UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
KATEDRA BIOCHEMII I FIZJOLOGII ZWIERZĄT
Zakład Biochemii
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12
tel. 081 445 69 73

Znaczenie diagnostyki laboratoryjnej

Podstawą metabolizmu jest sieć układów enzymatycznych, których skoordynowana działalność zapewnia uzyskanie i wykorzystanie niezbędnych do życia substancji oraz energii. Znajomość poszczególnych przemian metabolicznych, jak i mechanizmu działania enzymów, oraz ich właściwości pozwalają na zrozumienie znaczenia tych zjawisk dla właściwego funkcjonowania żywego organizmu. Aby jednak organizm jako całość funkcjonował właściwie, niezbędna jest prawidłowa koordynacja poszczególnych przemian na poziomie komórki, tkanki, narządu i wreszcie całego organizmu. Jeśli koordynacja zawiedzie mamy najczęściej do czynienia z chorobą, co objawia się zmianami stężeń metabolitów, hormonów czy aktywności enzymów.

Dzięki coraz większym możliwościom aparaturowym jesteśmy w stanie śledzić coraz więcej reakcji i odkrywać drogi przekazywania sygnałów zarówno pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a organizmem, jak i wewnątrz organizmu. Ta wiedza wykorzystywana jest nie tylko dla celów poznawczych, ale także diagnostycznych i terapeutycznych.

Diagnostyka laboratoryjna otwiera przed lekarzami ogromne możliwości „podglądania", co się dzieje w komórce i porównywania tego pomiędzy zdrowym a chorym osobnikiem. Ażeby jednak wykorzystać te możliwości jakie niesie ze sobą nowoczesna diagnostyka laboratoryjna, niezbędna jest wiedza nie tylko co i kiedy oznaczać, ale także jak interpretować otrzymany wynik. Do tego z kolei niezbędny jest zasób wiedzy o podstawach metabolizmu i jego koordynacji, która odbywa się na wielu poziomach.

Diagnostyka enzymologiczna

Mechanizm działania enzymów i ich właściwości, o których uczymy się podczas zajęć z enzymologii, dotyczą najczęściej wyizolowanych enzymów. W komórkach mamy do czynienia z reguły z układami wieloenzymowymi, podlegającymi różnym wpływom. Co więcej, układy te mogą być zlokalizowane w różnych przestrzeniach komórki, tworząc tzw. topografię enzymatyczną (kompartmentacja).

Cechą metabolizmu komórkowego jest istnienie wielu przebiegających niemal równocześnie torów metabolicznych, które wymagają wzajemnej koordynacji wielu układów wieloenzymowych, a także podlegają specyfice narządowej. W układach wieloenzymowych poszczególne reakcje sprzężone są poprzez wspólne metabolity jako produkty jednych, a substraty następnych.

Koordynacja układów wieloenzymowych wymaga dostosowania szybkości przebiegu poszczególnych reakcji w danym procesie. Szybkość reakcji zależy od:

- ilości cząstek enzymu, która z kolei jest skutkiem regulacji szybkości procesów syntezy i rozkładu białek enzymatycznych (regulacja biosyntezy białka);
- szybkości przekształcania substratu, zależna od stężenia metabolitów, lokalnego pH, ewentualnie potencjału redox, hamowania przez produkt, obecność inhibitorów lub aktywatorów, o czym mówi kinetyka enzymatyczna.

Oprócz kompartmentacji wpływ na regulację aktywności enzymów ma swoistość substratowa oraz swoistość reakcji. Pamiętać należy także o wpływie regulacyjnym hormonów oraz układu nerwowego. Co więcej, znaczenie mają tu także dostępność i asocjacja/dysocjacja koenzymów, jony metali, obecność miejsc łączenia ligandów i same ligandy.

