowym (stosunek leukocytów do nabłonków). Preparat barwiony metodą Grama stanowi też szybką wstępną metodę identyfikacji, zwłaszcza charakterystycznie wyglądających *Streptococcus pneumoniae*. Wiarygodność oceny mikroskopowej zwiększa się, gdy badanie przeprowadzone zostanie w ciągu 30-40 min od pobrania płwociny. Wymazy z nosogardzieli i z gardła nie są odpowiednimi próbkami do badań w kierunku typowych zakażeń bakteryjnych dolnych dróg oddechowych. Ważnym materiałem w diagnostyce LRTI jest również moczu, w którym można wykryć antygeny polisacharydowej otoczki *Streptococcus pneumoniae* jak i antygen *Legionella spp.*. Immunochromatograficzny test (ICT) stosowany w detekcji pneumokoków wykazuje wysoką czułość (80%) i wysoką specyficzność (>95%). Powinien być wykonywany u wszystkich osób z objawami zapalenia płuc i ujemnym preparatem mikroskopowym. Nie ma jednak zastosowania u dzieci, z uwagi na powszechne nosicielstwo pneumokoków wśród najmłodszych. Detekcja antygenów w moczu jest również niezwykle użytecznym badaniem przy podejrzeniu zakażenia *Legionella spp.* Test powinien być wykonywany u pacjentów OIT, a także w przypadkach niepowodzeń leczniczych po podaniu beta-laktamu. Ograniczeniem dostępnymi do tej pory testów jest możliwość wykrycia jedynie antygeny *Legionella pneumophila* serotyp 1. Wyższą czułość dają testy wykonane w próbce skondensowanego moczu w porównaniu z nieskondensowanym (91,6% vs 66,6%). Test daje wyniki ujemne w pierwszych 5 dniach zakażenia i pozostaje dodatni pomiędzy 6 a 14 dniem od początku infekcji. Jego stosowanie przyczynia się do szybkiego rozpoznania legionellozy i wczesnego wdrożenia odpowiedniego leczenia co dalej przyczynia się do obniżenia śmiertelności wśród ciężko chorych pacjentów.

Management of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* infections

Garau J., Bouza E., Chastre J., Gudiol F., Harbarth S.
Clinical Microbiology and Infection, 2009, 15, 125-136

Publikacja zawiera wskazówki dotyczące leczenia zakażeń wywołanych szczepami MRSA, przedstawia znane i nowe opcje terapeutyczne oraz ich ograniczenia. Autorzy poddali dyskusji znaczenie takich antybiotyków jak glikopeptydy, trimetoprim-sulfametoksazol, chloramfenikol, tetracykliny, synercid, daptomycyna, linezolid, tigecyklina. Zwrócili uwagę na szczepy VISA i heterogenne VISA, dla których MIC wankomycyny mieści się w granicach wrażliwości (1-2 µg/ml). Sukces kliniczny z użyciem wankomycyny stwierdzano (60% przypadków), gdy wartość MIC tego glikopeptydu nie przekraczała 0,5 µg/ml i brak sukcesu (90%) przy wartościach MIC wankomycyny 1-2 µg/ml. Zakażenia szczepami MRSA o wysokich wartościach MIC bliskich 2 µg/ml wymagają stosowania wysokich dawek wankomycyny, najlepiej we wlewach ciągłych w celu osiągnięcia $C_{trough} \geq 15$ mg/l, lub też skojarzonej terapii z innymi antybiotykami, w tym z gentamicyną.

Obiecujący, ale wymagający potwierdzenia przydatności klinicznej badaniami u ludzi, wydaje się schemat terapii z użyciem pojedynczej wysokiej dawki gentamicyny w skojarzeniu z wankomycyną. Taka terapia zapalenia wsierdza wywołanego przez *S. aureus* sprzyja maksymalizacji synergistycznego i bakteriobójczego działania

antybiotyków oraz obniżeniu i łagodzeniu destrukcyjnych zmian w obrębie wsierdza. Ważną i skuteczną opcją terapeutyczną w zakażeniach MRSA jest skojarzenie fosfomycyny z imipenemem. Daptomycyna jest wskazana przy braku poprawy klinicznej po podaniu wankomycyny. Należy jednak monitorować wartość MIC daptomycyny, gdyż wcześniejsza terapia i narastanie oporności na glikopeptyd najczęściej koreluje z opornością na daptomycynę u szczepów MRSA. U pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc alternatywą dla wankomycyny jest linezolid, a w zakażeniach skóry i tkanek miękkich oraz w powikłanych zakażeniach wewnątrz brzusznych tigecyklina.

Przygotowała:

dr n. med. Beata Kowalska-Krochmal

Katedra i Zakład Mikrobiologii AM we Wrocławiu

Streszczenia wybranych prac opublikowanych w czasopismach zagranicznych w 2009 r.

Jung B, Adeli K: Clinical laboratory reference intervals in
pediatrics: the CALIPER initiative. *Clin Biochem* 2009,
42, 1589-1595

Przedziały referencyjne podawane wraz z wynikami badań laboratoryjnych są istotnym elementem prawidłowej interpretacji wyników badań i mogą wpływać na podejmowane decyzje kliniczne. Przydatność przedziałów referencyjnych jest uzależniona od starannego wyznaczenia/weryfikacji w laboratorium, z udziałem właściwej populacji pacjentów i z zastosowaniem określonych procedur i metod. Większość przedziałów referencyjnych wyznaczono ponad 20 lat temu, przy użyciu innych metod i aparatury, dlatego odnośnie do nich uzyskiwanych obecnie wyników może prowadzić do podejmowania błędnych decyzji. Zgodnie z wymaganiami akredytacyjnymi medyczne laboratorium diagnostyczne jest zobowiązane do ustalenia (lub weryfikacji) przedziału referencyjnego dla wszystkich metod ilościowych, z wyjątkiem parametrów, dla których obowiązują wartości decyzyjne (cholesterol, glukoza, HbA1c).

