

Gdański Uniwersytet Medyczny

**DIAGNOSTYKA
LABORATORYJNA**

TOM I

**pod redakcją
Andrzeja Szutowicza i Anny Raszei-Specht**

Gdańsk 2009

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Recenzent
prof. dr hab. Wiesława Łysiak-Szydłowska

© Copyright by Medical University of Gdańsk
ISBN 978 83 602535 7 1

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Zlecenie KW/224/09

SPIS TREŚCI

1. ZASADY WSPÓŁPRACY LEKARZA Z LABORATORIUM ORAZ ANALITYCZNE PODSTAWY INTERPRETACJI WYNIKÓW BADAŃ LABORATORYJNYCH.....	10
1.1. Zasady współpracy lekarza z laboratorium.....	10
1.2. Krew jako materiał analityczny.....	13
1.3. Mocz jako materiał analityczny	14
1.4. Badania innych materiałów analitycznych.....	16
1.4.1. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego.....	16
1.4.2. Badanie kału.....	16
1.4.3. Badanie płynów z jam ciała	16
1.4.4. Badanie płynu owodniowego.....	16
1.5. Błąd przedlaboratoryjny	17
1.6. Interpretacja wyników badań laboratoryjnych	18
1.6.1. Wartości referencyjne	18
1.6.2. Wpływ czynników biologicznych na wartości referencyjne.....	20
1.7. Charakterystyka błędów analitycznych.....	20
1.7.1. Błąd przypadkowy analizy i precyzja	20
1.7.2. Błąd systematyczny, dokładność metody	22
1.7.3. Błąd dopuszczalny	23
1.8. Wiarygodność wyniku.....	24
1.9. Kontrola jakości badań laboratoryjnych.....	24
1.10. Charakterystyka wartości diagnostycznej badań.....	25
1.11. Zasady dobrej współpracy z laboratorium	27
2. BADANIA IMMUNOHEMATOLOGICZNE W TRANSFUZJOLOGII ...	28
2.1. Regulacje prawne dotyczące leczenia krwią	28
2.2. Metody stosowane w badaniach immunohematologicznych	29
2.3. Pobieranie krwi do badań serologicznych.....	29
2.4. Antygeny krwinek czerwonych.....	30
2.5. Przeciwciała grupowe krwi	31
2.6. Testy serologiczne.....	33
2.6.1. Test enzymatyczny LEN	33
2.6.2. Pośredni test antyglobulinowy PTA.....	33
2.6.3. Bezpośredni test antyglobulinowy BTA	35
2.7. Układ grupowy ABO	35
2.8. Układ grupowy Rh	36
2.9. Próba serologicznej zgodności biorecy i dawcy przed przetoczeniem (próba krzyżowa).....	37
2.9.1. Zasady stanowiące serologiczną podstawę krwiolecznictwa.....	37
2.9.2. Właściwa próba zgodności serologicznej	38
2.10. Konflikt serologiczny	39
2.11. Składniki krwi i produkty krwiopochodne	39
2.12. Powikłania poprzetoczeniowe	40

2.13. Ćwiczenia praktyczne	41
2.13.1. Ćwiczenie 1.....	41
2.13.2. Ćwiczenie 2.....	45
3. ENZYMATYCZNE I BIAŁKOWE MARKERY PATOLOGII NARZĄDOWYCH	50
3.1. Nazewnictwo enzymów	50
3.2. Izoenzymy i izoformy enzymów	51
3.3. Pochodzenie enzymów osocza	53
3.4. Aktywność enzymu	55
3.4.1. Optymalizacja i standaryzacja pomiarów aktywności enzymatycznych	55
3.4.2. Wartości referencyjne	56
3.5. Ograniczenia wykorzystania oznaczeń enzymatycznych.....	56
3.6. Stany chorobowe powodujące zmiany aktywności wybranych enzymów w surowicy	58
3.6.1. Fosfataza alkaliczna (zasadowa).....	59
3.6.2. Fosfataza kwaśna	60
3.6.3. Aminotransferazy	61
3.6.4. Gamma-glutamylotransferaza	62
3.6.5. Dehydrogenaza mleczanowa.....	62
3.6.6. Kinaza kreatynowa.....	63
3.6.7. Amylaza	65
3.6.8. Lipaza.....	66
3.6.9. Cholinesteraza	67
3.7. Enzymy i białka jako markery wybranych patologii narządowych	69
3.7.1. Zawał mięśnia sercowego	69
3.7.2. Choroby wątroby.....	73
3.7.3. Choroby trzustki.....	76
4. DIAGNOSTYKA ZABURZEŃ METABOLIZMU LIPOPROTEIN OSOCZA	78
4.1. Lipidy i lipoproteiny.....	78
4.1.1. Frakcje lipoproteinowe	78
4.1.2. Apolipoproteiny	81
4.1.3. Enzymy i białka transportowe biorące udział w osoczymym metabolizmie lipoprotein	82
4.1.4. Receptory lipoprotein.....	83
4.2. Metabolizm lipoprotein	84
4.2.1. Metabolizm chylomikronów	84
4.2.2. Metabolizm VLDL i ID oraz powstawanie LDL	85
4.2.3. Katabolizm LDL. Równowaga cholesterolowa w komórce	86
4.2.4. Metabolizm HDL	87
4.2.5. Równowaga cholesterolowa ustroju	88
4.3. Lipidy a miażdżycą	89

4.3.1.	Rola LDL i makrofagów w powstawaniu ogniska miażdżycowego.....	89
4.3.2.	Lipidowe czynniki ryzyka miażdżycy	91
4.3.3.	Inne czynniki ryzyka choroby wieńcowej.....	93
4.3.4.	Docelowe stężenia LDL-CH w grupach ryzyka	94
4.4.	Badania laboratoryjne w diagnostyce zaburzeń metabolizmu lipoprotein	94
4.4.1.	Stężenie cholesterolu we frakcjach LDL i HDL	95
4.4.2.	Stężenie triacylogliceroli we krwi.....	95
4.4.3.	Stężenia apolipoprotein.....	96
4.5.	Klasyfikacja hiperlipidemii	96
4.5.1.	HLP typ I (hiperchylomikronemia na czczo).....	96
4.5.2.	HLP typ II a	98
4.5.3.	HLP typ II b (złożona hiperlipoproteinemia).....	98
4.5.4.	HLP typ III (dysbetalipoproteinemia).....	98
4.5.5.	HLP typ IV (hipertriglicerydemia endogenna)	99
4.5.6.	Hiperlipoproteinemia typ V	99
4.5.7.	Hiperlipidemie wtórne	99
4.6.	Hipolipoproteinemia.....	100
4.6.1.	Abetalipoproteinemia (zespół Bassena-Kornzweiga)	100
4.6.2.	Rodzinna hipobetalipoproteinemia	100
4.6.3.	Hipolipoproteinemia wtórne	101
5.	PATOMECHANIZMY I DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ RÓWNOWAGI KWASOWO-ZASADOWEJ	102
5.1.	Układy buforowe organizmu.....	104
5.1.1.	Pojemność buforowa.....	104
5.1.2.	Bufor wodorowęglanowy.....	104
5.1.3.	Zasady buforowe krwi	108
5.1.4.	Zasady buforowe płynu śródmiąższowego	109
5.1.5.	Zasady buforowe przestrzeni wewnątrzkomórkowej.....	110
5.2.	Działanie buforów w organizmie	110
5.2.1.	Buforowanie kwasów nietlotnych.....	110
5.2.2.	Buforowanie CO ₂	112
5.2.3.	Buforowanie komórkowe.....	112
5.3.	Regulacja gospodarki kwasowo-zasadowej	114
5.3.1.	Regulacja wydalania CO ₂	114
5.3.2.	Regulacja gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju przez nerki	114
5.4.	Laboratoryjna ocena zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej.....	116
5.4.1.	Ogólne zasady pobierania krwi do badania RKZ	117
5.4.2.	Błędy przy oznaczaniu parametrów RKZ.....	117
5.4.3.	Wartości referencyjne dla parametrów RKZ krwi	118
5.4.4.	Zasady interpretacji wyników badania RKZ.....	118

5.5. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń równowagi kwasowo- zasadowej	119
5.5.1. Etap I: ocena pH krwi	119
5.5.2. Etap II: określenie pierwotnej przyczyny zaburzenia	120
5.5.3. Etap III : ocena kompensacji zaburzeń metabolicznych	120
5.5.4. Etap III: ocena kompensacji zaburzeń oddechowych	121
5.5.5. Całkowita kompensacja zaburzeń gospodarki kwasowo- zasadowej	124
5.6. Przykłady zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej	125
5.6.1. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń mieszanych	125
5.7. Regulacja prężności tlenu we krwi	126
5.7.1. Przyczyny hipoksji i zahamowania dostarczania tlenu do tkanek	128
6. GOSPODARKA WODNO-ELEKTROLITOWA	129
6.1. Zawartość i dystrybucja wody w ustroju	129
6.1.1. Zawartość elektrolitów w przestrzeniach wodnych	130
6.2. Luka anionowa	131
6.2.1. Osmolalność	133
6.2.2. Metody oceny osmolalności płynów ustrojowych	133
6.2.3. Ciśnienie onkotyczne	134
6.3. Bilans wody i elektrolitów	135
6.3.1. Pragnienie i hormon antydiuretyczny	136
6.3.2. Regulacja gospodarki sodowej. Układ renina-angiotensyna- aldosteron	138
6.3.3. Peptydy natriuretyczne	139
6.3.4. Regulacja gospodarki potasowej	140
6.4. Zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej	141
6.4.1. Drogi utraty wody i elektrolitów	141
6.4.2. Odwodnienia i przewodnienia	142
6.4.3. Przewodnienie hipotoniczne	142
6.4.4. Przewodnienie izotoniczne	144
6.4.5. Przewodnienie hipertoniczne	145
6.4.6. Odwodnienie hipertoniczne	145
6.4.7. Odwodnienie hipotoniczne	146
6.4.8. Pseudohiponatremia/hipoosmia rzekoma	147
6.4.9. Odwodnienie izotoniczne	148
6.5. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń gospodarki wodno- elektrolitowej	149
6.6. Zaburzenia gospodarki potasowej	151
6.6.1. Hiperkalemia	151
6.6.2. Hipokalemia	152
6.6.3. Hiperkalemia rzekoma	152
6.7. Hormonalne podłoże zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej	153

6.7.1.	Wartości referencyjne hormonów regulujących gospodarkę wodno-elektrolitową	153
6.7.2.	Hiperaldosteronizm	153
6.7.3.	Hipoaldosteronizm	154
6.7.4.	Zespół nieodpowiedniego wydzielania ADH (SIADH)	155
6.7.5.	Moczówka prosta (diabetes insipidus)	155
7.	DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ GOSPODARKI WAPNIOWO-FOSFORANOWO-MAGNEZOWEJ	156
7.1.	Wapń w organizmie. Bilans wapnia	156
7.2.	Hormonalna regulacja stężenia wapnia	157
7.2.1.	Regulacja sekrecji PTH	157
7.2.2.	Efekty biologiczne działania PTH	159
7.2.3.	Rola witaminy D ₃ w homeostazie wapnia	160
7.2.4.	Kalcitonina	161
7.3.	Podstawowe badania laboratoryjne stosowane w diagnostyce zaburzeń gospodarki wapniowej.	161
7.3.1.	Wapń całkowity	162
7.3.2.	Wapń zjonizowany	163
7.3.3.	PTH	163
7.4.	Hiperkalcemia	164
7.4.1.	Hiperkalcemia nowotworowa	165
7.4.2.	Pierwotna nadczynność przytarczyc (PNP)	165
7.4.3.	Diagnostyka różnicowa hiperkalcemii	166
7.5.	Hipokalcemia	167
7.5.1.	Wtórna nadczynność przytarczyc	168
7.6.	Fosfor w organizmie	169
7.7.	Pomiary stężenia fosforanów	171
7.8.	Hipofosfatemia	171
7.9.	Hiperfosfatemia	172
7.10.	Magnez w organizmie	173
7.11.	Pomiary stężenia magnezu	174
7.12.	Hipomagnezemia	174
7.13.	Hipermagnezemia	175
8.	PODSTAWY LABORATORYJNEJ DIAGNOSTYKI HEMATOLOGICZNEJ	176
8.1.	Hematopoeza	176
8.2.	Krew obwodowa	179
8.3.	Układ czerwonych krwinek	179
8.3.1.	Badanie podstawowych parametrów układu czerwonych krwinek	181
8.3.2.	Badania uzupełniające w zaburzeniach układu czerwonych krwinek	185
8.4.	Układ białych krwinek	185
8.4.1.	Badanie ilościowe komórek układu białych krwinek	186

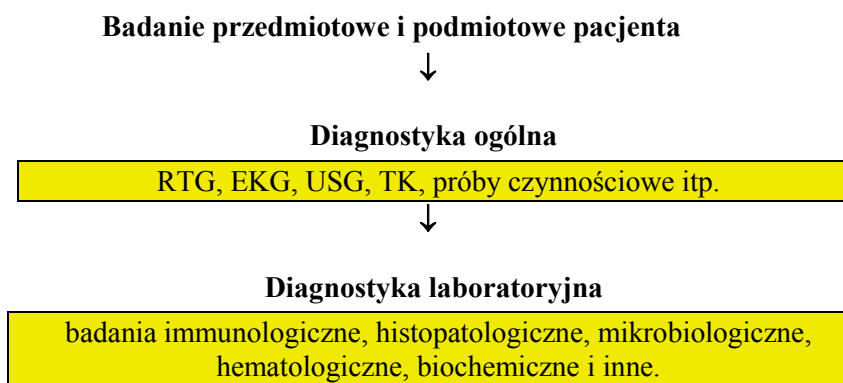
8.4.2.	Badanie morfologiczne (jakościowe) - rozmaz krwi obwodowej (wzór Schillinga), leukogram	186
8.4.3.	Określenia stosowane przy ocenie zaburzeń układu białokrwinkowego.....	187
8.4.4.	Specjalistyczna diagnostyka zaburzeń układu białokrwinkowego.....	190
9.	DIAGNOSTYKA ZABURZEŃ KRZEPNIĘCIA.....	192
9.1.	Badania laboratoryjne zaburzeń krzepnięcia.....	194
9.1.1.	Zasady pobierania krwi do badań układu krzepnięcia	194
9.1.2.	Metody pomiarowe stosowane w badaniach układu krzepnięcia	194
9.2.	Podstawy diagnostyki skłonności do krwawień.....	195
9.2.1.	Czas krwawienia	195
9.2.2.	Badanie funkcji naczyń	196
9.2.3.	Badania ilościowe i czynnościowe płytek.....	197
9.2.4.	Badania oceniające wewnątrzpochodną, zewnątrzpochodną i wspólną drogę kaskady krzepnięcia.....	199
9.2.5.	Podstawowe badania układu fibrynolitycznego	204
9.2.6.	Podstawowe badania układu antykoagulacyjnego	205
9.3.	Diagnostyka najczęstszych skaz krwotocznych	206
9.3.1.	Diagnostyka zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC)	206
9.3.2.	Diagnostyka choroby von Willebranda.....	206
9.4.	Diagnostyka laboratoryjna trombofilii	207
10.	PODSTAWY DIAGNOSTYKI ENDOKRYNOLOGICZNEJ.....	211
10.1.	Mechanizmy homeostazy ustrojowej	211
10.2.	Współdziałanie układu nerwowego i układu hormonalnego.....	213
10.2.1.	Hormony podwzgórza i przedniego płata przysadki.....	213
10.2.2.	Hormony tylnego płata przysadki (część neurohormonalna)... ..	215
10.3.	Diagnostyka laboratoryjna wybranych zaburzeń endokrynologicznych	217
10.3.1.	Diagnostyka laboratoryjna chorób układu podwzgórzowo-przysadkowo-tarczycowego	218
10.3.2.	Diagnostyka laboratoryjna chorób układu podwórzowo-przysadkowo-nadnerczowego	223
10.3.3.	Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń hormonu wzrostu (GH) ..	230
10.3.4.	Diagnostyka zaburzeń prolaktyny.....	232
11.	ZABURZENIA METABOLIZMU GLUKOZY. CUKRZYCA	233
11.1.	Definicja cukrzycy	233
11.2.	Epidemiologia	233
11.3.	Mechanizmy homeostazy glukozy i jej zaburzenia	233
11.4.	Etiologiczna klasyfikacja cukrzycy	235
11.5.	Diagnostyka laboratoryjna cukrzycy.....	235
11.5.1.	Doustny test tolerancji glukozy.....	238