Stan błon komórkowych może mieć znaczenie dla właściwej aktywności niektórych enzymów. W warunkach fizjologicznych przepuszczalność błon komórkowych i mitochondrialnych jest wybiórcza dla

metabolitów oraz jonów i może tym samym nadawać kierunek reakcjom enzymatycznym. W momencie zmian w przepuszczalności dochodzi nie tylko do „wyciekania" niektórych białek enzymatycznych, ale także zmian w stężeniach niezbędnych metabolitów. Np. uważa się, że aminotransferaza alaninowa zlokalizowana w cytozolu przekształca pirogronian w alaninę, zaś mitochondrialna przeprowadza reakcję odwrotną przekształcenia alaniny w pirogronian. W przypadku aminotransferazy asparaginianowej enzym zlokalizowany w cytozolu przekształca szczawiooctan w asparaginian, podczas gdy ten z mitochondrium katalizuje przemianę asparaginianu w szczawiooctan.

W niektórych przypadkach można mówić o genetycznej kontroli aktywności enzymów. Istnieją choroby genetyczne w przebiegu których dochodzi do zaburzeń w syntezie niektórych białek enzymatycznych co prowadzi do bloków metabolicznych wynikających z braku lub znaczącego obniżenia aktywności niektórych enzymów. Przykładami są albinizm, fenyloketonuria, alkaptonuria pojawiające się w przemianach aminokwasów fenyloalaniny i tyrozyny.

Zasady dobrej praktyki laboratoryjnej

Dla wiarygodności wyników badań laboratoryjnych kluczowe znaczenie ma właściwe pobranie próby nie tylko pod względem technicznym, ale także specyfiki dla danej jednostki chorobowej, odpowiednie jej oznaczenie i przechowywanie, a także rzetelne wykonanie oznaczeń w laboratorium. Ostatecznym etapem wykorzystania nowoczesnej i obiektywnej diagnostyki laboratoryjnej jest poprawna interpretacja otrzymanego wyniku polegająca na logicznej analizie porównawczej objawów, selekcji jednostek chorobowych oraz właściwym wyborze rozpoznania w oparciu o cały kompleks znanych faktów. Nie wolno zapominać o wpływie stosowanych przez pacjenta leków, z których część może hamować aktywności niektórych enzymów, a także o istniejących schorzeniach towarzyszących komplikujących obraz kliniczny.

Do badań laboratoryjnych mogą być wykorzystane:

Krew pełna - przeważnie pobierana jest do oznaczeń morfologicznych elementów krwi, a także odczynu Biernackiego, parametrów układu krzepnięcia czy gazometrycznych.

Osocze - uzyskuje się po odwirowaniu krwi pełnej pobranej do probówki z antykoagulantem. Różne antykoagulanty mają swój charakterystyczny mechanizm działania prowadzący do zahamowania procesu krzepnięcia (EDTA poprzez wiązanie jonów Ca2+ niezbędnych do aktywacji poszczególnych czynników krzepnięcia, heparyna poprzez hamowanie przekształcania protrombiny w trombinę i trombiny w fibrynogen)

Surowica - uzyskuje się po odwirowaniu krwi pobranej do suchej probówki na tzw „skrzep"

Mocz – w zależności od potrzeb pobiera się albo poranną próbkę albo dokonuję się zbiórki całodobowej. Poddaje się badaniu właściwości fizyczne, jak i skład chemiczny moczu oraz mikroskopowy obraz osadu

Płyny przesiękowe – przedostają się do jam ciała z łożyska naczyniowego przez jego nie uszkodzoną ścianę wskutek wzmożonego ciśnienia hydrostatycznego lub obniżonego ciśnienia onkotycznego. Pobiera się poprzez nakłucie jam opłucnej, osierdziowej oraz otrzewnowej. Poddaje się badaniu właściwości fizycznych płynu oraz morfologicznych i biochemicznych, a także dokonuje się analizy rozmazu z osadu.