Zgodnie z ostatnimi wytycznymi *Clinical and Laboratory Standards Institute* wersja C28-A3 przedziały referencyjne można ustalać *de novo* lub też weryfikować przedziały ustalone w innych laboratoriach (lub proponowane przez producentów odczynników). Ustalenie przedziału referencyjnego jest przedsięwzięciem trudnym pod względem organizacyjnym i kosztownym. Pełna procedura wymaga rekrutacji co najmniej 120 osób o ustalonym kryterium zdrowia. Jeśli poziom analitu jest różny w podgrupach (np. zależnych od wieku lub płci), każda podgrupa powinna liczyć co najmniej 120 osób. Oznacza to, że ustalenie przedziałów referencyjnych w pediatrii może wymagać udziału np. 1200 zdrowych osób. Dlatego wyznacza się je zwykle tylko dla nowego parametru lub nowej metody. Jeśli dostępne są przedziały referencyjne publikowane w literaturze można przeprowadzić znacznie prostszą weryfikację przedziału referencyjnego, co wymaga dysponowania wynikami tylko 20 osób referencyjnych. Jeśli tylko jeden lub dwa wyniki w próbie referencyjnej wykraczają poza proponowany przedział referencyjny może on zostać zaakceptowany. Taka sytuacja jest możliwa, o ile spełniony jest warunek porównywalności metod analitycznych i populacji referencyjnej. Mając do dyspozycji ponad 20 wyników w próbie referencyjnej (a mniej niż 120) można także obliczyć granice przedziału referencyjnego stosując metodę statystyczną odporną na występowanie wartości odstających i inne odstępstwa od warunków stosowania testów statystycznych („robust method”). Niemniej jednak najlepszą metodą ustalania przedziału referencyjnego jest metoda bezpośredniej selekcji próby referencyjnej o liczebności, co najmniej 120 osób i wyznaczenie przedziału referencyjnego metodą nieparametryczną (zakres percentylowy 5-95% lub 2.5-97.5%, czasem <99%).

Zgodnie z wytycznymi CLSI przedział referencyjny może zostać przygotowany przez kilka współpracujących ze sobą laboratoriów, jeśli wykorzystują one tę samą metodą analityczną o określonej spójności pomiarowej.

Dane zebrane z kilku ośrodków służą do obliczenia „wspólnego” przedziału referencyjnego, a następnie przedział jest ponownie weryfikowany w każdym z laboratoriów. Tworzenie „wspólnych” przedziałów referencyjnych teoretycznie umożliwia wprowadzenie uniwersalnych przedziałów „metodyczno/aparaturowych”.

Na tej koncepcji oparty jest projekt CALIPER (*CAnadian Laboratory Initiative on PEdiatric Reference*), który ma na celu ponowne ustalenie przedziałów referencyjnych dla dzieci kanadyjskich od chwili urodzenia do 18. roku życia, z uwzględnieniem podziału na grupy zależne od wieku (0-2 mies., 2-12 mies., 1-5 lat, 6-10 lat, 11-15 lat, 16-19 lat), płci, pochodzenia etnicznego oraz stosowanej technologii pomiarowej. Trwająca obecnie pierwsza faza projektu polega na rekrutacji możliwie największej liczby zdrowych dzieci i młodzieży w przychodniach, szpitalach, przedszkolach, szkołach, placówkach opiekuńczych w całej Kanadzie. Dzięki rozmachowi akcji istnieje nadzieja na uzyskanie odpowiedniej reprezentacji poszczególnych prób populacyjnych. Materiał pobierany jest przez odpowiednio przeszkolony personel, według standardowego protokołu, z uwzględnieniem zmienności przedanalizacyjnej. Materiał jest głęboko mrożony, a jeśli rodzaj próbki lub analitu wyklucza takie przechowywanie, analiza jest wykonywana niezwłocznie w wybranych ośrodkach, zgodnie z określonymi procedurami. W drugiej fazie projektu surowica/osocze zostaną poddane analizie w wytypowanych ośrodkach, z wykorzystaniem 7 najczęściej stosowanych platform analitycznych, tak, aby możliwe było przygotowanie przedziałów referencyjnych zależnych od metody/aparatury. Uzyskane wyniki zostaną opracowane statystycznie zgodnie z aktualnym wytycznymi CLSI, a przygotowane przedziały referencyjne wprowadzone i zweryfikowane we wszystkich laboratoriach w Kanadzie. Dane zostaną opublikowane także na stronie internetowej, gdyż prawdopodobnie będą mogły być adaptowane także w innych krajach świata.

Don-Wauchope AC, Chetty VT: Laboratory defined critical value limits: How do hospital physicians perceive laboratory based critical values? Clin Biochem 2009, 42, 766-770

W Kanadzie i Stanach Zjednoczonych Ameryki medyczne laboratoria diagnostyczne zobowiązane są do telefonicznego powiadamiania odbiorców wyników o przekroczeniu wartości krytycznych. Opracowanie i stosowanie takiej procedury jest jednym z wymagań akredytacyjnych. Przez wartość krytyczną rozumie się wynik badania, który wskazuje na bezpośrednie zagrożenie życia pacjenta i wiąże się z koniecznością natychmiastowej interwencji medycznej. Zgodnie z wytycznymi *Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations and College of American Pathologists* w USA wartości krytyczne powinny być ustalane lokalnie na drodze konsultacji wszystkich środowisk medycznych korzystających z wyników badań laboratoryjnych. Pozwala to dostosować wartości krytyczne do potrzeb użytkowników, przy uwzględnieniu różnic metodycznych i populacji pacjentów.