11.5.2. Badania przesiewowe w kierunku cukrzycy	238
11.5.3. Cukrzyca typu 1	239
11.5.4. Cukrzyca typu 2	241
11.5.5. Cukrzyca ciążowa	242
11.5.6. Monitorowanie leczenia cukrzycy	243
11.5.7. Ostre powikłania cukrzycy.....	246
11.5.8. Przewlekłe powikłania cukrzycy.....	249
11.5.9. Zespół polimetaboliczny.	250
11.6. Hipoglikemia u osób z cukrzycą	251
11.6.1. Neuroglikopenia.....	251
12. HIPOGLIKEMIA	253
12.1. Mechanizmy hipoglikemii.....	253
12.2. Klasyfikacja stanów hipoglikemii	254
12.3. Diagnostyka laboratoryjna hipoglikemii	255
12.3.1. Hipoglikemie w pediatrii	256
12.3.2. Hipoglikemia nowotworowa.....	257
12.3.3. Hipoglikemia alkoholowa	257
12.3.4. Inne przypadki hipoglikemii	257
13. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA	258
13.1. Podstawowe metody analizy kwasów nukleinowych.....	258
13.1.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).....	258
13.1.2. PCR w czasie rzeczywistym	260
13.1.3. Sekwencjonowanie DNA	262
13.1.4. Mapowanie restrykcyjne	265
13.1.5. Hybrydyzacja metodą Southerna	265
13.2. Techniki stosowane w badaniach przesiewowych	266
13.2.1. Mikromacierze DNA.....	267
13.3. Postępowanie z materiałem do badań molekularnych.....	269
13.4. Wybrane zastosowania diagnostyki molekularnej w medycynie	270

1. ZASADY WSPÓŁPRACY LEKARZA Z LABORATORIUM ORAZ ANALITYCZNE PODSTAWY INTERPRETACJI WYNIKÓW BADAŃ LABORATORYJNYCH

Anna Raszeja-Specht, Hanna Bielarczyk

Badania laboratoryjne są istotnym, integralnym elementem wszystkich dziedzin medycyny (ryc.1.1). Wyniki badań laboratoryjnych wykorzystywane są w badaniach przesiewowych, przy potwierdzeniu rozpoznania choroby oraz w czasie monitorowania leczenia (tab.1.1), a także w badaniach naukowych oraz próbach klinicznych podczas wprowadzania nowych leków.

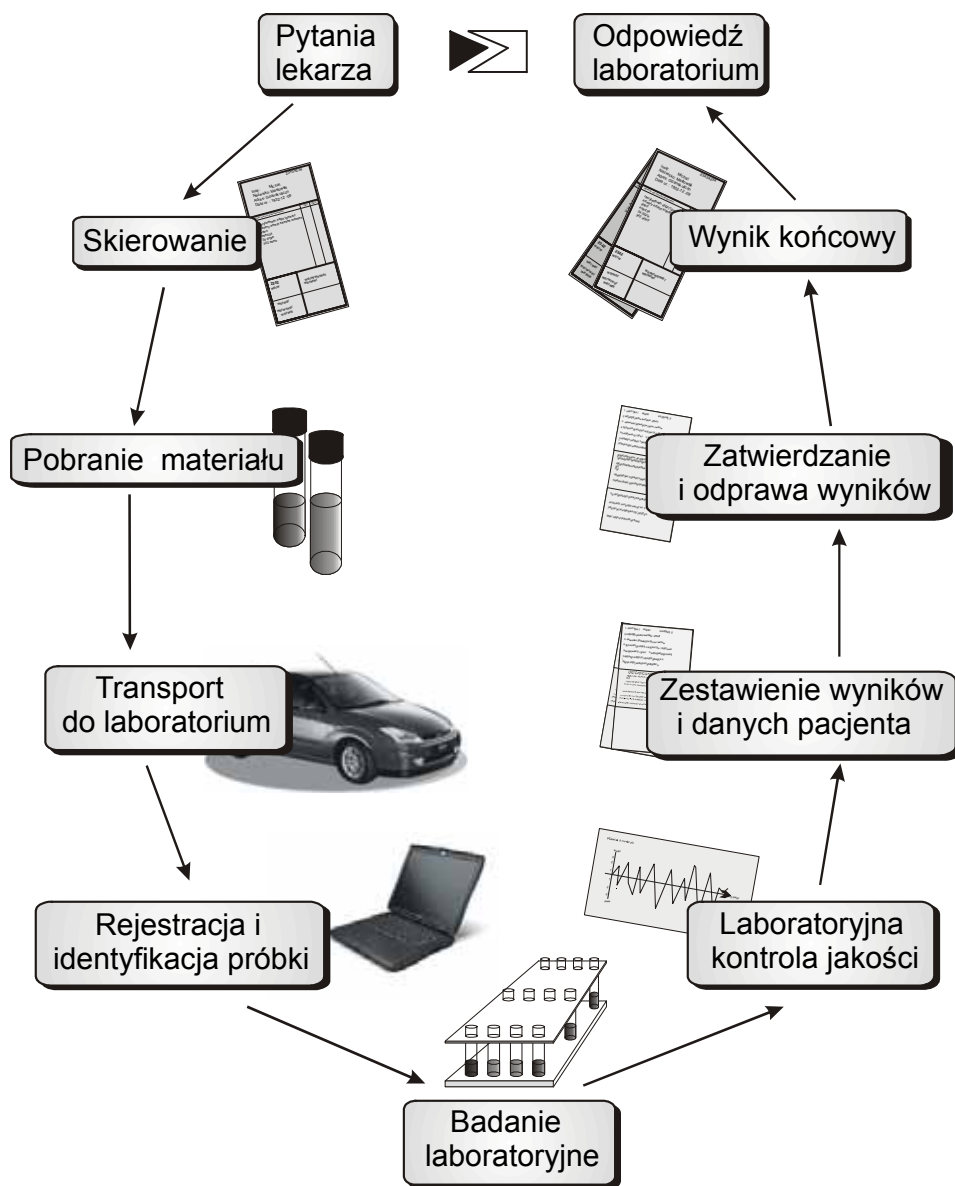


Ryc. 1.1. Miejsce laboratorium analitycznego w diagnostyce i opiece medycznej

Podstawowe badania biochemiczne i hematologiczne wykonywane są we wszystkich laboratoriach medycznych, natomiast profil badań dodatkowych zależy od wielkości laboratorium, jego wyposażenia i oczekiwań współpracujących jednostek służby zdrowia.

1.1. Zasady współpracy lekarza z laboratorium

Zlecenie każdego badania laboratoryjnego powinno zostać poprzedzone dobrze zdefiniowanym pytaniem lekarza prowadzącego danego pacjenta, postawionym po przeprowadzeniu badania przedmiotowego i podmiotowego. Lekarz na podstawie starannie zebranego wywiadu i wyniku badania fizykalnego decyduje o wyborze badań laboratoryjnych i kieruje pacjenta do określonego rodzaju laboratorium.



Ryc. 1.2. Uproszczony schemat postępowania z materiałem biologicznym w laboratorium klinicznym

Istotnym elementem badań laboratoryjnych jest prawidłowe postępowanie z materiałem badanym w fazie przedlaboratoryjnej. Laboratorium powinno otrzymać określony materiał biologiczny, odpowiednio pobrany, opisany i transportowany. Do każdego materiału przesłanego do laboratorium powinno być dołączone skierowanie, zawierające oprócz danych personalnych pacjenta i rodzaju zlecanych badań taką ilość informacji dotyczących rozpoznania i rodza-

ju leczenia, która umożliwi właściwą interpretację wyniku w laboratorium. Wśród informacji powinny znaleźć się informacje dotyczące czasu pobrania, stosowanych leków, płynów infuzyjnych lub specjalnych ograniczeń dietetycznych.

Materiałem biologicznym, w którym najczęściej wykonywane są badania laboratoryjne jest krew żylna, tętnicza lub włosniczkowa oraz mocz, rzadziej płyn mózgowo-rdzeniowy, kał, ślina, kamienie moczowe lub żółciowe, wycinki tkankowe, komórki, oraz płyny – punktat szpiku kostnego, opłucnej, otrzewnej, stawów, cyst itp.

Tabela 1.1. Najczęstsze przyczyny zlecenia badań laboratoryjnych

Przyczyna	Przykład
Badania przesiewowe – w celu wykrycia określonej choroby w wybranej populacji ludzi	• Okresowe badania kontrolne pracowników • Badania noworodków w kierunku mukowiscydozy, fenyloketonurii i niedoczynności tarczycy. • Badania przeciwciał anti-HIV, anti-HCV i anti-HBs - przed przyjęciem do szpitala.
Rozpoznanie choroby	Potwierdzenie lub wykluczenie choroby, na którą wskazuje badanie kliniczne
Określenie stopnia uszkodzenia narządów	Badania biochemiczne funkcji wątroby, nerek - w stanach zapalnych, zatruciach itp.
Ocena i monitorowanie przebiegu choroby	• W chorobach przewlekłych - immunologiczne markery uszkodzenia wątroby w wirusowym zapaleniu wątroby, mikroalbuminuria w cukrzycy, białko C-reaktywne (CRP) itp. • Badania tzw. hemostatycznych i lipidowych czynników ryzyka, w celu określenia ryzyka miażdżycy. • Pomiar kreatyniny u dializowanych pacjentów.
Ocena skuteczności leczenia	Poziom glukozy i HbA _{1c} w cukrzycy. Poziom cholesterolu i triglicerydów w leczeniu hiperlipidemii.
Monitorowanie stężenia leków podczas terapii	Ustalenie poziomu terapeutycznego leków przeciwpadaczkowych, dawki, zakresu stężeń terapeutycznych. Leczenie białaczek cytostatykami, podawanie leków immunosupresyjnych po przeszczepach.
Inne	Powtórne zlecenie badań, badania naukowe, zaspokajanie ciekawości lekarza itp.

Lekarz współpracujący z laboratorium powinien zapoznać się z jego działalnością poprzez korzystanie z informatora (katalogu) opracowanego przez laboratorium, dostępnego w formie drukowanej lub elektronicznej. Katalog badań powinien zawierać spis badań wykonywanych w danym laboratorium, zakresy

wartości referencyjnych oraz określać sposób pobierania materiału. Wskazane jest zapoznanie się z cennikiem badań.

Prawidłowy sposób komunikowania się z laboratorium polega na:

- Właściwym i szczegółowym wypełnieniu formularza skierowania, zgodnie z zaleceniami laboratorium;
- Pobraniu i przesyłaniu materiału do laboratorium zgodnie z zaleceniem;
- Bezpośrednim zgłaszaniu personelowi laboratorium wszelkich wątpliwości i spraw spornych, w formie ustnej lub pisemnej.

1.2. Krew jako materiał analityczny

Materiałem analitycznym może być tzw. krew „pełna” czyli zawierająca wszystkie składniki płynne i morfotyczne, a także surowica lub osocze. W zależności od rodzaju wykonywanych analiz krew pobierana może być do suchych, czystych probówek (umożliwiających powstanie skrzepu i oddzielenie surowicy) lub do probówek zawierających określony środek przyspieszający lub hamujący wykrzepianie (tab. 1.2 i 1.3). Zastosowanie antykoagulantów zapobiega wykrzepianiu i umożliwia wykonanie badań w pełnej krwi lub w osoczu po odwirowaniu krwi w określonym czasie i warunkach (temperatura, ilość obrotów itp.). Oddzielenie osocza i surowicy powinno nastąpić w czasie nie dłuższym niż 1 godz. od pobrania. Pozwala to na bezpośrednie wykonanie badania i/lub przechowywanie materiału do badań w stanie zamrożonym, o ile jest to konieczne.

Tabela 1.2. Rodzaje środków przeciwkrzepliwych stosowane w laboratorium

Rodzaj antykoagulantu	Działanie	Najczęstsze zastosowanie w laboratorium
Heparyna (10-25 j./ mL) – sole sodowe, amonowe, litowe	neutralizuje trombinę i tromboplastynę	badania hormonalne, RKZ
EDTA-K ₂ (K ₃) - 1,7 mg/ mL krwi	wiąże Ca ²⁺ - nierozpuszczalny kompleks	morfologia krwi obwodowej, OB
Cytrynian sodu - 3,8% lub 3,2%	wiąże Ca ²⁺ - rozpuszczalny kompleks	badania układu krzepnięcia, OB
Fluorek sodu (lub jodoocetan) /szczawian, EDTA-K ₂	hamuje enzymy glikolityczne i wiąże Ca ²⁺	oznaczanie glukozy
CTAD (cytrynian, teofilina, adenozyina, dipirydamol)	wiąże Ca ²⁺ - rozpuszczalny kompleks, dodatkowo hamuje uwalnianie heparyny przez płytki	specjalistyczne badania układu krzepnięcia

Do badań biochemicznych stosowane są najczęściej surowica lub osocze, rzadziej pełna krew, do badań hematologicznych – pełna krew, do badań serologicznych – surowica i pełna krew, do badań koagulologicznych – osocze krwi pobieranej do probówek zawierających roztwór cytrynianu (w stosunku 9 obj. krwi + 1 obj. cytrynianu), do badań OB - krew pełna pobierana do probówek zawierających roztwór cytrynianu (w stosunku 4 obj. krwi + 1 obj. cytrynianu) lub EDTA-K₂.