Płyny wysiękowe – przedostają się do jam ciała na skutek zmian przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych lub chłonnych. Pobiera się poprzez nakłucie jam opłucnej, osierdziowej oraz otrzewnowej. Poddaje się badaniu właściwości fizycznych płynu oraz morfologicznych i biochemicznych a także dokonuje się analizy rozmazu z osadu.

Płyn mózgowo-rdzeniowy - pobiera się poprzez nakłucie lędźwiowe lub podpotyliczne. Wykonuje się badania cytologiczne, biochemiczne oraz określa się właściwości fizyczne płynu.

Niektóre typowe przyczyny zmian aktywności enzymów we krwi

- zwiększona proliferacja komórek i indukcja enzymów.
- Zmiany w eliminacji enzymu
- zmiana przepuszczalności błon komórkowych. Uwalnianie cytoplazmatycznych enzymów wskaźnikowych
- rozpad komórek w wyniku procesu patologicznego (uwolnienie enzymów wskaźnikowych
- upośledzenie syntezy (spadek aktywności enzymów głównie sekrecyjnych w wyniku zniszczenia tkanki przez proces chorobowy)
- utrudniony odpływ wydzieliny gruczołu zawierającej enzymy sekrecyjne (np. cholestaza)

Znaczenie diagnostyczne oznaczania aktywności enzymów

- enzymy sekrecyjne – wydzielane np. do łożyska naczyniowego, gdzie pełnią swoją biologiczną rolę (cholinesteraza, proteazy układu krzepnięcia i fibrynolizy)
- enzymy ekskrecyjne – wydzielane głównie na zewnątrz np. do światła przewodu pokarmowego (amylaza, lipaza)
- enzymy wskaźnikowe – wewnątrzkomórkowe – uwalniane podczas rozpadu komórek dlatego ich rosnąca aktywność w osoczu może wskazywać na sam fakt przerwania ciągłości błon komórkowych, jak i rodzaj uszkodzonej tkanki i rozległość uszkodzenia (AST, ALT, LDH, CK)

Aminotransferaza alaninowa (ALT)

katalizowana reakcja:

Kwas glutaminowy + kwas pirogronowy $\leftrightarrow$ Kwas α keto glutarowy + alanina

Występuje we wszystkich komórkach ale w niejednakowych ilościach. Opisano kilka izoform enzymu charakterystycznych narządowo. Aktywność mierzona we krwi stanowi wypadkową poszczególnych izoform. Znane są metody identyfikacji poszczególnych izoform, co pozwala na stwierdzenie, której izoformy dotyczy wzrost aktywności a tym samym którego narządu dotyczy proces chorobowy. Najwyższe aktywności występują w wątrobie i kolejno w nerkach, sercu, mięśniach i trzustce. Istotne jest nie tylko jednorazowe stwierdzenie zmian w aktywności, ale także monitorowanie zmian w czasie, co pozwala na prognozowanie postępów w leczeniu.

Wzrost aktywności wskazuje na rozległe uszkodzenia komórek, a nie zaburzenia funkcji narządu. Pojawia się w następujących przypadkach:

- ► nowotwory wątroby, zapalenia trzustki, hemoliza in vitro i in vivo
- ► cholestazy wątrobowe, marskość wątroby, leczenie dużymi dawkami salicylanów
- ► wirusowe zapalenie wątroby, toksyczne uszkodzenia wątroby, niewydolność krążenia

W stanach ostrych wzrost może aktywności być nawet 100 krotny podczas gdy w stanach przewlekłych 4 do 10 krotny. Surowica ze śladami hemolizy daje fałszywie zawyżone wyników. Surowicę można przechowywać do tygodnia w 4^0 C.

Aminotransferaza asparaginianowa (AST)

katalizowana reakcja:

Kwas glutaminowy + kwas szczawiooctowy ↔Kwas α keto glutarowy + kwas asparaginowy

Podobnie jak ALT występuje w kilku izoformach o najwyższej aktywności w mięśniu sercowym i kolejno w wątrobie, mięśniach szkieletowych, nerkach, trzustce i śledzionie.
W diagnostyce laboratoryjnej stosuje się wskaźnik de Ritisa określający stosunek aktywności AST/ALT, który u zdrowych osobników wynosi 2:1. Wskaźnik ten może ulec zmianie w różnych stanach chorobowych co pozwala wnioskować o rodzaju uszkodzeń tkanek.