Autorzy pracy podjęli próbę oceny stopnia akceptacji wartości krytycznych, proponowanych przez laboratorium, przez lekarzy dwóch dużych szpitali współpracujących z Uniwersytetem w Ontario w Kanadzie. Wybraną formą konsultacji środowiskowych była ankieta internetowa, w której proponowano kilka poziomów krytycznych dla najważniejszych parametrów. Na przykład dla niskiego poziomu sodu $\leq 115, \leq 120, \leq 125, \leq 130$ mmol/l. Dla każdego poziomu możliwe były trzy odpowiedzi: „A. dzwonić natychmiast”, „B. dzwonić w godzinach pracy”, „C. nigdy nie dzwonić”. Odpowiedź B. wprowadzono dla oceny zrozumienia przez lekarza idei wartości krytycznych. Przyjęto, że proponowany poziom krytyczny jest akceptowany, jeśli odsetek odpowiedzi A jest wyższy niż 60%, a odsetek C niższy od 20%. Respondentów pytano także o to, kto powinien być upoważniony do odbierania informacji telefonicznych.

W badaniu wzięło udział 115 spośród 1191 lekarzy zatrudnionych w szpitalach. Aż 79% z nich, co najmniej jeden raz zaznaczyło odpowiedź B, co świadczy o tym, że tylko 21%

respondentów rzeczywiście rozumie pojęcie wartości krytycznych. Tylko 4 z 11 proponowanych dotąd przez laboratorium wartości krytycznych zostało zaakceptowanych przez odbiorców wyników (sód, potas, magnez, wodorowęglany). W przypadku pozostałych parametrów lekarze dopuszczają występowanie wartości bardziej odbiegających od referencyjnych. Na przykład dla pH laboratorium proponowało wartości krytyczne 7.2 i 7.6, natomiast lekarze oczekują wiadomości telefonicznej dopiero przy obniżeniu pH poniżej 7.0 lub po przekroczeniu wartości 7.7. Autorzy pracy, w oparciu o dane literaturowe i informacje uzyskane od respondentów, zaproponowali zmianę wykorzystywanych lokalnie laboratoryjnych wartości krytycznych (tabela). Większość lekarzy chciałaby odbierać informacje o przekroczeniu wartości krytycznych osobiście lub za pośrednictwem lekarzy rezydentów.

Przedstawiona praca jest pierwszym tego rodzaju opublikowanym badaniem. Autorzy pracy zaznaczają, że zastosowany przez nich sposób przeprowadzania badań nie jest wiarygodnym narzędziem do opracowania wartości krytycznych i nie polecają tej metody do powszechnego użytku. Ankietę wypełniło niewielu respondentów, nie wszystkie ankiety były kompletne, ankietowani nie w pełni rozumieli koncepcję wartości krytycznych. Uzyskane wyniki wskazują przede wszystkim na potrzebę poprawy komunikacji personelu laboratoryjnego z odbiorcami wyników.

Tabela. Wartości krytyczne u dorosłych zaproponowane po uwzględnieniu informacji pochodzących od ankietowanych lekarzy

Parametr	Wartości krytyczne	
	Niska	Wysoka
Glukoza (mmol/l)	≤ 2.5	≥ 30
Sód (mmol/l)	≤ 120	≥ 160
Potas (mmol/l)	≤ 2.5	≥ 6.0
Wapń zjonizowany (mmol/l)	≤ 0.6	brak
Wapń całkowity (mmol/l)	≤ 1.3	≥ 3.7
pH	≤ 7.0	≥ 7.7
PO ₂ (mmHg)	≤ 35	-
Magnez (mmol/l)	≤ 0.4	-
Wodorowęglany (mmol/l)	≤ 10	-
Fosforany (mmol/l)	≤ 0.25	-

Przygotowała: dr n. farm. Joanna Urbaniak
Katedra i Zakład Analityki Medycznej
Akademia Medyczna we Wrocławiu im. Piastów Śląskich

KOMUNIKAT

Zgodnie z art. 17 ustawy z 27 lipca 2001 roku o diagnostyce laboratoryjnej (DZ.u. z 2001 roku, Nr 100, poz. 1083 z późn. zm.) laboratorium jest zakładem opieki zdrowotnej. Laboratorium może być także jednostką organizacyjną zakładu opieki zdrowotnej, jednostki badawczo-rozwojowej albo wyższej uczelni medycznej.

Status zakładu opieki zdrowotnej laboratorium uzyskuje z chwilą wpisu do rejestru zakładów opieki zdrowotnej prowadzonego przez Wojewodów (ustawa z 30 sierpnia 1991 roku o zakładach opieki zdrowotnej - Dz.U. Nr 91, poz. 408 z późn. zm.). Tym samym laboratorium, musi uzyskać wpis do rejestru wojewody

W obecnym stanie prawnym nie jest dopuszczalne funkcjonowanie medycznego laboratorium diagnostycznego tylko i wyłącznie na podstawie wpisu do ewidencji działalności gospodarczej. Ponadto, zgodnie z art. 19 ust. 2 podmiot, który prowadzi laboratorium, jest obowiązany wystąpić z wnioskiem o wpis laboratorium do ewidencji. Ewidencja prowadzona jest przez Krajową Radę Diagnostów Laboratoryjnych

Jednocześnie uprzejmie informuję, że podmiot który udziela świadczeń zdrowotnych bez wymaganego prawem wpisu podlega karze aresztu, ograniczenia wolności albo grzywny (art. 147 a kodeksu wykroczeń).