Transport materiału do laboratorium może odbywać się za pomocą poczty pneumatycznej lub kuriera. W przypadku niektórych badań (badania gazometryczne – pH, pCO₂, pO₂, oznaczanie amoniaku, niektórych enzymów i hormonów) powinien trwać jak najkrócej i odbywać się w temperaturze 4°C od pobrania do momentu rozpoczęcia wykonania badania. Krew pobrana na oznaczenia bilirubiny i karotenu powinna być chroniona przed światłem ze względu na fotodegradację związków. Jeżeli próbki krwi lub innego materiału biologicznego transportowane są do odległego laboratorium (transport samochodowy, lotniczy) należy odpowiednio zabezpieczyć i oznakować przesyłkę. Szybki transport i krótki czas przechowywania materiału zwiększają wiarygodność wyniku badania laboratoryjnego.

Tabela 1.3. Inne środki stosowane przy pobieraniu krwi w laboratorium

Rodzaj środka	Działanie	Najczęstsze zastosowanie w laboratorium
Trombina	przyspiesza wykrzepianie, stymulując kaskadę krzepnięcia	oznaczenia biochemiczne - pacjenci leczeni heparyną, dializowani itp.
Żel separacyjny	stosowany przy pobieraniu krwi „na skrzep”, ułatwia rozdzielenie krwinek od surowicy	oznaczenia biochemiczne

1.3. Mocz jako materiał analityczny

Najczęściej stosowany jest mocz z tzw. zbiórki porannej, który jako najbardziej zagęszczony najlepiej nadaje się do mikroskopowego badania osadu moczu i wykrywania patologicznych składników (białko, glukoza). Inne rodzaje zbiórki moczu (zbiórka jednorazowa, zbiórka dobową lub 12-godzinna) wymagają dokładnego przestrzegania instrukcji dotyczącej przygotowania do badania, rodzaju używanych pojemników, czasu i sposobu przechowywania (lodówka - temperatura 4°C, ewentualne zastosowanie środków konserwujących – HCl, tymol, kwas borny). Mocz ze zbiórki „dobowej” powinien być dostarczony do laboratorium w całości. W przeciwnym przypadku, przed odlaniem części moczu należy zmierzyć jego objętość i starannie wymieszać.

Badanie ogólne moczu ma przeważnie na celu badanie przesiewowe w kierunku chorób nerek i dróg moczowych i obejmuje jego ocenę makroskopową, badanie biochemiczne oraz mikroskopową ocenę tzw. osadu moczu.

Badanie ogólne moczu, pochodzącego ze zbiórki porannej, obejmuje ocenę własności fizycznych (przejrzystość, barwa, woń) i oznaczanie prostymi testami paskowymi pH, ciężaru właściwego oraz obecności najczęściej występujących składników patologicznych – glukozy, białka, bilirubiny, urobilinogenu, związków ketonowych, azotynów oraz erytrocytów i leukocytów. Dodatkowo, po odwirowaniu oceniany jest mikroskopowo skład osadu moczu – obecność elementów morfotycznych (erytrocyty, leukocyty, inne komórki) i kryształów nieorganicznych (tab.1.4). Testy paskowe zalecane są w badaniach przesiewowych, a mikroskopowe badanie osadu wykonywane jest u pacjentów z objawami klinicznymi oraz w przypadku dodatniego wyniku testu paskowego.

Tabela 1.4. Badanie ogólne moczu

	Mocz prawidłowy	Przykładowe zmiany patologiczne
Barwa	słomkowożółta	czerwona-krwimocz brunatna-obecność bilirubin żółta- obecność witaminy B czarna - alkaptonuria
Przejrzystość	klarowny, lekko opalizujący	mętny-obecność bakterii, leukocytów, drożdży
Odczyn pH	około 6.0 (4.5 – 8.0)	zależny od diety (jarska - mięsna), leków, zaburzeń RKZ, chorób nerek, zaburzeń endokrynologicznych itp.
Ciężar właściwy	1005 – 1030 g/L	wahania dobowe obecność składników patologicznych (białko, glukoza) choroby nerek
Białko (proteinuria)	nie stwierdza się	obecne - choroby nerek, szpiczak mnogi itp.
Glukoza (glukozuria)	nie stwierdza się	obecna - cukrzyca, uszkodzenia kanalików nerkowych
Związki ketonowe	nie stwierdza się	obecne - głodzenie, cukrzyca, wysiłek, gorączka itp.
Bilirubina	nie stwierdza się	obecna - choroby wątroby
Urobilinogen	obecny	podwyższony - choroby wątroby, żółtaczka hemolityczna
Azotyny	nie stwierdza się	obecne - zakażenie dróg moczowych
Osad moczu – badanie mikroskopowe	erytrocyty (0-2), leukocyty (0-5), pojedyncze nabłonki, bezpостaciowy osad mineralny	zwiększona ilość erytrocytów i leukocytów obecność bakterii wałeczki szkliste, ziarniste, komórkowe, tłuszczowe, w chorobach nerek i dróg moczowych

1.4. Badania innych materiałów analitycznych

Techniki pobierania niektórych materiałów biologicznych są inwazyjne, i dlatego wymagają odpowiedniego przeszkolenia lekarzy i personelu pomocniczego. Ze względu na trudności związane z pobraniem płynów z jam ciała szczególnie ważne jest odpowiednie zabezpieczenie materiału przed wykonaniem badań biochemicznych. Spektrum badań wykonywanych w powyższych materiałach jest węższe niż we krwi czy moczu i obejmuje jedynie wybrane badania potwierdzające lub wykluczające rozpoznanie kliniczne.

1.4.1. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego

Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego wykonywane jest w przypadku podejrzenia zapalenia opon mózgowych, krwawień do OUN, chorób neurodegeneracyjnych o różnym podłożu, chorób nowotworowych. Obejmuje ono badania biochemiczne, serologiczne, mikrobiologiczne i cytologiczne. Prawidłowa interpretacja wyników badań płynu mózgowo-rdzeniowego wymaga równoczesnej analizy porównawczej tych samych parametrów oznaczonych we krwi.

1.4.2. Badanie kału

Badanie kału obejmuje badania na obecność krwi utajonej, pasożytów, niestrawionych włókien mięsnych i tłuszczów.

1.4.3. Badanie płynów z jam ciała

W celu oceny rodzaju płynów gromadzących się w jamach ciała zleca się oznaczanie białka całkowitego, albuminy, cholesterolu, niektórych enzymów (np. dehydrogenazy mleczanowej), liczby komórek i ich różnicowania (w tym obecności komórek nowotworowych) oraz wykonanie badań bakteriologicznych. W przypadku, gdy konieczne jest zastosowanie antykoagulantów lub konserwantów, należy zastosować procedury jak przy pobieraniu krwi (np. EDTA przy badaniu elementów morfotycznych, heparynę przy oznaczaniu pH itp.). Większość badań powinna zostać wykonana w ciągu 2-ch godzin od pobrania materiału, w tym czasie powinna zostać zamrożona część materiału do dalszych badań oraz sporządzone i utrwalone preparaty do badań cytologicznych.

1.4.4. Badanie płynu owodniowego

Uzyskiwany w wyniku amniocentezy, służy do diagnostyki chorób wrodzonych i wykrywania wad rozwojowych płodu. Najczęściej przeprowadzane są badania aktywności/poziomu acetylocholinesterazy/pseudocholinesterazy i białka płodowego alfa (uszkodzenia cewy układu nerwowego), bilirubiny (konflikt układu Rh) oraz niektórych hormonów.

1.5. Błąd przedlaboratoryjny

Zmienność przedanalityczną czyli tzw. błąd przedlaboratoryjny można zdefiniować jako zmianę stężenia/aktywności badanej substancji w materiale biologicznym, spowodowaną niewłaściwym przygotowaniem pacjenta do badania lub niestandardowym postępowaniem z badanym materiałem przed rozpoczęciem procedur analitycznych.

Źródłem błędów mogą być: niewłaściwe pobranie materiału (np. do nieodpowiednich próbek), błędne oznakowanie próbek, niewłaściwy transport i przechowywanie materiału, zbyt późne oddzielenie surowicy lub osocza od elementów morfotycznych, niewłaściwe warunki wirowania, niewłaściwe zabezpieczenie próbek (np. parowanie próbek w niezamkniętych próbkówkach itp.).

Lekarz pierwszego kontaktu powinien poinformować pacjenta, że zarówno niewłaściwa dieta (głodzenie lub spożycie posiłku bezpośrednio przed badaniem) jak i stosowane leki mają istotny wpływ na wynik badań laboratoryjnych. Przykładowo: po posiłku rośnie stężenie glukozy, triglicerydów, hormonu wzrostu, gastryny i wapnia jonizowanego, spada natomiast stężenie fosforanów, bilirubiny, kwasu moczowego, potasu i chlorków. Parametry biochemiczne, hematologiczne i koagulologiczne podlegają również zmianom w okresie cyklu menstruacyjnego oraz w ciąży.

Tabela 1.5. Wpływ zmiany pozycji ciała (z leżącej na stojącą), wysiłku fizycznego i pory dnia na wybrane parametry biochemiczne we krwi

Parametr biochemiczny (w surowicy)	Zmiana pozycji ciała (wzrost o 5-10%)	Wysiłek fizyczny (wzrost o 10-40%)	Zmienność dobową (%) godz. 8.00-14.00
ALT	↑	↑	25
AST	-	↑	56
Albumina	↑	-	6
Cholesterol	↑	-	25
Immunoglobuliny	↑	↑	-
Kreatynina	-	↑	15
Fosforan	-	↑	11
Mocznik	-	-	22
Żelazo	-	↑	37
Sód	-	-	-

Istotne jest również, aby pacjent miał pobraną krew w warunkach spoczynkowych, tzn. w pozycji siedzącej, po 15-20 minutowym odpoczynku. Wysiłek fizyczny, zależnie od jego intensywności i czasu trwania, może wpływać na wartości wielu parametrów pomiarowych (tab. 1.5).

Tabela 1.5 nie uwzględnia zmienności dobowej hormonów, których aktywności wyraźnie podlegają wpływom pór dnia (światła i ciemności), stresu i aktywności fizycznej. Przykładowo: stężenie kortyzolu i hormonu wzrostu jest 2-

krotnie wyższe rano (6.00) niż w nocy (24.00), a reniny i aldosteronu - najniższe po południu.

Podczas pobierania krwi żyłnej należy zwrócić uwagę na czas trwania stazy (zbyt długie zaciśnięcie opaski powoduje zagęszczenie krwi), hemolizę, zanieczyszczenie płynami infuzyjnymi i zastosowanie odpowiednich środków przyspieszających lub zapobiegających wykrzepianiu.

1.6. Interpretacja wyników badań laboratoryjnych

Aby zinterpretować wynik badania laboratoryjnego, należy:

- porównać go z zakresem wartości referencyjnych,
- ocenić jego wiarygodność.

Obowiązkiem laboratorium jest poinformowanie odbiorców wyników (lekarzy zlecających badania) o zakresach wartości referencyjnych obowiązujących w danym laboratorium oraz o możliwościach oceny błędów, jakimi obciążone są wyniki badań.

1.6.1. Wartości referencyjne

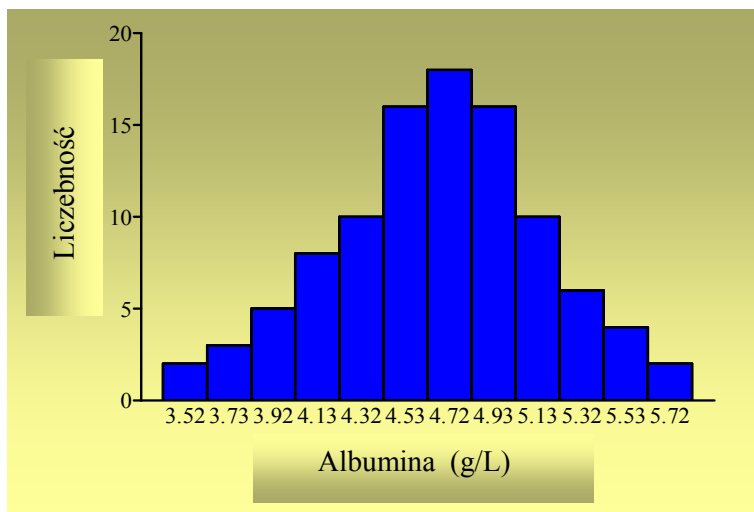
Wartości referencyjne stanowią układ odniesienia dla pojedynczego wyniku laboratoryjnego. W celu określenia wartości referencyjnych należy wykonać wiele pomiarów interesującej nas cechy dla wytypowanej populacji referencyjnej (małej próby). Otrzymany zbiór wartości należy opracować statystycznie ustalając wartość średnią, wielkość rozrzutu wokół średniej oraz kształt otrzymanego rozrzutu.

1.6.1.1. Rozkład symetryczny Gaussa

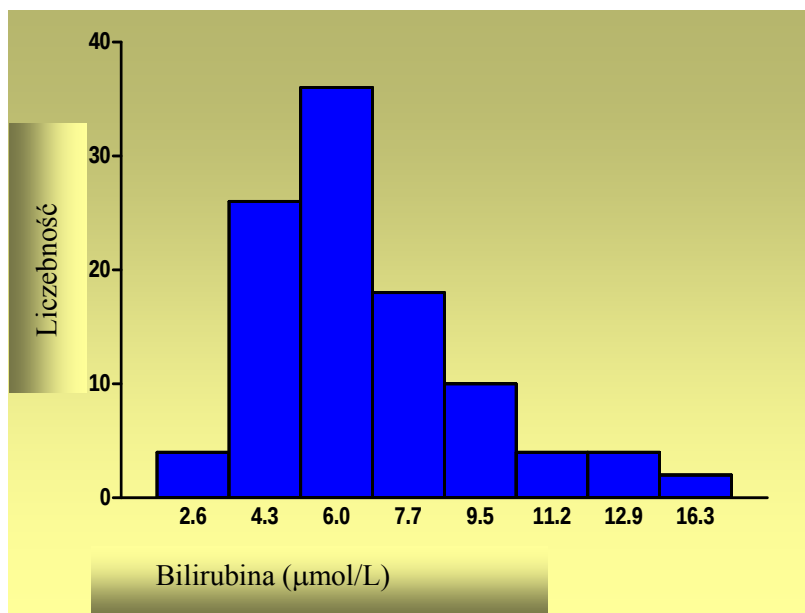
Wartości referencyjne podawane są jako wartość średnia ($\bar{x}$) $\pm$ podwójne odchylenie standardowe (OS) i obejmują 95% badanej populacji (ryc. 1.3).

1.6.1.2. Rozkład niesymetryczny

Wartości referencyjne są to wyniki znajdujące się w granicach między 2,5 a 97,5 percentyla w zbiorze wyników uzyskanych dla populacji osób zdrowych. W tym przypadku wartości referencyjne podawane są jako zakres obejmujący dolną i górną granicę ich wartości oraz wartość modalna (wartość najczęściej się pojawiająca) (ryc. 1.4).