Wzrost aktywności pojawia się:
- ► marskość wątroby, zapalenia trzustki, hemoliza in vitro i in vivo
- ► choroby mięśni szkieletowych, przewlekłe zapalenie wątroby, zabiegi chirurgiczne, pasożyty, niedobór selenu i witaminy E
- ► zawał mięśnia sercowego, wirusowe zapalenie wątroby, toksyczne uszkodzenie wątroby, nowotwory wątroby, intensywny wysiłek u koni sportowych

Amylaza (AMS)

Zaliczana jest do grupy enzymów ekskrecyjnych wydzielanych do światła przewodu pokarmowego. Hydrolizuje α 1,4-glikany zbudowane z co najmniej 3 reszt glukozy. Najwłaściwszymi substratami są jednak wielocukry należące do α-glikanów jak amylozy, amylopektyny i glikogeny, które są metabolizowane do dekstryn → maltotriozy → maltozy i niewielkich ilości glukozy.
Syntetyzowana głównie w trzustce, a także w śliniankach, wątrobie i mięśniach. Jest oznaczana w diagnozowaniu chorób trzustki.

Wzrost aktywności amylazy we krwi powoduje jej wydalanie z moczem przez nieuszkodzone kłębuszki nerkowe (jest białkiem niskocząsteczkowym) – można monitorować w moczu schorzenia trzustki. W przypadku uszkodzenia nerek wzrost aktywności enzymu w krążeniu może się utrzymywać mimo poprawy stanu trzustki.

Wzrost aktywności wskazuje na:
- ► ostre zapalenie trzustki, niedrożność jelit, kwasicę ketonowa w cukrzycy, niewydolność nerek, hyperadrenokortycyzm, niedrożność gruczołów ślinowych

Spadek aktywności
- ► martwica trzustki, rozległe oparzenia, zatrucia metalami ciężkimi

Lipaza (LP)

Katalizuje rozkład estrów glicerolu i kwasów tłuszczowych. Potwierdza obecność procesu patologicznego w trzustce.

Wzrost aktywności obserwuje się:

- ► ostre zapalenie trzustki, nowotwory trzustki, choroby nerek, niedrożność jelit

Hemoliza w badanej surowicy powoduje zaniżanie wyniku, ponieważ hemoglobina hamuje aktywność lipazy

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH)

katalizuje reakcję:

Kwas mlekowy + NAD ↔ kwas pirogronowy + $NADH_2$

Enzym cytoplazmatyczny występujący we wszystkich komórkach – mózg, erytrocyty, mięsień sercowy, leukocyty, nerki, wątroba, płuca. Składa się z 4 łańcuchów – typu M dla narządów mających mniejsze zapotrzebowanie na tlen i typu H dla narządów o nasilonej przemianie tlenowej. Wyróżnia się 5 izoenzymów tkankowo specyficznych.

Wzrost aktywności obserwuje się:

- ► choroby wątroby, niedokrwistość hemolityczna, białaczka, choroby mięśni szkieletowych, zapalenie płuc, zawał mięśnia sercowego, długotrwały stres

Ślady hemolizy w surowicy powodują uzyskanie fałszywie zawyżonych wyników ze względu na dużą zawartość LDH w erytrocytach.

γ Glutamylotranspeptydaza (GGT)

Jest enzymem związanym z błonami plazmatycznymi. Katalizuje przeniesienie grupy γ-glutamylowej z donora na odpowiedni akceptor. Donorami mogą być glutation lub γ- glutamylowe peptydy a akceptorami glicylo-glicyna, αaminokwasy oraz substraty γ-glutamylowe

γ-glu A + A` → γ-glu A` + A

Występuje w nerkach, wątrobie, komórkach dróg żółciowych, trzustce, jelitach. Należy do enzymów indukowanych – np. przez barbiturany, estrogeny, alkohol. Do oznaczeń używa się surowicy, ponieważ antykoagulanty mogą przeszkadzać w oznaczeniach.