Prezes KRDL
(-) Henryk Owczarek

**Przedstawiamy Streszczenia Nagrodzonych Prac
Magisterskich
Studentów kierunku Analityka Medyczna
na Wydziale Farmaceutycznym
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Magdalena Brzeskwiniwicz

Promotor: prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

Katedra i Zakład Biologii i Genetyki GUMed

**"Analiza mutacji genów EGFR, PIK3CA i PTEN w
nerwiaku zarodkowym"**

Nerwiak zarodkowy (neuroblastoma) jest to najczęstszy guz złośliwy wieku dziecięcego. Udowodniono, iż szlak regulacyjny PIK3/AKT/mTOR, który jest często aktywowany w wielu nowotworach, może odgrywać również istotną rolę w patogenezie tego nowotworu. Kluczowymi białkami powyższego szlaku, mogącymi powodować jego nieprawidłowe funkcjonowanie, są kinazy tyrozynowe kodowane przez geny PIK3CA, EGFR oraz białko kodowane przez gen supresorowy PTEN.

Celem przeprowadzonych badań była analiza mutacji punktowych w obrębie eksonów 18-21 genu EGFR, eksonów 5, 6, 10 i 21 genu PIK3CA oraz eksonów 1-9 genu PTEN, a także określenie stopnia amplifikacji genu EGFR. Materiałem badawczym było 87 fragmentów tkanek guzów nerwiaka zarodkowego, zatopionych w parafinie. W analizie mutacji punktowych wykorzystano metody PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy), sekwencjonowania oraz DHPLC (denaturującej wysokosprawnej chromatografii cieczowej). Metodą FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja in situ) określano stopień amplifikacji genu EGFR.

W dwóch guzach (3,2%) wykryto, nieopisaną dotąd, mutację c.931 A>G w eksonie 5 genu PIK3CA. Zmiana ta prowadzi do zastąpienia izoleucyny waliną w pozycji 311 w sekwencji aminokwasowej-p.1311V. Stwierdzono również występowanie sześciu polimorfizmów; w genie EGFR c.2184+19 G>A, c.2361 G>A oraz c.2508 C>T, w genie PIK3CA c.1060-17 C>A i c.1145+54 A>G oraz w genie PTEN c.285 A>T. Są to polimorfizmy, z wyjątkiem c.285 A>T, opisane w bazie danych Ensemble Genome Browser (dbSNP). Zmiany te należą do zmian intronowych bądź synonimicznych, czyli nie powodujących zmian w sekwencji aminokwasowej. Trzy z rozpoznanych polimorfizmów cechowały się dużą częstością występowania (c.2631 G>A- 67,4%, c.1060-17 C>A- 64,8%, c.1145+54 A>G-61,1%). Częstość występowania zidentyfikowanych polimorfizmów była porównywalna z częstością w populacji dla rasy kaukaskiej. Analiza FISH genu EGFR wykryła obecność licznych przypadków polisomii przy równoczesnym braku amplifikacji tego genu. Uzyskane wyniki potwierdzają niską częstość występowania mutacji w genach kodujących białka zaangażowane w szlak regulacyjny PIK3/AKT/mTOR w neuroblastoma.

Anna Gliwińska

Promotor pracy prof. dr hab. Andrzej Szutowicz

**Zakład Medycyny Laboratoryjnej Katedry Biochemii
Klinicznej GUMed**

"Wpływ egzogennych fosfolipidów na HDL"

Apo lipoprotein y (apo) A-I i A-II stanowią odpowiednio 70 i 20% białek we frakcji lipoprotein wysokiej gęstości (HDL). Fizjologiczna rola apo A-II nie została jeszcze wyjaśniona, a wyniki badań nad jej związkami z miażdżycą budzą kontrowersje. Zasadniczą cechą przemian HDL zachodzących w osoczu jest krążenie apo A-I pomiędzy ubogimi w lipidy prekursorowymi cząstkami HDL o dyskooidalnych kształtach (ruchliwość pre-β żelu agarozowym)

i bogatymi w lipidy dojrzałymi sferycznymi HDL (ruchliwość α w żelu agarozowym). Fizyko-chemiczne właściwości apo A-II są podobne do tych jakimi charakteryzuje się apo A-I. Nie udało się jednak wykryć prekursorowych HDL A-II w ludzkim osoczu. Eksperymenty z wykorzystaniem modelowych cząstek HDL sugerują, że w przeciwieństwie do apo A-I, apo A-II nie ma zdolności do uwalniania się z HDL. Badania prowadzone w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej GUMed wykazały, że strukturalna modyfikacja HDL wyizolowanych z ludzkiej surowicy metodą ultrawirowania, zachodząca pod wpływem fosfolipidów, generuje nową trąkę lipoproteinową o cechach prekursorów HDL zawierającą apo A-II (Wróblewska i wsp. J Lipid Res 2009; 50: 667-675).

Celem obecnej pracy było zbadanie mechanizmów powstawania prekursorowych HDL A-II w wyniku oddziaływania pomiędzy liposomami lecytinowymi 5 natywnymi HDL.

Surowicę zawierającą HDL jako jedyną frakcję lipoproteinową (S-HDL) inkubowano przez 1h w 37°C z liposomami lecytinowymi, przy stosunkach fosfolipidów HDL do fosfolipidów liposomów (FL-HDL/FL-LP) 1:1, 1:3 i 1:5. W wyniku interakcji pomiędzy S-HDL z liposomami powstaje nowa, heterogenna frakcja lipoproteinowa wędrująca z ruchliwością pre-β w żelu agarozowym, złożona z cząstek zawierających apo A-I lub/i apo A-II. Liposomy i frakcje pre-β wytrącano z mieszanin inkubacyjnych za pomocą heparyny i CaCl₂. Dzięki temu wykazano, że ilość apo A-I oraz apo A-II uwalnianych z HDL wzrastała wraz ze wzrostem stężenia FL liposomów w mieszaninie inkubacyjnej. Przy stosunku FL-HDL/FL-LP wynoszącym 5:1 HDL traciły około 9% apo A-II. Elektroforeza dwukierunkowa w 0,75% agarozie - gradiencie żelu poliakrylamidowego (2-27%), w warunkach niedenaturujących wykazała, że w populacji zawierającej apo A-I dominowały cząstki o średnicach od 8,3 do 11,3 nm, natomiast w populacji zawierającej apo A-II cząstki o średnicach od 8,7 do 9,1 oraz od 9,7 do 10,5 nm. Na podstawie analizy dystrybucji apo A-I i apo A-II we frakcjach pre-β powstających przy różnych stosunkach FL-HDL/FL-LP stwierdzono, że wzrost stężenia FL liposomów nie wpływał na wielkość powstających cząstek lipoproteinowych. Wskazuje to, że cechuje je stała proporcja lipidów i białek. Za najważniejszą obserwację należy uznać fakt, że w populacji zawierającej apo A-II generowane są głównie małe cząstki, o średnicy około 7,9 nm, a więc zbliżonej do średnicy prekursorowych HDL występujących w osoczu.