Ryc. 1.3. Histogram przedstawiający strukturę zbioru wyników albuminy we krwi ludzi zdrowych, $n=100$



Ryc. 1.4. Histogram przedstawiający strukturę zbioru wyników bilirubiny we krwi ludzi zdrowych, $n=100$

1.6.2. Wpływ czynników biologicznych na wartości referencyjne

- Płeć pacjenta:
Wartości referencyjne dla niektórych parametrów, takich jak kreatynina w surowicy czy hormony płciowe, są różne dla mężczyzn i kobiet.
- Wiek pacjenta:
Różne zakresy wartości referencyjnych dla wielu parametrów biochemicznych - dla noworodków, dzieci, i osób dorosłych np. aktywność fosfatazy alkalicznej, fosfor nieorganiczny, immunoglobuliny.
- Dieta:
Różnice sposobu odżywiania - próbki od osób głodzonych lub pobrane bezpośrednio po posiłku, nie odzwierciedlają aktualnego stanu pacjenta.
- Czas pobrania próbki:
Wpływ zmienności biologicznej na sekrecję hormonów: rytm dobowy, przyjmowanie posiłków.
- Wysiłek fizyczny:
Wzrost H^+ , NH_4^+ i mleczanu po wysiłku fizycznym.
- Przyjmowane leki:
Interferencja bezpośrednio w reakcje chemiczne lub pośrednio w inne etapy postępowania analitycznego; np. witamina C wpływa na oznaczanie cukru w moczu metodami redukcyjnymi, środki cieniujące stosowane w radiologii przez długi czas zniekształcają wyniki w badaniach diagnostycznych czynności tarczycy.

1.7. Charakterystyka błędów analitycznych

1.7.1. Błąd przypadkowy analizy i precyzja

Błąd przypadkowy jest miarą powtarzalności analizy. Wartość błędu precyzji określa spodziewany rozrzut wyników wokół podanej wartości. Wielkość błędu precyzji określa się ilościowo przez podanie odchylenia standardowego (OS) - jest to bezwzględny błąd precyzji lub jako współczynnik zmienności, który wyraża odchylenie standardowe wyrażone w procentach wartości średniej.

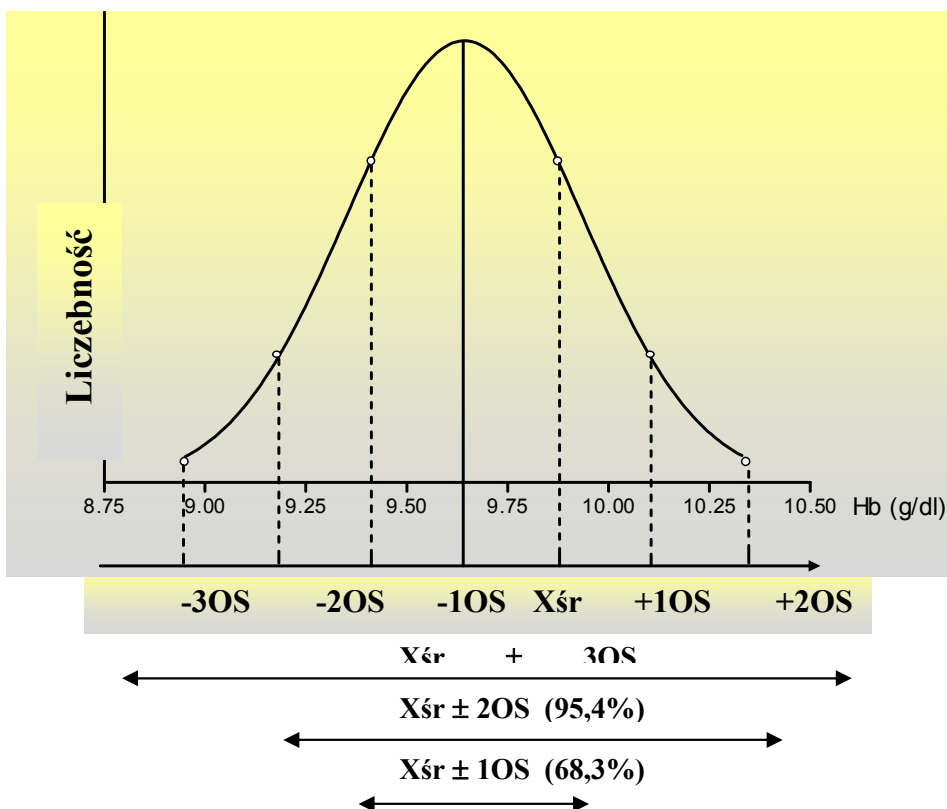
Współczynnik zmienności powinien być wartością stałą dla szerokiego zakresu stężeń badanej substancji. Znajomość błędu precyzji pozwala na prawidłową ocenę wyniku badania laboratoryjnego tzn. pozwala określić, czy kolejne wyniki oznaczeń wykonanych w trakcie leczenia różnią się w sposób statystycznie znamienny. Jeżeli zmiana między kolejnymi oznaczeniami jest większa niż 3OS błędu precyzji to można przyjąć, że są to wyniki statystycznie różne.

Przykład oznaczania błędu precyzji (ćwiczenie):

Obliczyć odchylenie standardowe i współczynnik zmienności (WZ) dla metody oznaczania hemoglobiny na podstawie 14 oznaczeń tego parametru, wykonanych z tej samej próbki krwi (tab. 2, ryc. 3).

Tabela 2. Seria jednoczesna wykonana dla oznaczania hemoglobiny (HGB) we krwi

Numer oznaczenia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HGB (g/dL)	9.1	9.4	9.6	9.8	9.5	9.7	9.9	9.7	9.6	9.5	9.6	9.9	10.0	9.7



Ryc. 1.5. Rozkład liczebności: normalny, charakteryzujący powtarzalność oznaczenia stężenia hemoglobiny we krwi

Wyliczona wartość średnia = 9,64 g/dL

OS = $\pm 0,23$ g/dL

WZ = $\pm 2,38$ %

Otrzymane wyniki wskazują, że przy ponownym oznaczeniu hemoglobiny w tej samej próbce krwi, otrzymany wynik nie będzie się różnił od wartości średniej o więcej niż 0,23 g/dL ($p=68\%$) i o więcej niż 0,46 g/dL ($p=95\%$).

Błąd precyzji = $\pm 2OS$ od wartości średniej
współczynnik zmienności (WZ) = odchylenie standardowe
wyrażone w % wartości średniej.

1.7.2. Błąd systematyczny, dokładność metody

Błędem systematycznym nazywamy odchylenie wyniku od wartości oczekiwanej. Wielokrotne powtarzanie analizy błędu systematycznego nie zmniejsza i nie informuje o nim. Wykrycie błędu systematycznego możliwe jest jedynie przez porównanie z inną metodą, która z definicji dostarcza wartość oczekiwaną.

Wartością oczekiwaną jest średnia otrzymana:

- metodą absolutną,
- metodą referencyjną,
- metodą rutynową z analiz wykonywanych przez laboratoria referencyjne,
- metodą porównań - z analiz wykonywanych przez wiele laboratoriów rutynowych biorących udział w zewnętrznej kontroli jakości (porównaniach międzylaboratoryjnych).

Rodzaje błędów systematycznych:

A. Błąd systematyczny laboratoryjny

Przyczynami powstawania tego rodzaju błędu mogą być: zły wzorzec i odczynniki, niezgodność kalibracyjna między wzorcem i badaną próbą, niewykalirowane pipety. Błąd ten powinien być wykryty i usunięty.

B. Błąd systematyczny metody

Przyczyny powodujące złą dokładność w tym zakresie, to:

- niska specyficzność metody, gdy w procesie analitycznym biorą udział inne substancje obecne w środowisku, zwiększając fałszywie stężenie badanego parametru;
- interferencja substancji, które zakłócają przebieg reakcji;

- strata substancji badanej w postępowaniu analitycznym, co powoduje zaniżenie wyniku.

Błąd systematyczny metody nie dyskwalifikuje jej, szczególnie jeżeli we wszystkich pomiarach jest taki sam, a podstawową informacją jaką chcemy uzyskać są różnice między mierzonymi wartościami.



Ryc. 1.6. Zależność pomiędzy precyzją a dokładnością metody analitycznej

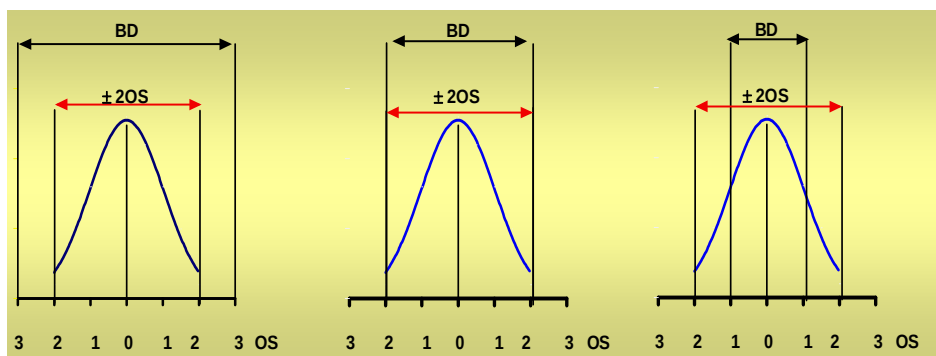
1.7.3. Błąd dopuszczalny

Błąd dopuszczalny jest to maksymalny błąd pomiaru, który nie zmienia w istotny sposób analitycznego klinicznego znaczenia wyniku.

Wartość błędu dopuszczalnego określa się na podstawie:

- potrzeb klinicznych
- zakresu wartości referencyjnych (reguła Tonksa)

$$\text{Błąd dopuszczalny (BD)} = \frac{\frac{1}{4} \text{ zakresu normy}}{\text{wartość średnia normy}}$$



Ryc. 1.7. Zależność pomiędzy błędem precyzji metody a błędem dopuszczalnym

Wartość błędu precyzji powinna być niższa od wartości błędu dopuszczalnego, charakteryzującego potrzeby odbiorcy.

1.8. Wiarygodność wyniku

Wiarygodność wyniku obejmuje podstawowe cechy wyniku, a mianowicie dokładność i precyzję, i jest rezultatem wielu sumujących się składników procesu analitycznego, takich jak:

- właściwy wybór wartości oczekiwanej, wg której kalibrowane są wyniki i prowadzona jest kontrola ich jakości,
- błąd systematyczny metody, podstawowy czynnik wpływający na dokładność wyników; powinien mieścić się w błędzie dopuszczalnym dokładności,
- błąd systematyczny laboratoryjny, powinien być wykryty i usunięty,
- błąd przypadkowy (precyzji) musi mieścić się w granicach błędu dopuszczalnego ze znacznym marginesem bezpieczeństwa,
- błąd specyficzny dla określonego indywidualnego materiału, spowodowany obecnością substancji egzogennych (np. leki) i endogennych w patologii (np. wysokie stężenie bilirubiny),
- błąd przedanalityczny,
- omyłka, spowodowana wykonaniem niezgodnym z zamiarem np. błędna identyfikacja materiału, zanieczyszczenia; najczęściej jako wynik złej organizacji i dyscypliny pracy,
- formułowanie wyników, jednostki, czas pobrania materiału.

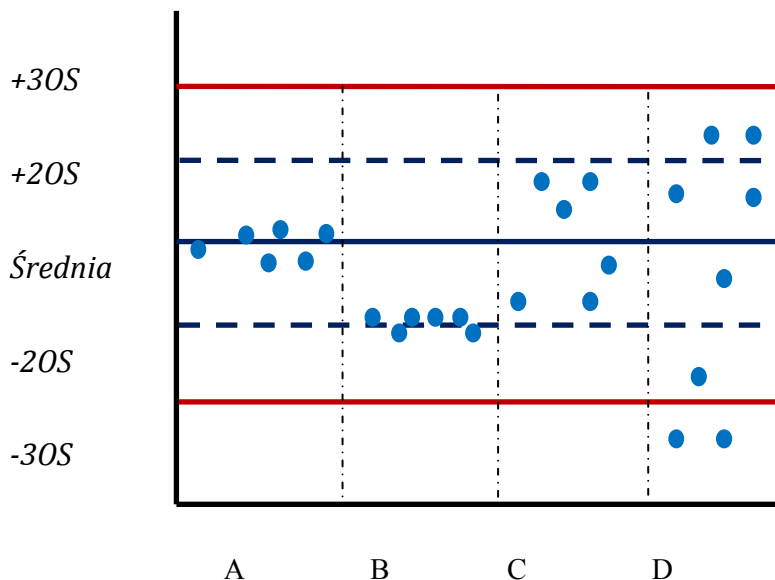
Laboratorium odpowiada całkowicie za większość czynników warunkujących wiarygodność wyniku (z wyjątkiem błędów specyficznego i przedlaboratoryjnego) i dlatego powinny one pozostawać pod stałą kontrolą.

1.9. Kontrola jakości badań laboratoryjnych

Praca laboratorium podlega kontroli zarówno wewnętrznej jak i zewnętrznej. Kontrola wewnątrzlaboratoryjna polega na analizie precyzji i dokładności wykonywanych badań. Oszacowanie wielkości błędu przypadkowego dostarcza informacji o precyzji, natomiast ocena błędu systematycznego pozwala określić dokładność metody.

Nadzór nad jakością wyników badań laboratoryjnych pozwala na uzyskiwanie wiarygodnej informacji laboratoryjnej o pacjencie, co oznacza, że:

- wynik analizy jest poprawny analitycznie,
- zmierzona wartość odpowiada stanowi w organizmie w określonym czasie.



Ryc. 1.8. Miesięczna karta kontroli wewnątrzlaboratoryjnej: A – wartości kontroli w granicach 20S; B – błąd ujemny graniczny, nadal dobra precyzja; C – pogorszenie precyzji; D – duży rozrzut wyników, błąd ujemny powyżej 3SD (pogorszenie precyzji i dokładności)

1.10. Charakterystyka wartości diagnostycznej badań

Ocena wartości diagnostycznej badań laboratoryjnych pozwala rozgraniczyć ludzi zdrowych od chorych.

Pojęcia używane w ocenie wyniku badania diagnostycznego:

- Wynik prawdziwie dodatni (PD): wynik dodatni u osoby chorej
- Wynik fałszywie dodatni (FD): wynik dodatni u osoby zdrowej
- Wynik prawdziwie ujemny (PU): wynik ujemny u osoby zdrowej
- Wynik fałszywie ujemny (FU): wynik ujemny u osoby chorej

Miernikami wartości diagnostycznej testu są:

- czułość diagnostyczna testu,
- swoistość diagnostyczna testu.