Wzrost aktywności obserwuje się, gdy wystąpią:

- ► cholestazy wewnątrz- i pozawątrobowe, ostre i przewlekłe zapalenia trzustki, ostre zapalenie wątroby, choroba wrzodowa okrężnicy, po leczeniu kortykosterydami u psów

Fosfataza zasadowa (ALP)

Katalizuje hydrolizę monoestrów ortofosforowych:

$R\text{-}O\text{-}PO_3H_2 + H_2O \rightarrow R\text{-}OH + H_3PO_4$

Izoformy stwierdza się w wątrobie, kościach, jelitach, łożysku, nerkach i śledzionie.
Istnieją metody oznaczania aktywności poszczególnych izoform enzymu. Wiadomo, że izoforma jelitowa jest inaktywowana po 10 min w temp 56^0 C, podczas gdy izoforma łożyskowa zachowuje swoją aktywność przez 30 min w 56^0 C. Obydwie frakcje są wrażliwe na działanie inhibicyjne fenyloalaniny.

Podczas rozdziału elektroforetycznego najszybciej wędruje izoforma wątrobowa potem kostna, łożyskowa i jelitowa.

Fizjologiczne wahania enzymu mogą być zależne od wieku, szczególnie dotyczy to izoformy kostnej.

Aktywność izoformy łożyskowej wzrasta nieznacznie w ciąży. Natomiast wzrost znaczący może świadczyć o powikłaniach.

Znane są 4 izoformy fosfatazy zasadowej, które pojawiają się w przebiegu niektórych chorób nowotworowch.

Wzrost aktywności fosfatazy zasadowej wskazuje na następujące choroby:

- ► żółtaczka zastoinowa, wirusowe i toksyczne zapalenie wątroby, marskość wątroby, białaczka szpikowa, nowotwory kości, osteomalacja, krzywica, po leczeniu glikokortykosterydami, hiperadrenokortycyzm u psów, niewielki wzrost w złamaniach kości

Ślady hemolizy w surowicy powodują uzyskanie fałszywie zawyżonych wyników.

Fosfataza kwaśna (ACP)

Enzym lizosomalny – katalizuje podobne reakcje jak fosfataza kwaśna ale w optimum pH 5. Izoformy pochodzą z gruczołu krokowego, wątroby, nerek, erytrocytów, śledziony i osteoklastów. Znaczenie diagnostyczne ma izoforma z gruczołu krokowego.

Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej obserwuje się, gdy wystąpi:

- ► rak prostaty, nowotwory złośliwe kości, hemoliza in vitro i in vivo, zniszczone płytki krwi, pierwotna nadczynność przytarczyc

Ślady hemolizy w surowicy powodują uzyskanie fałszywie zawyżonych wyników.

Kinaza kreatynowa (CK)

Enzym cytoplazmatyczny i mitochondrialny. Najwięcej enzymu jest w mięśniach, mózgu, sercu, jelitach. Istnieją 3 izoenzymy specyficzne tkankowo.

Katalizuje przeniesienie grupy fosforanowej z ATP na kreatynę z wytworzeniem fosfokreatyny i ADP:

Kreatyna + ATP $\leftrightarrow$ fosfokreatyna + ADP

Wzrost aktywności powodowany jest przez:

- ► urazy tkanki mięśniowej, zawał mięśnia sercowego, postępujące zwyrodnienia mięśni, hipotyreoidyzm, zatrucia np. strychniną czy tlenkiem węgla

Spadek aktywności wskazuje na:

- Zmniejszenie masy mięśni, terapia steroidami, hipertyreoidyzm

Do oznaczeń zwykle używa się surowicy, hemoliza nie wpływa na uzyskane wyniki.