Inkubacja pełnej surowicy z liposomami wykazała, że także w obecności innych lipoprotein reakcja pomiędzy HDL i liposomami prowadzi do przesunięcia apo A-I i A-II z HDL do nowopowstających cząstek o ruchliwości pre-β. Na podstawie wielkości cząstek zawierających apo A-II znajdujących się w tej frakcji pre-β można wnioskować, że w tych warunkach część uwolnionej apo A-II wiązała się z cząstkami lipoprotein niskiej gęstości (VLDL).

Wyniki przedstawione w pracy wykazały po raz pierwszy, że podczas transferu FL do HDL, apo A-II uwalnia się z cząstek dojrzałych HDL i tworzy nowe określone populacje cząstek dyskooidalnych. W warunkach fizjologicznych HDL pozyskują FL od lipoprotein transportujących triacyloglicerole - VLDL i chylomikronów. Powstawanie przy tym małych dyskooidalnych HDL A-II może mieć ważny wpływ na metabolizm lipoprotein. Cząstki takie mogłyby wbudowywać się do sferycznych HDL A-I na drodze mechanizmu zależnego od acylotransferazy lecytinowo-cholesterolowej (LCAT) i w ten sposób uczestniczyć w przemianach HDL zachodzących w osoczu. Badania nad związkami funkcjonalnymi pomiędzy apo A-II i hipertriglicydemią wskazują, że HDL A-II mogłyby wbudowywać się też do cząstek VLDL i modulować hydrolizę triacylogliceroli. HDL A-II mogłyby też oddziaływać z przezłonowymi transporterami ABC A-I i wpływać na proces powrotnego transportu cholesterolu.

Część wyników uzyskanych w pracy była prezentowana na 8-mym Międzynarodowym Kongresie Chorób Tętnic Wieńcowych (Praga, Czechy, 11-14.10.2009 i opublikowana w New Approaches In Coronary Artery Disease, Proceedings of the 8th International Congress of Coronary Artery Disease, 2009. str. 71-74).

Marcelina Günther- Peplińska
Promotor: dr hab.med. Ewa Bryl,
Zakład Fizjopatologii GUMed

"Występowanie limfocytów TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$ we krwi obwodowej i płynie stawowym u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów".

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest najczęstszą artropatią zapalną wśród rasy kaukaskiej. Charakteryzuje je symetryczny obrzęk stawów rąk i stóp. RZS może mieć także swój początek w stawie kotanowym, gdzie gromadzi się wysięk zapalny, w którym obecne są limfocyty T. Mimo wielu przeprowadzonych badań nie wyjaśniono jak dotąd patogenetycznej choroby. W ostatnich latach przyjęto hipotezę zakładającą systemowy przebieg RZS, tj. zauważono zaangażowanie obwodowego układu odpornościowego, tj. limfocytów T, które pełnią ważną rolę w indukcji zmian, których wynikiem jest uszkodzenie stawów.

W pracy badano immunologiczne podłoże reumatoidalnego zapalenia stawów. Uwagę poświęcono badaniom komórek posiadających receptor TCR, czyli limfocytów T $\alpha\beta$ oraz T $\gamma\delta$ we krwi obwodowej i płynie stawowym u pacjentów z RZS. Główny nacisk położono na charakterystykę fenotypową limfocytów T z receptorem TCR w obu kompartmentach.

Do badań wykorzystano materiał biologiczny pochodzący od pacjentów z RZS oraz ludzi zdrowych. W grupie badanej (chorzy na RZS) pobierano tego samego dnia krew obwodową oraz płyn stawowy ze stawu kolanowego. W grupie kontrolnej analizie poddano krew obwodową.

Dzięki zastosowaniu nowoczesnej techniki, jaką jest cytometria przepływowa, możliwa była ocena ekspresji antygenów powierzchniowych dla poszczególnych subpopulacji limfocytów T z TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$.

Uzyskane wyniki wskazują na istotne zwiększenie ilości oraz odsetka limfocytów TCR $\gamma\delta$ w płynie stawowym w porównaniu do poziomów we krwi obwodowej tych samych osób. Należą one do różnych subpopulacji, co przemawia za heterogennością immunologiczną RZS, współistniejącą z różnym przebiegiem klinicznym choroby. Przedstawione wyniki wnoszą ważne elementy do poznania patomechanizmu reumatoidalnego zapalenia stawów i mogą stanowić początek szerszej analizy, która docelowo może stać się czynnikiem prognostycznym przebiegu RZS.

Filozofia klasyczna wobec problemów bioetyki

Kazimierz Szalata
 RECENZJA KSIĄŻKI

Tadeusz Ślipko S. J.: „*Bioetyka*” Wydawnictwo Petrus, Kraków 2009 stron 519.