Czułość diagnostyczna testu jest to stosunek liczby wszystkich chorych (PD + FU) do liczby wyników prawdziwie dodatnich (PD)

$$\text{Czułość} = \text{PD} / (\text{PD} + \text{FU})$$

(Czułość wyraża zdolność potwierdzenia choroby u osób chorych)

Czułość testu wynosi 100%, gdy u każdego chorego stwierdza się wartości patologiczne, tzn. nie ma fałszywie ujemnych wyników. Do badań o dużej czu-

łości diagnostycznej należą oznaczenia aktywności aminotransferaz oraz parametrów gospodarki kwasowo-zasadowej (RKZ).

Swoistość diagnostyczna testu jest to stosunek liczby wszystkich osób bez choroby (PU + FD) do liczby wyników prawdziwie ujemnych (PU)

$$\text{Swoistość} = \text{PU} / (\text{PU} + \text{FD})$$

(Swoistość wyraża zdolność testu do wykluczenia choroby)

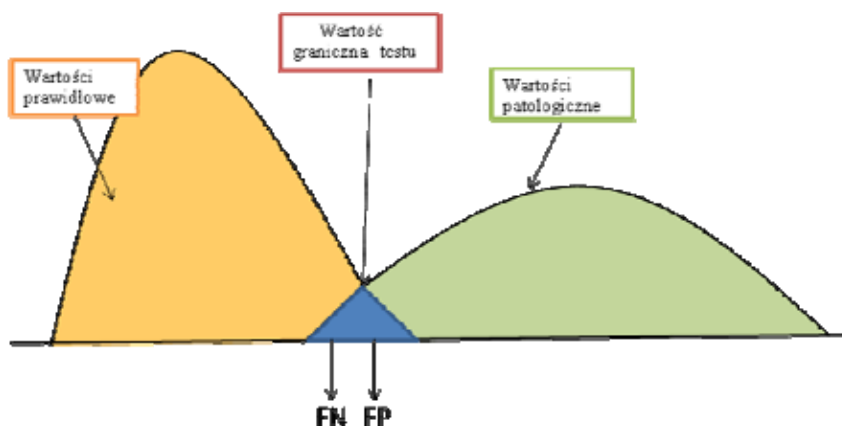
Specyficzność testu wynosi 100%, gdy w określonym stanie chorobowym nie ma wyników fałszywie dodatnich. Do badań o wysokiej specyficzności zaliczamy badania hormonalne oraz izoenzymatyczne. Niską specyficznością charakteryzują się takie oznaczenia, jak OB, LDH całkowite, elektrolity, aminotransferazy.

Skuteczność testu – określa procent prawdziwie dodatnich i prawdziwie ujemnych wyników w stosunku do wszystkich wykonanych analiz:

$$\text{skuteczność testu} = (\text{czułość} + \text{specyficzność}) / 2$$

Przyjmuje się, że badania dla których wyliczona skuteczność jest mniejsza niż 80%, nie są przydatne diagnostycznie.

Sila diagnostyczna testu – określa prawdopodobieństwo, że obserwowany objaw patologiczny jest skutkiem określonej choroby. Wartość ta zależy od czułości i specyficzności testu oraz częstości występowania określonej jednostki chorobowej.



Ryc. 1.9. Graficzna interpretacja czułości i swoistości testów laboratoryjnych

Po przesunięciu wartości odcięcia w stronę wartości fizjologicznych dochodzi do wzrostu liczby wyników prawdziwie dodatnich oraz spadku liczby wyni-

ków prawdziwie ujemnych (ryc. 1.9). Wzrasta zatem czułość diagnostyczna testu i zmniejsza się jego swoistość diagnostyczna. Natomiast przesunięcie wartości odcięcia w stronę wartości patologicznych poprawia swoistość, a pogarsza czułość diagnostyczną testu. Zmiany czułości i swoistości zachodzą w przeciwnym kierunku.

1.11. Zasady dobrej współpracy z laboratorium

Laboratorium zobowiązane jest podać informacje dotyczące:

- sposobu przygotowania pacjenta do badań,
- sposobu pobierania materiału biologicznego, ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju próbek (pojemników), kolejności pobierania, sposobu mieszania, minimalnej ilości materiału, transportu i przechowywania (czas i temperatura),
- zakresu wartości prawidłowych (referencyjnych),
- błędu precyzji dla poszczególnych analiz,
- czasu oczekiwania na wynik analizy.

Szczegółowe informacje na temat funkcjonowania laboratorium powinny znajdować się na stronach internetowych oraz w punktach pobrania materiału biologicznego.

2. BADANIA IMMUNOHEMATOLOGICZNE W TRANSFUZJOLOGII

Agnieszka Jankowska-Kulawy, Anna Raszeja-Specht

Celem badań immunohematologicznych wykonywanych przed transfuzją u biorców krwi jest dobranie krwi dawcy zgodnej w układzie ABO oraz w zakresie antygeny D z układu Rh z biorcą, dla której biorca nie posiada przeciwciał. W związku z tym zakres badań wykonywanych przed transfuzją u biorcy krwi obejmuje:

- oznaczenie grupy krwi układu ABO i antygeny D z układu Rh,
- badanie w kierunku obecności przeciwciał odpornościowych,
- wykonanie próby zgodności serologicznej między biorcą i dawcą krwi (próby krzyżowej).

Badania immunohematologiczne mają duże znaczenie kliniczne, ponieważ krew i preparaty krwiopochodne są często stosowane na oddziałach ratunkowych, chirurgicznych i hematologicznych. Ponadto, przetaczanie krwi jest niezbędne w zabiegach z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego oraz jako transfuzja wymienna u noworodków i niemowląt. Przetaczanie krwi związane jest z ryzykiem powikłań, w tym wstrząsu poprzetoczeniowego, dlatego też konieczne jest wykonywanie badań immunohematologicznych i odpowiednie dobranie krwi lub jej preparatu.

2.1. Regulacje prawne dotyczące leczenia krwią

Przetaczanie krwi niesie za sobą konsekwencje prawne, stąd leczenie krwią w zakładach opieki zdrowotnej podlega regulacjom prawnym określającym sposób i organizację leczenia krwią.

Wśród aktów prawnych do najważniejszych należą:

- Dyrektywa Komisji 2005/62/WE z dnia 30 września 2005 r. wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w zakresie norm i specyfikacji wspólnotowych odnoszących się do systemu jakości obowiązującego w placówkach służby krwi;
- Ustawa z dnia 26 listopada 2003 r. o zmianie ustawy o publicznej służbie krwi oraz o zmianie ustawy o zakładach opieki zdrowotnej (Dziennik Ustaw Nr 223, poz. 2215);
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 19 września 2005 r. w sprawie określenia sposobu organizacji leczenia krwią w zakładach opieki zdrowotnej, w których przebywają pacjenci ze wskazaniami do leczenia krwią i jej składnikami (Dziennik Ustaw Nr 191, poz. 1607);
- Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi, wy-

dawane i corocznie uzupełniane przez Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

2.2. Metody stosowane w badaniach immunohematologicznych

Podstawą reakcji serologicznej jest reakcja antygen-przeciwciała „in vitro”. W wyniku tej reakcji może dojść do aglutynacji, precypitacji lub hemolizy – są to typowe reakcje serologiczne. Z metod stosowanych w badaniach immunohematologicznych można wymienić metodę manualną, probówkową, metodę z zastosowaniem kolumn testowych (mikrometoda) oraz metodę automatyczną.

W metodzie manualnej oznaczania antygenów układu ABO i Rh stosuje się technikę płytkową, która polega na nałożeniu kropli badanych krwinek i odczynnika monoklonalnego na płytę szklaną lub plastikową i ocenie wystąpienia lub braku aglutynacji. Metoda probówkowa jest najczęściej stosowana do wykrywania obecności przeciwciał odpornościowych (test enzymatyczny LEN, pośredni test antyglobulinowy PTA). Metoda kolumnowa (mikrometoda) polega na zastosowaniu kolumn testowych, które umieszczone są na specjalnej karcie (sześć kolumn na jednej karcie). W kolumnach testowych zawarte są odpowiednie odczynniki, w zależności od rodzaju karty. Do kolumny dodaje się materiał badany. Zaletą stosowania metody kolumnowej jest możliwość zastosowania niewielkiej ilości materiału badanego, eliminacja błędu związanego z odpłukiwaniem krwinek, zmniejszenie ryzyka zarażenia personelu oraz możliwość archiwizacji badań. Metoda kolumnowa w porównaniu z metodą manualną jest czulsza, co umożliwia wykrywanie słabych odmian antygenów oraz przeciwciał we wczesnym okresie immunizacji pacjenta. Ponadto, metoda kolumnowa może zostać przystosowana do systemów półautomatycznych lub automatycznych.

2.3. Pobieranie krwi do badań serologicznych

W badaniach serologicznych stosuje się krew żylną, pobraną z żyły łokciowej do suchej, czystej probówki. Od dorosłego pacjenta pobiera się co najmniej 8 ml krwi, a w przypadku niemowląt i małych dzieci 2 do 5 ml krwi. Bezpośrednio po pobraniu należy na probówce umieścić dane pacjenta. Dane na etykiecie probówki muszą być zgodne z danymi na skierowaniu. W przypadku braku danych pacjenta probówkę i skierowanie opisuje się NN i numerem książki głównej. Badanie wykonuje się po całkowitym wykrzepieniu krwi.

Zaleca się pobieranie krwi na wersenian (EDTA-K₂) od: noworodków, niemowląt, małych dzieci, pacjentów z niedokrwistością autoimmunohemolityczną oraz od pacjentów, u których badania serologiczne wykonuje się mikrometodą lub metodą automatyczną.

Bezwzględny wskazaniem jest wykonywanie oznaczenia grupy krwi i próby zgodności serologicznej między dawcą i biorcą z dwóch, osobno pobranych próbek krwi.

2.4. Antygeny krwinek czerwonych

Antygeny krwinek czerwonych znajdują się na ich powierzchni lub w błonie komórkowej. Zróżnicowanie antygenowe krwinek czerwonych jest podstawą wyróżnienia poszczególnych grup krwi. Antygeny będące składnikami krwi dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla.

Synteza antygenów znajduje się pod kontrolą odpowiednich genów. Występowanie dwóch lub większej liczby alleli zajmujących to samo pojedyncze miejsce w chromosomie (*locus*) jest przyczyną polimorfizmu genów. Występujące na powierzchni krwinki czerwonej antygeny zostały zaklasyfikowane do tzw. układów grupowych. W skład układu wchodzi antygeny wytwarzane przez allele zajmujące to samo pojedyncze miejsce w chromosomie i charakteryzujące się podobnymi właściwościami immunologicznymi i serologicznymi. Zespół genów warunkujący występowanie określonego składu antygenowego w danym układzie grupowym nosi nazwę **genotypu**, natomiast antygeny układu grupowego wykryte badaniami laboratoryjnymi określane są jako **fenotyp**. Antygeny są białkami błonowymi, zawierającymi komponenty wielocukrowe i lipidowe. Geny odpowiedzialne za ich syntezę kodują często nie bezpośrednio wytwarzanie tych substancji, ale enzymów potrzebnych do ich wytworzenia.

Funkcja antygenów nie ogranicza się tylko i wyłącznie do pobudzania odpowiedzi immunologicznej (immunogeny). Antygeny występujące na powierzchni krwinek czerwonych, mogą spełniać także wiele innych funkcji, między innymi:

- transporterów i kanałów błon komórkowych – antygeny układu Kidd,
- receptorów dla czynników egzogennych, wirusów, bakterii – antygeny układu Duffy,
- cząsteczek adhezyjnych – antygeny układu Lutheran,
- enzymów – glikozylotransferazy układu ABO,
- białek strukturalnych – antygeny układu Rh.

Cechą charakterystyczną antygeny jest jego immunogenność, to jest zdolność do wywoływania odpowiedzi immunologicznej w postaci produkcji przeciwciał u ludzi i zwierząt nie posiadających takiego antygeny. W pobudzeniu odpowiedzi immunologicznej istotną rolę odgrywają: budowa chemiczna antygeny, stopień jego obcości, liczba krwinek czerwonych z obcym antygenem wprowadzonych do ustroju i ilość przenoszonego przez nie antygeny oraz droga wprowadzenia antygeny.

Obecnie opisano 284 antygeny, które zaliczane są do 29 układów grupowych. 27 układów grupowych jest syntetyzowanych w krwince czerwonej, a 2 adsorbowane są z osocza. Kliniczne znaczenie w immunohematologii ma zale-

dwie kilka układów. Dla potrzeb praktycznej transfuzjologii znaczenie mają tylko te układy grupowe, których antygeny charakteryzują się dużą immunogennością lub częstym występowaniem naturalnych przeciwciał.

2.5. Przeciwciała grupowe krwi

Przeciwciała skierowane do obcych antygenów wszystkich układów grupowych krwinek czerwonych określane są mianem alloprzeciwciał. W badaniach serologicznych wykonywanych przed przetoczeniem krwi należy rozróżnić alloprzeciwciała od autoprzeciwciał, czyli przeciwciał skierowanych do antygenów własnych krwinek czerwonych. Autoprzeciwciała są wytwarzane znacznie rzadziej w porównaniu do alloprzeciwciał, ale ich obecność utrudnia interpretację badań serologicznych.

Większość przeciwciał grupowych krwi należy do dwóch klas globulin: IgM i IgG, a rzadko do IgA. Dlatego w serologii transfuzjologicznej rozróżnia się praktycznie dwa rodzaje przeciwciał:

- przeciwciała naturalne, których powstawanie indukowane jest „naturalnym” środowiskiem tzn. substancjami świata roślin i zwierząt, pyłami zawierającymi związki o takiej samej budowie chemicznej jak antygeny niektórych grup krwi, oraz
- przeciwciała odpornościowe, które powstają w wyniku immunizacji antygenami znajdującymi się na obcych krwinkach, jako efekt przetoczenia krwi lub ciąży.

Właściwości przeciwciał naturalnych i odpornościowych przedstawiono w tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Charakterystyka przeciwciał naturalnych i odpornościowych

Przeciwciała naturalne	Właściwości	Przeciwciała odpornościowe
IgM	Klasa immunoglobulin	IgG
900 000	Ciężar cząsteczkowy D	160 000
0.6-2.8	Stężenie w surowicy g/L	8-18
nie	Przejsięcie przez łożysko	tak
tak	Wiązanie komplementu	czasami
ABO, Lewis, P, MNS	Powstają w odpowiedzi na antygeny układów grupowych	wszystkie układy krwinek czerwonych

W warunkach laboratoryjnych, reakcja antygen-przeciwciało *in vitro*, zależy od rodzaju przeciwciał, wymaga określonych warunków: temperatury, środowiska i czasu reakcji (tab. 2.2.). Zależy ona również od właściwych proporcji po-

między ilością antygeny i przeciwciał, a także od gęstości determinant antygenowych na krwinkach.