Cholinesteraza (pseudocholinesteraza)

Enzymy katalizujące hydrolizę estrów choliny do choliny i odpowiedniego kwasu tłuszczowego. Najważniejsze są:

- ► acetylocholinesteraza (AChE) układu nerwowego i erytrocytów, rozkładająca acetylocholinę
- ► Pseudocholinesteraza (ChE), produkowana w wątrobie i uwalniana do krwioobiegu.

Aktywność obniża się u osób narażonych na stały kontakt z pestycydami, które blokują enzym

Ślady hemolizy w surowicy powodują uzyskanie fałszywie zawyżonych wyników ze względu na dużą zawartość AChE w erytrocytach.

Dehydrogenaza glutaminianowa (GLD)

Enzym mitochondrialny obecny głównie w hepatocytach. Aktywność jest wyższa u mężczyzn, niż kobiet. Należy do „profilu wątrobowego" badań diagnostycznych.

Diagnostyka morfologiczna

Opiera się na analizie jakościowej i ilościowej elementów morfotycznych krwi. W przeszłości była bardzo pracochłonna, polegała na przygotowaniu preparatów mikroskopowych, które były oceniane przez pracowników laboratorium na podstawie liczenia krwinek przy użyciu odpowiednich „stolików" wyposażonych w podziałkę. Obecnie w większości ocenę wykonują automatycznie specjalistyczne analizatory wyposażone w programy umożliwiające rozpoznanie krwinek różnych gatunków zwierząt i rozróżniające ich wielkości.

Bierze się tu pod uwagę nie tylko ilość krwinek czerwonych oraz białych, ale także procentowy profil poszczególnych komórek zaliczanych do kategorii białych krwinek. Analizuje się stężenie hemoglobiny oraz hematokryt odpowiadający stosunkowi osocza do elementów morfotycznych krwi.
Wszystkie te parametry mogą ulegać zmianie w przypadkach wielu jednostek chorobowych, a badania laboratoryjne mogą znacznie ułatwić rozpoznanie.

Diagnostyka biochemiczna

Opisuje stężenia wielu parametrów, których zmiany mogą wskazywać na zaburzenia przemian metabolicznych prowadzących do pojawienia się w konsekwencji objawów klinicznych. Wybór parametru do oznaczenia wiąże się z analizą istniejących objawów klinicznych i podejrzeniem danego schorzenia. Wykonywanie całego profilu biochemicznego jest nie tylko pracochłonne, ale także drogie i często niepotrzebne.

Np. na profil metaboliczny nerkowy może się składać oznaczanie:

- aktywności amylazy i lipazy w osoczu i moczu
- stężenia jonów sodu, potasu oraz mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego i białka całkowitego w surowicy
- oraz ogólne badanie moczu

Profil metaboliczny trzustki może uwzględniać:

- Oznaczanie aktywności amylazy i lipazy trzustkowej w osoczu i moczu
- Oznaczanie zawartości tłuszczu w kale
- Oznaczanie stężenia bilirubiny, cholesterolu oraz aktywności fosfatazy alkalicznej i γGGT
- Oznaczanie stężenia glukozy (ocena wewnątrzwydzielniczej czynności trzustki)

Profil metaboliczny wątroby:

- Ocena sprawności metabolizmu i wydalania – oznaczanie stężenia bilirubiny, kwasów żółciowych, albuminy oraz próby z użyciem egzogennych barwników (bromosulfoftaleina, zieleń indocyjaninowa)
- Ocena cholestazy – oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej, γGGT oraz 5`nukleotydazy
- Ocena integralności komórek – oznaczanie aktywności aminotransferaz

Dodatkowo istnieją indywidualne profile biochemiczne w poszczególnych jednostkach chorobowych, które oznacza się wielokrotnie w różnych odstępach czasowych w celu monitorowania rozwoju choroby czy przebiegu leczenia.