Kiedy coraz częściej stajemy wobec problemów moralnych, które najwyraźniej przerastają nas i nie potrafimy jednoznacznie oceniać naszych działań, chcielibyśmy na nowo wrócić do autorytetów. Dotyczy to zwłaszcza zagadnień związanych z nieustannym postępem w naukach biomedycznych, które niemal z dnia na dzień zmieniają oblicze nowoczesnej diagnostyki i terapii. Coś, co wczoraj można było znaleźć co najwyżej na kartkach książek futurystycznych staje się zespołem faktów, które czasem cieszą, czasem zaś napawają nas niepokojem a nawet przerażeniem. Dzięki wciąż poszerzającym się możliwościom diagnostyki możemy dziś zbierać jak największą ilość informacji o stanie pacjenta, co pozwala na skuteczniejsze działania prewencyjne i terapeutyczne, ale też przy złym ich zastosowaniu otwiera pole do manipulacji i nadużyć.

Wiemy zatem dobrze, że bardziej niż kiedykolwiek potrzebujemy solidnej wiedzy antropologicznej i głębokiej refleksji etycznej, która pozwoliłaby dobrze ocenić szanse i zagrożenia, przed jakimi staje współczesna medycyna. Z tym większą radością przyjmujemy ukazanie się nowej książki znanego krakowskiego moralisty ks. prof. Tadeusza Ślipki, który jest wielkim autorytetem w dziedzinie nauk moralnych nie tylko w Polsce, ale i w Europie. Mam na myśli monograficzną pracę „*Bioetyka. Najważniejsze problemy*” stanowiącą jakby podsumowanie wieloletniej pracy nad najbardziej trudnymi problemami moralnymi współczesnego świata.

Autor znanych i cenionych podręczników akademickich do etyki /*Tadeusz Ślipko: „Zarys etyki ogólnej”, Kraków 1974.” oraz „Zarys etyki szczegółowej”, tom 1-2, Kraków 1982”*/, które doczekały się wielu wydań, tym razem przedstawia nam solidną filozoficzną refleksję nad szansami i zagrożeniami, jakie niesie dla człowieka współczesna medycyna. Na tle wielu prac dotyczących bądź co bądź modnej dziś problematyki biotycznej, praca prof. Ślipki jest wyjątkowa. Autorem jej jest bowiem nie jeden z elokwentnych postmodernistów przedstawiających w atrakcyjny sposób relatywistyczne ujęcia, w których człowiek uwolniony od prawdy i dobra czuje się „panem własnego losu”, panem własnych ocen moralnych skrojonych na miarę mojego światopoglądu. Prof. Tadeusz Ślipko, absolwent Wydziału Teologicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego reprezentuje poważną szkołę klasycznej arystotelesowsko-tomistycznej filozofii. Jest autorem opierającym swoją koncepcję na największych autorytetach klasycznej myśli. Przez wiele lat wykładał etykę w Akademii Teologii Katolickiej w Warszawie, gdzie jako jeden z pierwszych polskich autorów zajmował się problemami, które dziś są przedmiotem zrodzonej w latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia bioetyki /*„Granice życia. Dylematy współczesnej bioetyki”, Warszawa 1978*/.

Czytelnik omawianej pracy dowie się, że wbrew powszechnej opinii, iż każdy na swój sposób może uprawiać bioetykę, i może głosić dowolne poglądy w tej dziedzinie, bioetyka jest nauką i to nie byle jaką. Jak każda inna dyscyplina posiada swój przedmiot i metodę. Jest nauką filozoficzną dystansującą wszelkie, zaledwie emocjonalne, jak też jakościowe ujęcia człowieka. U podstaw bioetyki, która jest niczym innym, jak jedną z etyk szczegółowych leży jakaś wizja człowieka, inaczej mówiąc jakaś antropologia /*Aktualnie funkcjonujące koncepcje człowieka omawia Roman Darowski w książce „Filozofia człowieka. Zarys problematyki”, Kraków 2008*/.

Właściwie wszystkie dzisiejsze spory w etyce czy bioetyce są w gruncie rzeczy sporami o koncepcję człowieka. Dlatego tak bardzo cenna jest leżąca u podstaw etyki ks. prof. Ślipki realistyczno-personalistyczna koncepcja osoby ludzkiej. Realistyczna, bo ujmująca człowieka jako realny byt, nie tylko element jakiegś struktury społecznej, jakiegoś projektu, czy jakiegś wizji świata. Jest personalistyczna, bo ujmując człowieka, jako osobę a więc byt rozumny, świadomy swej obecności w świecie, byt przytomny zdolny do poznawania świata, formułowania ocen i dokonywania wolnych wyborów. Jako takiemu bytowi przysługują przynależna mu w sposób bezwzględny godność.

W swoim obszernym, bo liczącym ponad pięćset stron dziele ks. prof. Ślipko proponuje rzetelną refleksję filozoficzną nad życiem ludzkim w jego pełnym, osobowym wymiarze. Wprowadza przejrzysty porządek w najczęściej powierzchowne i byle jakie próby podejmowania kwestii biotycznych. Jak przystało na porządną dyskusję filozoficzną, mający swój wzorzec w dziełach Arystotelesa i Cyserona wszelką refleksję rozpoczyna od zdefiniowania przedmiotu, którym się zajmuje. Zdefiniować bowiem jakieś pojęcie, to co prawda jeszcze nie filozofia, ale nie da się filozofować wówczas, gdy do końca nie wiemy, czym się zajmujemy.

Okazuje się, że już sama definicja bioetyki, jaka funkcjonuje w literaturze jest niejednoznaczna. Bioetyka uprawiana najczęściej w interdyscyplinarnych środowiskach przypisywana jest ona do różnych dziedzin, niekoniecznie związanych z filozofią, w której tylko jest miejsce dla refleksji moralnej /*Dla przykładu prof. O. Wilson w książce „Sociobiology: the New Synthesis” uważa, że zagadnienia bioetyki należy oddać dziś w ręce biologów. Por: „Une même éthique pour tous?” sous la dir. de Jean-Pierre de Changeux, ed. Odile Jacob, Paris 1997. s 78*/Ks. profesor Tadeusz Ślipko sytuuje bioetykę w filozofii, która jest jedyną nauką dysponującą narzędziami poznawczymi pozwalającymi na formułowanie norm moralnych opartych na prawdzie o człowieku. „*Bioetyka [...] stanowi dział filozoficznej etyki szczegółowej, która ma ustalić oceny i normy (reguły) moralne ważne w dziedzinie działań (aktów) ludzkich polegających na ingerencji w granicznych sytuacjach związanych z zapoczątkowaniem życia, jego trwaniem i śmiercią*” /*Tadeusz Ślipko S. J.: „Bioetyka” Wydawnictwo Petrus, Kraków 2009 s 18*/.