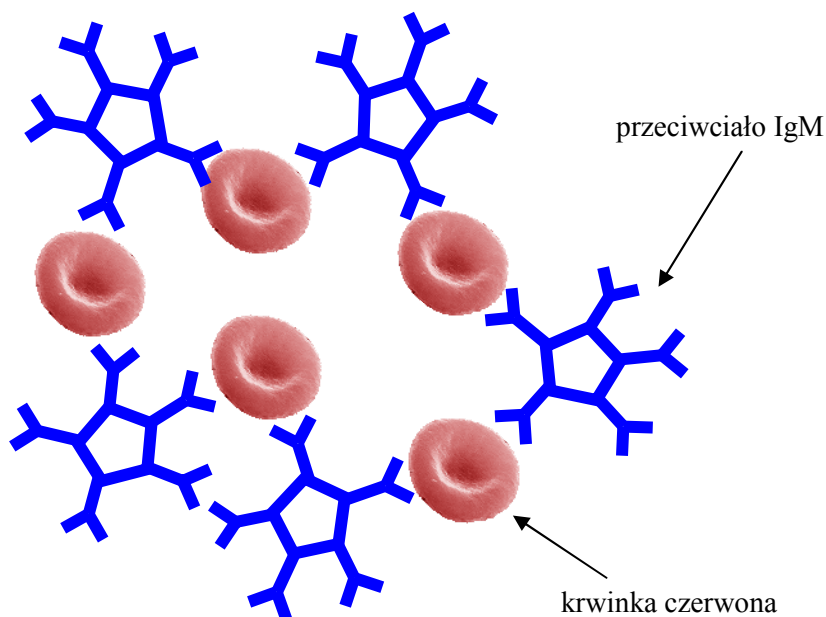
Przeciwciała naturalne IgM, w warunkach *in vitro* najszybciej łączą się z antygenem krwinek czerwonych w temp. 4°C, stąd też określane są mianem „zimnych” lub „kompletnych” przeciwciał. W praktyce przeciwciała te wykrywane są w temperaturze pokojowej (18-20°C), w środowisku soli fizjologicznej (150 mM NaCl). Ze względu na budowę przeciwciał naturalnych, tzn. dużą ilość miejsc wiążących antygen oraz odpowiednio duży zasięg ramion przeciwciał, aglutynują one krwinki w ciągu kilku minut (ryc. 2.1).

Tabela 2.2. Właściwości przeciwciał naturalnych i odpornościowych w reakcji antygen-przeciwciała *in vitro*

Przeciwciała naturalne	Warunki reakcji	Przeciwciała odpornościowe
4-18°C	Optymalna temperatura reakcji z antygenem	37°C
minuty	Czas reakcji z antygenem	około 30 min
150 mM NaCl	Środowisko reakcji z antygenem	enzymatyczne, LISS
tracą aktywność w 70°C	Wrażliwość cieplna	ciepłostalne, 70°C

Przeciwciała odpornościowe szybciej reagują z antygenem w temp. 37°C i nazywane są często przeciwciałami „ciepłymi”. Przeciwciała te z reguły nie są zdolne do bezpośredniego aglutynowania krwinek, dlatego nazywane są często przeciwciałami „niekompletnym”. Łącząc się z antygenami, opłaszczają (uczulają) tylko krwinkę (ryc. 2.2), a do wywołania aglutynacji krwinek wymagają odpowiedniej modyfikacji środowiska inkubacyjnego, np.:

- obecności enzymów proteolitycznych, które poprzez odcięcie końcowych fragmentów kwasu sialowego powodują redukcję ujemnego ładunku krwinek, zmniejszając w ten sposób siły wzajemnego odpychania się krwinek. Przekształceniu ulegają również przeciwciała, ściślej fragmenty Fab (wiążące antygen). Zmiany te prowadzą do wystąpienia aglutynacji krwinek, szczególnie gdy obecne są przeciwciała z układu Rh,
- stosowania środowiska niskojonowego LISS (Low Ionic Strength Solution), które przyspiesza i ułatwia łączenie antygenów z przeciwciałami odpornościowymi, ale nie doprowadza do aglutynacji. Aglutynację opłaszczonych przeciwciałami krwinek, wywołuje dopiero dodanie surowicy antyglobulinowej zawierającej przeciwciała przeciwko globulinom ludzkim,
- stosowanie środowiska LEN, które jest mieszaniną odczynnika niskojonowego LISS oraz enzymu (papainy lub bromeliny), w stosunku 3 :1. Obecność przeciwciał odpornościowych, przede wszystkim z układu Rh, prowadzi do wystąpienia aglutynacji.



Ryc. 2.1. Aglutynacja krwinek pod wpływem przeciwciał IgM jest następstwem bezpośredniego wiązania antygeny

2.6. Testy serologiczne

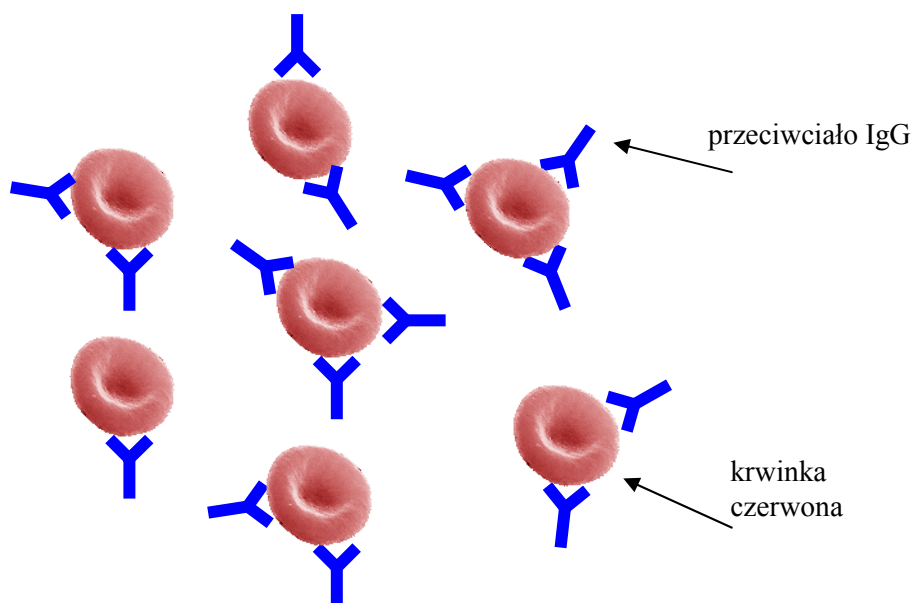
W rutynowych pracowniach serologicznych do wykrywania przeciwciał odpornościowych stosowane są dwa testy: test enzymatyczny LEN oraz pośredni test antyglobulinowy PTA. Natomiast bezpośredni test antyglobulinowy BTA służy w diagnostyce do wykrywania krwinek czerwonych opłaszczonych *in vivo* przeciwciałami lub składnikami C3 dopełniacza.

2.6.1. Test enzymatyczny LEN

Jest szczególnie użyteczny w wykrywaniu przeciwciał odpornościowych z układu Rh. Test ten charakteryzuje się dużą czułością. Technika wykonania testu została przedstawiona w części ćwiczeniowej.

2.6.2. Pośredni test antyglobulinowy PTA

Jest stosowany do wykrywania przeciwciał odpornościowych i składników komplementu związanych z krwinkami czerwonymi. W teście tym przeciwciała odpornościowe, związane z antygenami krwinek czerwonych, ale nie powodujące ich aglutynacji, wykrywane są za pomocą surowicy antyglobulinowej.



Ryc. 2.2. Przeciwciała odpornościowe „opłaszczają” krwinki czerwone, nie są zdolne do bezpośredniej aglutynacji krwinek czerwonych

Surowicę antyglobulinową uzyskuje się poprzez immunizację zwierząt doświadczalnych surowicą ludzką. W wyniku reakcji odczynnika antyglobulinowego z przeciwciałami zaadsorbowanymi na powierzchni krwinek badanych dochodzi do aglutynacji krwinek czerwonych. Najczęściej stosuje się surowice antyglobulinowe poliwalentne, zawierające przeciwciała skierowane przeciwko immunoglobulinom IgG, IgM oraz składnikom komplementu.

Zasada wykonania pośredniego testu antyglobulinowego obejmuje trzy etapy:

- **I etap:** uczulanie krwinek (dawcy) *in vitro* (inkubacja w temp. 37°C) z surowicą (biorcy), która może zawierać przeciwciała odpornościowe przeciwko antygenom krwinek czerwonych;
- **II etap:** usunięcie surowicy wraz z przeciwciałami, które nie związały się z antygenami krwinek, poprzez 4-krotne odpłukanie krwinek solą fizjologiczną;
- **III etap:** aglutynacji krwinek uczulonych (opłaszczonych) przeciwciałami poprzez dodanie surowicy antyglobulinowej, która zawiera przeciwciała skierowane do globulin ludzkich.

Schemat wykonania testu znajduje się poniżej w części ćwiczeniowej.

2.6.3. Bezpośredni test antyglobulinowy BTA

Test bezpośredni wykrywa przeciwciała, które związały się z krwinką *in vivo*, jako efekt obecności autoprzeciwciał, przeciwciał matczynych przeciwko antygenom dziecka w chorobie hemolitycznej noworodków, czy wreszcie przeciwciał powodujących immunologiczne odczyny poprzetoczeniowe. Z tego powodu wykonanie BTA omija I etap przedstawionego wyżej postępowania dla pośredniego testu antyglobulinowego.

2.7. Układ grupowy ABO

Antygeny układu ABO występują na powierzchni krwinek czerwonych oraz w innych komórkach organizmu ludzkiego. W postaci rozpuszczonej występują we wszystkich płynach ustrojowych (za wyjątkiem płynu mózgowo-rdzeniowego) u osób posiadających gen sekrecji Se (wydzielacze, ok. 80% populacji).

Układ grupowy ABO jest najważniejszym układem grupowym krwinek czerwonych ze względu na:

- regularne występowanie przeciwciał dla tych antygenów układu ABO, których nie posiadają krwinki danego osobnika oraz zdolności do wiązania komplementu przez alloaglutyniny układu ABO, co prowadzi do wewnątrznaczyniowej hemolizy przetoczonych, niezgodnych krwinek czerwonych, oraz
- powszechność występowania w ustroju człowieka.

Układ ABO jest genetycznie uwarunkowany trzema genami allelomorficznymi zajmującymi jedno miejsce w chromosomie. Gen O jest amorficzny tzn. nie produkuje determinanty antygenowej i jest zdominowany przez geny A i B. Immunodeterminantą antygeny A jest N-acetylogalaktozamina, a antygeny B – D-galaktoza. Ludzkie krwinki przynależą do jednej z grup krwi: A, B, AB lub O.

Grupy krwi praktyczne pozostają niezmiennie przez całe życie. Antygeny A oraz B układu ABO kształtują się pod koniec ciąży, dlatego u noworodków i niemowląt mogą wykazywać słabszą ekspresję niż w późniejszych okresach życia. Podstawową substancją, z której pod kontrolą odpowiednich genów rozwijają się antygeny A i B, jest antygen H, którego ekspresja jest osłabiona u osób z tymi antygenami, natomiast pozostaje niezmienniona u osób grupy O. W obrębie antygeny A występuje dalsze zróżnicowanie antygeny na grupy: A1, A2, A3, Ax. Odmiany antygeny B występują znacznie rzadziej.

Przeciwciała układu ABO, anty-A i anty-B, są przeciwciałami regularnymi, występują jako stały składnik surowicy u ludzi z nieobecnym odpowiednim antygenem. Są to przeciwciała naturalne, w większości klasy IgM, chociaż u osób z grupą O występują przeciwciała anty-A, B należące do IgG. Reagują one często z odmianami antygeny A nie rozpoznawanymi przez przeciwciała anty-A

od osób z grupą B. Mają one zdolność przechodzenia przez łożysko i mogą być przyczyną choroby hemolitycznej noworodków. Inne, nieregularne i rzadziej występujące przeciwciała układu ABO przedstawiono w tabeli 2.3.

Tabela 2.3. Częstość występowania antygenów i przeciwciał układu ABO

Feno- typ	Genotyp	Częstość występowania %	Allo- przeciwciała regularne	Allo- przeciwciała nieregularne	Częstość występo- wania %
O	O/O	33	anty-A		
A ₁	A ₁ /O A ₁ /A ₁ A ₁ /A ₂	31	anty-B	anty-H	rzadko
A ₂	A ₂ /O A ₂ /A ₂	9	anty-B	anty-A ₁	2
B	B/O B/B	19	anty-A	anty-H	bardzo rzadko
A ₁ B	A ₁ /B	6		anty-H	rzadko
A ₂ B	A ₂ /B	2		anty-A ₁	26

2.8. Układ grupowy Rh

Jest jednym z najbardziej polimorficznych układów grupowych krwi. Antygeny tego układu znajdują się wyłącznie na krwinkach czerwonych, nie spotyka się ich na innych komórkach, czy w płynach ustrojowych. Antygeny tego układu rozwijają się bardzo wcześnie w życiu płodowym, około 5-6 tygodnia życia płodowego, osiągając pełną immunogenność. Za najważniejszy antygen tego układu uważa się antygen D, który spośród wszystkich antygenów grup krwi jest najbardziej efektywnym immunogenem. Dlatego też obecność lub nieobecność tego antygeny na krwinkach decyduje o przynależności do grupy, odpowiednio: „Rh dodatnich” lub „Rh ujemnych”. Osoby Rh dodatnie stanowią około 85% rasy białej. Antygeny układu Rh są białkami błonowymi krwinki czerwonej, których obecność zapewnia właściwą strukturę i stabilność błonie komórkowej.

Najczęściej określane antygeny układu Rh to antygeny: Dd Cc Ee. Mogą one występować w różnych odmianach. Antygen D jest zbiorem epitopów o różnej konformacji. W mniej niż 1% przypadków dochodzi do zmniejszonej ekspresji epitopów na powierzchni krwinek czerwonych, co jest przyczyną powstawania słabej odmiany antygeny D (słaby D) dawniej określanej jako Du. Słaby antygen D ma prawidłową budowę, ale występuje w stosunkowo niewielkich ilościach na powierzchni krwinek czerwonych, stąd może być powodem wątpliwych reakcji z przeciwciałami anti-D. Inna, znacznie rzadziej występująca odmiana antygeny D, to tzw. D częściowy. Charakteryzuje się nieprawidłową, niekompletną budową cząsteczki, w której nie występuje jeden lub kilka epitopów antygeny D.

Brak określonych epitopów jest podstawą do podziału częściowego antygeny D na tzw. kategorie. Biorcy krwi posiadający antygen D częściowy, którym przetoczono krew dawcy Rh dodatniego, mogą wytworzyć przeciwciała anti-D.

Przeciwciała układu Rh są przeciwciałami typu odpornościowego. Ponad połowa osób Rh ujemnych, którym przetoczono krew Rh dodatnią, wytwarza przeciwciała anti-D. Można również wykryć u biorców krwi tzw. bierne przeciwciała anti-D jako efekt wcześniejszego podania immunoglobuliny anti-D. Wśród osób Rh ujemnych często spotykanymi przeciwciałami są anti-C lub anti-E, które mogą występować obok przeciwciał anti-D.

2.9. Próba serologicznej zgodności biorcy i dawcy przed przetoczeniem (próba krzyżowa)

Próba serologicznej zgodności biorcy i dawcy przed przetoczeniem (próba krzyżowa) jest jednym z najważniejszych badań wykonywanych w pracowni serologicznej. Praktycznie każde przetoczenie krwi może prowadzić do immunizacji biorcy, dlatego przetaczane krwinki dawcy muszą być zgodne z krwinkami biorcy w zakresie antygenów układu ABO i antygeny D z układu Rh oraz tych antygenów innych układów, przeciwko którym biorca kiedykolwiek wytworzył przeciwciała odpornościowe.

Bezpieczna i efektywna transfuzja wymaga od pracowników laboratorium spełnienia następujących warunków:

- stałego zwracania uwagi na stosowanie sprawdzonych odczynników i surowic diagnostycznych i na prawidłowe wykonywanie obowiązujących badań
- eliminacji błędów „ludzkich”
- zapoznania się z „serologiczną” przeszłością chorego (przetoczenia krwi, ciążę, informacje o przeciwciałach wykrywanych w przeszłości). Dane na ten temat zawarte są w takich dokumentach jak: wpisy w dokumentach osobistych, karty informacyjne ze szpitali, dokumentacja w książeczce usług medycznych, wyniki badań będące w posiadaniu pacjenta.

2.9.1. Zasady stanowiące serologiczną podstawę krwiolecznictwa

1. Przetacza się krew zgodną w zakresie antygenów układu ABO i antygeny D z układu Rh.

2. Przetaczana krew nie może zawierać antygeny reagującego z przeciwciałami biorcy lub antygeny, który był odpowiedzialny za stwierdzoną alloimmunizację w przeszłości.

3. W celu zapobiegania dalszej immunizacji, chorym, którzy kiedykolwiek wytworzyli alloprzeciwciała odpornościowe oraz chorym, u których stwierdza

się autoprzeciwciała aktywne w 37°C, należy przetaczać krew zgodną fenotypowo w układzie Rh i zgodną w antygenie K z układu Kell.

4. Osobom płci żeńskiej do okresu menopauzy należy w miarę możliwości oznaczać antygen K i jeżeli jest on nieobecny, dobierać krew K ujemną.

Odstępstwa od zasad – dobieranie do przetoczeń KKCz grupy O chorym innej grupy

Dobieranie do przetoczeń KKCz grupy O chorym innej grupy jest dopuszczalne w następujących okolicznościach:

- stany zagrażające życiu, gdy brak krwi jednoimiennej,
- obecność alloprzeciwciał odpornościowych, przy braku zgodnej krwi jednoimiennej,
- bardzo słaba ekspresja antygeny A lub B, albo trudności w określeniu grupy ABO,
- brak krwi Rh ujemnej jednoimiennej w układzie ABO.

2.9.2. Właściwa próba zgodności serologicznej

Wykonanie próby krzyżowej obejmuje przeprowadzenie szeregu badań laboratoryjnych, w skład których wchodzi:

1. Potwierdzenie zgodności antygenów układu ABO biorcy i dawcy krwi. Jest to najważniejsze z badań próby zgodności ze względu na poważne konsekwencje przetaczania krwi niezgodnej w układzie ABO.

2. Kontrola antygeny D biorcy krwi, a gdy biorca jest Rh ujemny również kontrola antygeny D u dawcy. Celem tego badania jest zabezpieczenie biorców Rh ujemnych przed przetoczeniem krwi Rh dodatniej.

3. Sprawdzenie obecności przeciwciał odpornościowych w surowicy biorcy krwi przeciwko krwinkom dawcy. Obecność takich przeciwciał jest powodem odrzucenia krwi badanego dawcy do przetoczenia oraz, po określeniu swoistości przeciwciał, dobrania innego dawcy, którego krwinki nie mają tego antygeny.

4. Sprawdzenie obecności przeciwciał odpornościowych w surowicy biorcy krwi przeciwko krwinkom wzorcowym zawierającym antygeny, dla których przeciwciała odpornościowe są najczęściej wytwarzane. Obecność przeciwciał odpornościowych skierowanych do krwinek wzorcowych, ale nie do krwinek dawcy, wymaga określenia swoistości przeciwciał i dobierania dawcy, którego krwinki nie mają antygeny dla tych przeciwciał.

Wynik próby krzyżowej jest ważny przez 48 godzin od momentu pobrania krwi do badania. Te same zasady odnoszą się do okresu ważności testu przeglądowego na obecność przeciwciał odpornościowych. Jeżeli krew nie została w tym okresie przetoczona, obowiązuje powtórzenie próby zgodności ze świeżo pobraną próbką krwi.

2.10. Konflikt serologiczny

Przyczyną tzw. konfliktu serologicznego jest przeciek płodowo-matczyny, czyli kontakt krwi matki z niewielką ilością krwi dziecka. Zazwyczaj ma to miejsce dopiero w momencie porodu, gdyż krew dziecka i matki w czasie ciąży nie miesza się dzięki istnieniu sprawnej bariery łożyskowej. Po przedostaniu się krwinek płodu/novorodka do krwiobiegu matki jej organizm zaczyna wytwarzać przeciwciała typu IgM i IgG, przeciw antygenom obecnym na krwinkach czerwonych. Przykładowo, przeciwciała przeciw antygenowi D z układu Rh, wytwarzane mogą być wskutek immunizacji matki Rh (-) krwią dziecka Rh (+). Przeciwciała klasy IgG mają zdolność przenikania bariery łożyskowej w trakcie następnej ciąży, dlatego w przypadku płodu Rh (+) przeciwciała IgG matki niszczą jego erytrocyty, powodując głęboką niedokrwistość hemolityczną. Skutkuje to zahamowaniem rozwoju płodu i może doprowadzić do jego obumarcia, poronienia lub przedwczesnego porodu. Choroba hemolityczna noworodka może pojawić się niekiedy w trakcie trwania pierwszej ciąży, np. jako powikłanie zabiegów wewnątrzmaciczych. Ze względu na szeroko stosowaną profilaktykę są to przypadki sporadyczne, a większość ciąż tzw. "konfliktowych" kończy się urodzeniem zdrowego dziecka.

Mniej groźnym i rzadziej występującym jest konflikt w zakresie układu grup głównych krwi (A, B, O, AB). Ten rodzaj konfliktu może pojawić się, gdy matka ma grupę krwi np. O, a dziecko dziedziczy grupę A lub B. Krwinki dziecka powodują powstawanie przeciwciał typu odpornościowego u matki, a skutki tego procesu są podobne jak w przypadku konfliktu w zakresie układu Rh. W przeciwieństwie do niezgodności w układzie Rh, w konfliktach grup głównych krwi pierwsze dziecko choruje równie często jak następne. W następstwie tego konfliktu dochodzi do niedokrwistości z towarzyszącą hiperbilirubinemią, czego skutkiem może być okołoporodowa, wczesna i nasilona żółtaczka noworodka.

2.11. Składniki krwi i produkty krwiopochodne

Z krwi pobieranej od zdrowych dawców otrzymywane są:

- morfotyczne, upostaciowane składniki krwi: koncentrat krwinek czerwonych, koncentrat granulocytarny, koncentrat krwinek płytkowych,
- osocze świeżo mrożone oraz krioprecypitat,
- produkty krwiopochodne, uzyskiwane poprzez frakcjonowanie dużych objętości osocza; albumina, immunoglobuliny, czynniki krzepnięcia (głównie czynnik VIII i IX).

Preparaty krwi zawierają płyny konserwujące, zapobiegające krzepnięciu krwi oraz zawierające substancje odżywcze, umożliwiające przechowywanie krwi w temperaturze lodówki od 21- 42 dni (w zależności od składu płynu konserwującego).

Koncentrat krwinek czerwonych (KKCz) uzyskuje się z krwi pełnej przez usunięcie osocza przy użyciu separatora komórkowego (erytroafereza). Stosowany jest najczęściej w leczeniu niedokrwistości u chorych normowolemicznych oraz do transfuzji wymiennych u noworodków.

Koncentrat granulocytarny (KG) uzyskuje się metodą automatycznej aferezy, co umożliwia pobranie całej jednostki koncentratu od jednego dawcy. Wskazania są ograniczone, dotyczą chorych z ciężką neutropenią i zaburzeniami funkcji granulocytów i dlatego wymagają szczegółowej konsultacji z transfuzjologiem.

Koncentrat krwinek płytkowych (KKP) można otrzymywać metodą wirowania krwi pobranej od jednego dawcy, a pojedyncze jednostki mogą być łączone bezpośrednio przed podaniem. Wskazaniem do podawania płytek jest małopłytkowość poniżej 10 G/L, spowodowana niedostatecznym wytwarzaniem płytek, zwiększonym niszczeniem płytek, zaburzeniami ich funkcji, rozcieńczeniem poprzetoczeniowym oraz przygotowywanie pacjentów z małopłytkowością do zabiegów chirurgicznych. Decydującym wskazaniem jest stan klinicznych choro-
rego, czyli obecność i nasilenie objawów skazy krwotocznej.

Osocze świeżo mrożone otrzymywane jest drogą plazmaferezy i natychmiast mrożone, co zapewnia aktywność czynników krzepnięcia. Stosowane jest najczęściej jako substrat do wytwarzania produktów krwiopochodnych, oraz w leczeniu zaburzeń krzepnięcia wynikających z niedoboru czynników, w zakrzepowej plamicy małopłytkowej i przy stosowaniu doustnych antykoagulantów.

Krioprecypitat jest frakcją krioglobulin, uzyskiwaną z świeżo mrożonego osocza metodą rozmrażania w określonych warunkach. Stosowany w leczeniu DIC-u, niedoborach fibrynogenu oraz czynników krzepnięcia, gdy nie ma możliwości doboru właściwych produktów wysokooczyszczonych (np. czynnika VIII lub IX).

W niektórych sytuacjach klinicznych wskazane jest stosowanie preparatów, które zostały poddane szczególnej preparatyce – np. eliminacji leukocytów (ubogoleukocytarny KKCz lub KKP), usunięcia resztkowych składników osocza (przemycanie KKCz lub KKP) oraz eliminacji żywych limfocytów (napromieniowanie składników krwi).

2.12. Powikłania poprzetoczeniowe

Powikłania poprzetoczeniowe są niejednorodną grupą reakcji na przetoczenie składników krwi i mogą pojawiać się w trakcie transfuzji, tuż po jej zakończeniu oraz w okresie kilku dni, miesięcy a nawet lat po przetoczeniu (np. zakażenia przenoszone drogą krwi).

Zarówno personel jak i pacjent powinni zostać poinformowani o konieczności zgłoszenia każdego niepokojącego objawu, a w szczególności zaczerwienienia skóry, wysypki, dreszczy, duszności, bólu kończyn lub bólu w okolicach lędźwiowych. Jeżeli zaburzenia pojawiają się w trakcie transfuzji, należy ją prze-

rwać, podłączyć 0,9% NaCl, a przypadek zgłosić do Banku Krwi i RCKiK, stosując określony protokół postępowania.

Najczęstsze objawy towarzyszące ostrym reakcjom poprzetoczeniowym, to:

- gorączka (może być wynikiem ostrej hemolizy wewnątrznaczyniowej lub obecności przeciwciał przeciw leukocytom lub cytokinom zawartym w podawanym preparacie),
- pobudzenie, dreszcze,
- nagły spadek lub wzrost ciśnienia,
- ból w miejscu wkłucia, w klatce piersiowej, ból brzucha lub okolicy lędźwiowej,
- duszność, zaburzenia oddychania,
- zmiany skórne (pokrzywka, rumień – najczęściej w wyniku obecności przeciwciał anty-IgA),
- nudności i wymioty,
- ciemny kolor moczu (ostra reakcja hemolityczna),
- krwawienia, skaza krwotoczna.

Opóźnione odczyny poprzetoczeniowe pojawiają się u chorych immunizowanych podczas ciąży lub wcześniejszych przetoczeń, u których miano przeciwciał jest tak małe, że nie udaje się ich wykryć w próbach przedtransfuzyjnych. Powtórna immunizacja podwyższa ich miano, co objawia się reakcją immunologiczną: gorączką, niedokrwistością i żółtaczką, najczęściej po 7-10 dniach od przetoczenia.

2.13. Ćwiczenia praktyczne

2.13.1. Ćwiczenie 1

Oznaczenie grupy krwi i Rh

Stosowana metoda

Badanie wykonuje się metodą manualną z zastosowaniem plastikowej płytki, zestawu krwinek wzorcowych i odczynników monoklonalnych.

Materiał biologiczny

Krew żylna pobrana do suchej probówki. Po całkowitym wykrzepieniu krwi, co trwa zwykle około 30 minut krew należy wirować z przyspieszeniem 1000 do 1200 x g przez 10-15 minut.

Odczynniki

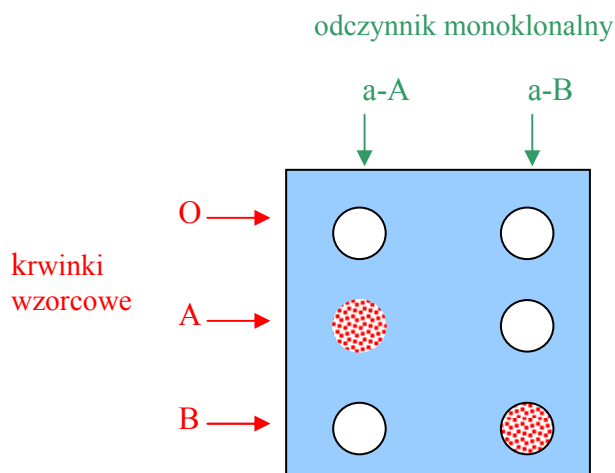
- 10% zawiesina krwinek wzorcowych grupy: A₁, B oraz O w soli fizjologicznej
- odczynniki monoklonalne anty-A, anty-B oraz anty-D
- sól fizjologiczna (0,9% NaCl)

Sprzęt laboratoryjny

- plastikowe probówki o pojemności 5 ml
- pipety serologiczne
- plastikowe kubeczki
- plastikowe płytki do oznaczania grup krwi
- statywy do probówek
- wirówka serologiczna

Kontrola zestawu przeciwciał monoklonalnych i krwinek wzorcowych do oznaczania grup krwi

Na płytce plastikowej w pionowym rzędzie, umieścić 3 x po 1 kropli przeciwciał monoklonalnych anti-A. W drugim rzędzie obok, umieścić 3 x po 1 kropli przeciwciał monoklonalnych anti-B. Następnie dodać po 1 kropli krwinek wzorcowych w rzędach poziomych, odpowiednio grupy: O, A₁ oraz B. Poruszyć płytą ruchem okrężnym i pozostawić przez 2 do 5 minut (lub według zaleceń asystenta) w temperaturze pokojowej. Zestaw jest prawidłowo przygotowany, jeżeli otrzymano silne aglutynacje, zgodnie z poniższą ryciną:

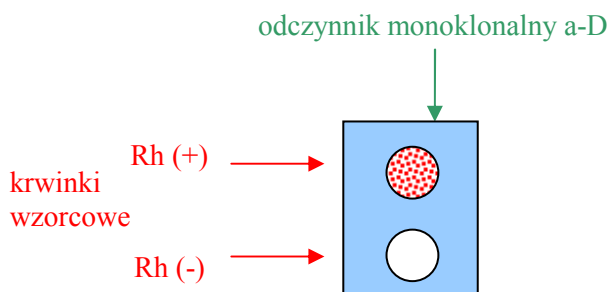


Ryc. 2.3. Kontrola zestawu do oznaczania grupy krwi

Kontrola zestawu przeciwciał monoklonalnych do oznaczenia Rh

Na płytce plastikowej w pionowym rzędzie, umieścić 2 x po 1 kropli przeciwciał monoklonalnych anti-D. Następnie dodać po 1 kropli krwinek wzorcowych w rzędach poziomych, odpowiednio Rh dodatnich i Rh ujemnych. Poruszyć płytą ruchem okrężnym i pozostawić przez 2 do 5 minut (lub według zaleceń asystenta) w temperaturze pokojowej.