Prawdą jest, że podejmowanie zagadnień biotycznych wymaga szczegółowej wiedzy na temat zaawansowanych procedur biomedycznych, wiedzy z poziomu nauk eksperymentalnych i jest rzeczą oczywistą, że bioetyka musi być uprawiana zawsze w jakimś

interdyscyplinarnym kontekście.

Jednak oceny moralne rozpoznanych faktów mogą być formułowane na terenie filozofii i w oparciu o solidną filozoficzną antropologię.

Prezentowana w książce wykładnia bioetyki jako etyki szczegółowej, budowana jest na naturalnym poznaniu filozoficznym. Jako taka, nie może być w żadnym razie uznawana za stanowisko światopoglądowe. Wrażliwość metodologiczna krakowskiego filozofa oczyszcza myśl filozoficzną z wszelkich światopoglądowych wpływów. Nie ignoruje stanowisk religijnych i światopoglądowych, kształtujących naszą świadomość moralną. W tym sensie można powiedzieć, że jest głęboko zanurzona w tradycję chrześcijańską.

Pierwszym zespołem omawianych zagadnień wiążącym się z szeroko pojętą ekologią, będącą nauką o środowisku naturalnym człowieka. Jak można się szybko zorientować, podobnie jak cała bioetyka, dziedzina ta wymaga uporządkowania. Książę profesor Ślipko zwraca uwagę na dwie orientacje filozoficzno-etyczne określające nasz stosunek do przyrody. Pierwsza związana jest z biblijną zachętą „czyńcie sobie ziemię poddaną” prowadząca do dominacji nad przyrodą, druga zaś wywodząca się, jak to nazywa nasz autor, z „kultu życia” do swoistego partnerstwa w relacjach z przyrodą. Zarówno w jednej, jak i drugiej wizji kryje się wiele niebezpieczeństw. Ekologia, jaką proponuje książę profesor Ślipko jest nauką mocno osadzoną w solidnych podstawach jakie daje antropologia filozoficzna. By bowiem dobrze zrozumieć odniesienia człowieka do jego naturalnego środowiska, trzeba wiedzieć, kim jest człowiek. A to przecież w naszej kulturze jest coraz mniej jasne /Znakomity filozof szwajcarski prof. Marie Dominique Philippe mówi, że temat człowieka jest „niechodliwy” w naszej kulturze. Tym co „chodliwe” zajmują się jednak sofiści, a nie filozofowie. Por. „Trzy mądrości” z M. D. Philippe rozmawia Frédéric Lenoir; przekład Agnieszka Kuryś, Wydawnictwo Karmelitów Bosych, Kraków 2008, s. 26/.

Drugi ważny zespół zagadnień moralnych podjętych przez ks. prof. Ślipkę w „Bioetyce” stanowi szeroko pojęta inżynieria genetyczna. Krakowski profesor, ze swoją rzetelną metodyką porządkuje zagadnienia, definiuje podstawowe pojęcia i charakteryzuje poglądy obecne w aktualnych dyskusjach i w końcu formułuje swoje stanowisko oparte na antropologicznych i aksjologicznych podstawach filozoficznych.

Ks. Ślipko dokładnie omawia wszystkie kwestie moralne dotyczące początków ludzkiego życia (embriologia, manipulacje genetyczne, zapłodnienie pozaustrojowe, „macierzyństwo zastępcze, problem „produkcji” i zamrażania embrionów ludzkich, diagnostyka prenatalna i aborcja), odnosząc je do podstawowej prawdy o człowieku w jego pełnym osobowym wymiarze. Choć, jak to już zaznaczyliśmy, książę profesor Ślipko reprezentuje w swych poglądach etykę katolicką, w ujęciach prezentowanych problemów nie ma nic z ciasnego dogmatyzmu, ale uczciwy dialog ze wszystkimi obecnymi dziś stanowiskami w filozofii człowieka leżącym u podstaw rozważanych problemów bioetycznych. Widać to wyraźnie przy okazji omawiania szczegółowych zagadnień. Wbrew powszechnym opiniom o zastrzeżeniach moralnych przedstawicieli etyki katolickiej dotyczących badań prenatalnych ks. Ślipko wyjaśnia, że wtedy, gdy badania te otwierają perspektywę nowych dotąd niedostępnych możliwości terapeutycznych, zasługują one na uznanie. Gdy są tylko elementem działań zmierzających do wyeliminowania nienarodzonego człowieka z takich czy innych względów stają się one elementem zespołu niegodziwych działań nie respektujących należnego prawa człowieka do nienaruszalności jego życia.

Wśród licznych zagadnień poruszonych w omawianym obszernym compendium bioetycznym na szczególną uwagę zasługują rozważania dotyczące eksperymentów medycznych, transplantologii, działań terapeutycznych przynoszących w skutkach okaleczenie, czy też działań, których celem jest pozbawienie życia człowieka, w celu uwolnienia go od cierpienia. Książę profesor Ślipko jednoznacznie sprzeciwia się wszelkim formom eutanazji biernej i czynnej. Nie akceptuje też zasady walki o życie człowieka za wszelką cenę, wtedy, gdy człowiek stojący w obliczu nieuchronnej śmierci jest na etapie agonii.

Dla głębszego zrozumienia pojęcia tak zwanej „godnej śmierci” ks. Ślipko proponuje wyjście poza język czysto medyczny który

pozwała spojrzeć na agonię nie jak na stan chorobowy, ale etap w życiu osobowym człowieka. Zwraca uwagę, że należy go ująć w innym, niż medyczny kontekście. „Jeżeli określenie „godnej śmierci” ma sens, to właśnie w tym kontekście, gdy gaśnie nadzieja uleczenia człowieka, należy mu stworzyć warunki możliwie odpowiedniego zejścia z tego świata”/Por. „Trzy mądrości” z M. D. Philippe rozmawia Frédéric Lenoir; przekład Agnieszka Kuryś, Wydawnictwo Karmelitów Bosych, Kraków 2008, s 435/- czytamy w omawianej książce.

Nie jesteśmy w stanie omówić wszystkich zagadnień, jakie zostały podjęte w omawianej książce. Szkoda, że zabrakło tam wyodrębnienia zagadnień dotyczących rozwijającej się wraz z innymi dziedzinami medycyny diagnostyki laboratoryjnej. Książka powstała na bazie wieloletnich badań sięgających lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia, kiedy nie było jeszcze w naszym kraju świadomości odrębności diagnostyki. Jeśli jednak przypomnimy sobie zdanie wielkiego autorytetu w świecie medycznym z przełomu XIX i XX wieku Władysławie Biegańskim, który był wrogiem tworzenia jakichkolwiek etyk szczegółowych, uznając, że podstawowe, ogólne normy moralne są wystarczającą bazą dla formułowania ocen w zagadnieniach szczegółowych, możemy z całą pewnością stwierdzić, że jest to książka również dla diagnostów. Wyznacza bowiem jasną metodę badań opartych na personalistycznej antropologii filozoficznej, na której budowały się zręby naszej europejskiej cywilizacji.

A P E L

Do tych wszystkich Koleżanek i Kolegów, którzy wykonują czynności diagnostyki laboratoryjnej i dotąd nie dysponują dokumentem „PWZDL”. Postępowanie takie jest naruszeniem zasad etyki zawodowej oraz jest niezgodne z obowiązującym prawem [vide: Rozdział 8 pt: „Odpowiedzialność karna”, art. 71 ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (tekst jednolity: Dz. U. 04. 144. 1529 z późn. Zm.)].

Czesław Głowniak
Sekretarz KRDL

UWAGA

Prosimy uprzejmie, tych wszystkich PT Diagnostów Laboratoryjnych, którzy ostatnio:

- uzyskali specjalizację,
- zmienili adres zamieszkania,
- zmienili dowód osobisty,
- zmienili zakład pracy,
- zmienili nazwisko,

Aby w trybie pilnym przesłali do biura KIDL kserokopię (potwierdzoną za zgodność odpisu z oryginałem), w/w dokumentów, zgodnie z art. 8 ust. 3 ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (tekst jednolity: Dz. U. 2004.144.1529 z późn. Zm.).

Czesław Głowniak
Sekretarz KRDL

PRZYPOMNIENIE

Informujemy wszystkich, że wyniki badań laboratoryjnych są autoryzowane przez Diagnostę Laboratoryjnego poprzez podpisanie wyniku i przystawienie pieczętki (według jednolitego wzoru, ustanowionego uchwałą Nr 82 / II / 2009 z 4 listopada 2009 roku).

Czesław Głowniak
Sekretarz KRDL

KOMUNIKAT RZECZNIKA DYSCYPLINARNEGO KIDL

**Rzecznik Dyscyplinarny KIDL nie odpowiada na telefon
i anonimowe pisma .**

Uprzejmie informuję, że zainteresowane osoby i strony kierujące do Rzecznika Dyscyplinarnego KIDL (ul. Konopacka 4, 03-428 W-wa) skargi i pisma powinny przysyłać je pisemnie (!!!) z podaniem adresu do korespondencji, zaś w przypadku PT Diagnostów Laboratoryjnych, oprócz adresu, należy podać numer wpisu na listę diagnostów lab. DANE TE POZOSTAJĄ WYŁĄCZNIE W DYSPOZYCJI I DO INFORMACJI RZECZNIKA DYSCYPLINARNEGO KIDL

Ewa Tuszeńska
Rzecznik Dyscyplinarny KIDL

CB 350i

*Wysokowydajny
analizator automatyczny
wraz z modułem ISE*



Urine Strip

*Testy paskowe
do analizy
moczu*



Labin Polska sp. z o.o.
ul. Poezji 19 (bud. nr 10)
04-994 Warszawa
tel. 22 872 43 52
tel./fax 22 872 41 64
biuro@wiener-lab.pl
www.wiener-lab.com.ar



Wiener lab świętuje 50-lecie istnienia

- Firma założona została w 1960 roku przez dra Miguela Rojkina i Jose Berlanda z myślą podporządkowania badań naukowych i technologii potrzebom ochrony zdrowia poprzez wprowadzanie produktów jednocześnie innowacyjnych i niezawodnych.
- Siedziba główna Wiener lab, zakłady produkcyjne oraz Centrum Badań i Biotechnologii znajdują się w Rosario w Argentynie. Firma produkuje zestawy odczynników i dostarcza aparaturę dla potrzeb analizy biochemicznej, koagulologicznej, hematologii oraz immunologii. Produkty te wytwarzane są dla laboratoriów klinicznych i specjalistycznych.
- Wiener lab działa w oparciu o wysokowykwalifikowanych naukowców, technologów i spec-



jalistów, co pozwala na konstruowanie większości produktów we własnym Centrum Badań i Biotechnologii. Niektóre produkty są efektem projektów opracowywanych wspólnie z instytucjami o światowej renomie.

www.wiener-lab.com.ar

Nauka i technologia w służbie zdrowia

 **Wiener lab**
G R O U P

Labin Polska sp. z o.o.