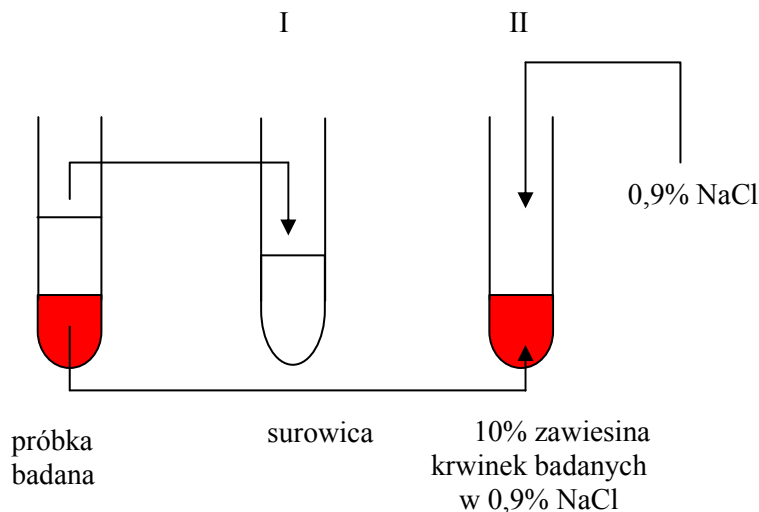
Zestaw jest prawidłowo przygotowany, jeżeli otrzymano silne aglutynacje, zgodnie z poniższą ryciną.



Ryc. 2.4. Kontrola zestawu do oznaczania Rh

Oznaczenie grupy krwi i Rh badanej próbki krwi

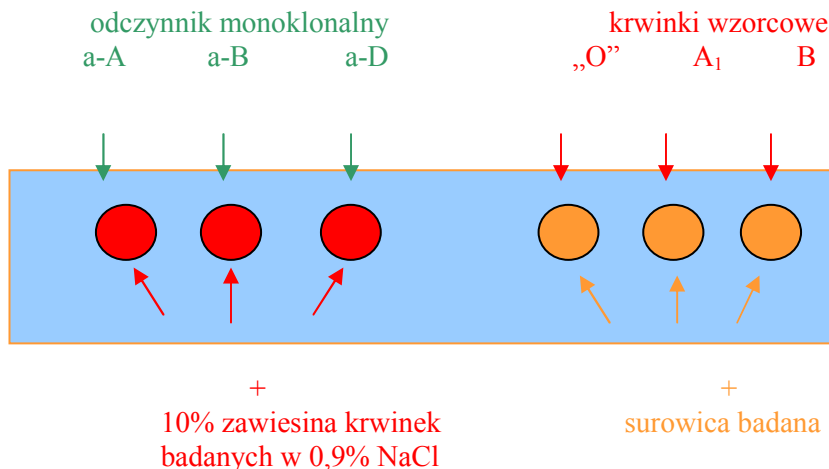
W statywie, obok probówki z badaną krwią umieścić dwie dodatkowe probówki, oznaczone numerami I oraz II. Do probówki nr I przenieść pipetką badaną surowicę. W probówce nr II przygotować około 10% zawiesinę badanych krwinek (1 kropla gęstych krwinek + 9 kropli soli fizjologicznej), zgodnie z ryciną 2.5.



Ryc. 2.5. Przygotowanie krwi do badania

Na płytce plastikowej należy oznaczyć rodzaj dodawanych przeciwciał monoklonalnych i krwinek wzorcowych, zgodnie z ryc. 2.6. Następnie dodać do

odpowiednich przeciwciał po 1 kropli przygotowanej 10% zawiesiny badanych krwinek, a do krwinek wzorcowych – po 1 kropli badanej surowicy. Poruszyć płytką ruchem okrężnym i pozostawić 2 do 5 minut w temperaturze pokojowej.

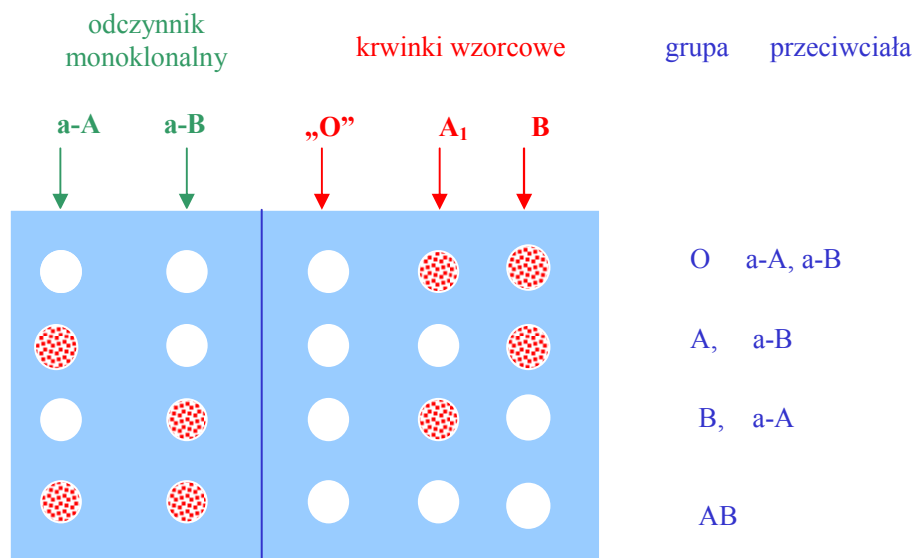


Ryc. 2.6. Wykonanie oznaczenia grupy krwi i Rh

Odczytać wyniki aglutynacji i określić grupę krwi według ryciny 2.7. Określić Rh badanej krwi. Obecność aglutynacji oznacza, że badane krwinki są Rh (+), natomiast jej nieobecność oznacza, że krwinki są Rh (-).

Uwaga:

Oznaczenia antygenów układu ABO i Rh w pracowniach serologicznych przeprowadza się za pomocą dwóch zestawów zawierających różne linie przeciwciał monoklonalnych anty-A, anty-B oraz anty-D (IgM). Przy stosowaniu odczynników monoklonalnych należy przestrzegać zaleceń producenta. Wynik odczytują dwie osoby. Odczyt zapisywany jest w księdze badań i jest potwierdzany podpisem przez dwie osoby. Po badaniu krew przechowywana jest przez 5 dni w temp. +4°C.



Ryc. 2.7. Wyniki oznaczenia grupy krwi

WYNIK PRZEPROWADZONEGO BADANIA:

2.13.2. Ćwiczenie 2

Wykonanie próby zgodności serologicznej między biorcą i dawcą krwi (próba krzyżowa)

Badanie jest wykonywane wspólnie przez dwie siedzące obok siebie osoby z wykorzystaniem próbek krwi, w których oznaczono grupę krwi i Rh, bez względu na wynik oznaczenia albo zgodnie z zaleceniami asystenta. Jedną z badanych próbek krwi będzie próbką krwi biorcy, druga natomiast krwią dawcy. Dla celów dydaktycznych na ćwiczeniu zostanie wykonana część próby krzyżowej tj. wykrywanie przeciwciał odpornościowych w teście enzymatycznym LEN oraz reakcja surowicy biorcy z krwinkami dawcy w teście enzymatycznym LEN.

Uwaga:

Kontrola zgodności grup krwi w układzie grupowym ABO oraz antygenu D z układu Rh między biorcą i dawcą krwi została wykonana jako Ćwiczenie 1.

Odczynniki:

- sól fizjologiczna (0,9% NaCl)
- odczynnik o niskiej sile jonowej LISS
- odczynnik LEN (mieszanina LISS: papaina, objętościowo 3:1)
- surowica biorcy
- 10% zawiesina krwinek biorcy w soli fizjologicznej
- 10% zawiesina krwinek dawcy w soli fizjologicznej

- 5% zawiesina krwinek biorcy w LISS
- 5% zawiesina krwinek dawcy w LISS
- 5% zawiesina krwinek wzorcowych w LISS
- 5% zawiesina krwinek Rh (+) w LISS
- 5% zawiesina krwinek Rh (-) w LISS
- standard anty-D
- surowica antyglobulinowa

Uwaga:

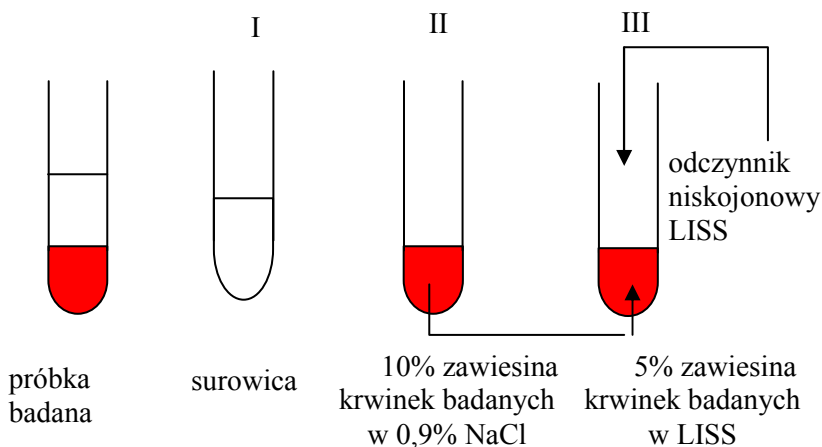
Odczynnik LEN należy przygotować *ex tempore*. Trwałość odczynnika wynosi 4 godziny.

Sprzęt:

- plastikowe probówki o pojemności 5 ml
- pipety serologiczne
- plastikowe kubeczki
- statywy do probówek
- wirówka serologiczna

Przygotowanie 5% krwinek biorcy oraz krwinek dawcy w LISS

Zawiesiny odpowiednich krwinek w odczynniku LISS zostaną użyte w teście enzymatycznym LEN. W statywie z próbkami krwi biorcy oraz dawcy, obok probówek oznaczonych nr I (surowica) i II (10% zawiesina krwinek w soli fizjologicznej), umieścić probówkę oznaczoną nr III (5% krwinki w LISS), ryc. 2.8.



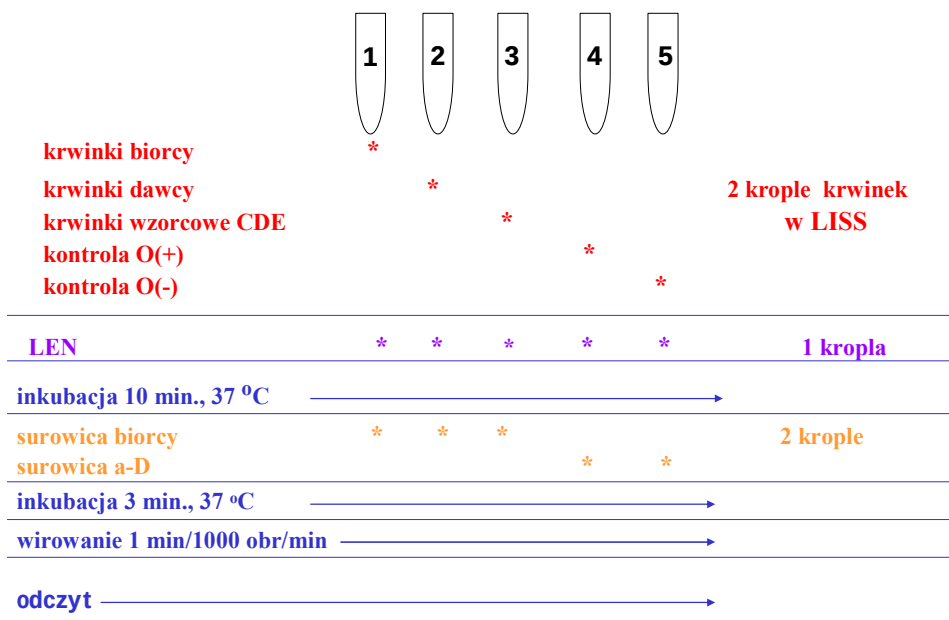
Ryc. 2.8. Przygotowanie krwinek w odczynniku LISS

Przygotowanie 5% zawiesiny krwinek biorcy oraz dawcy w odczynniku LISS:

- przenieść pipetą ok. 0,25 ml krwinek z probówki II (10% zawiesina krwinek w soli fizjologicznej) do probówki III
- dodać ok. 1 ml odczynnika LISS
- wstawić do wirówki, odwirować
- supernatant znad osadu odciągnąć pipetą i odrzucić
- osad krwinek zawiesić w ok. 0,5 ml odczynnika LISS

Wykrywanie w surowicy biorcy obecności przeciwciał odpornościowych przeciwko krwinkom wzorcowym w teście enzymatycznym LEN oraz reakcja surowicy biorcy z krwinkami dawcy w teście enzymatycznym LEN

Badanie wykonać zgodnie z następującą ryciną:



Ryc. 2.9. Wykrywanie w surowicy biorcy obecności przeciwciał odpornościowych przeciwko krwinkom wzorcowym w teście enzymatycznym LEN oraz reakcja surowicy biorcy z krwinkami dawcy w teście enzymatycznym LEN

Interpretacja badania:

Wyniki odczytuje się makroskopowo, wstrząsając lekko zawartością probówek.

Badanie jest wykonane prawidłowo, jeżeli aglutynacja wystąpiła w probówce nr 4 (kontrola (+), krwinki Rh(+)) z przeciwciałami odpornościowymi anty-D), natomiast nie wystąpiła w probówce nr 5 (kontrola (-), krwinki Rh(-)) z przeciwciałami odpornościowymi anty-D).

Próba jest zgodna, jeżeli poza probówką nr 4, nie wystąpiła aglutynacja.

Aglutynacja w probówce nr 1 (krwinki biorcy + surowica biorcy) oznacza obecność autoprzeciwciał.

Aglutynacja w probówce nr 2 (krwinki dawcy + surowica biorcy) oznacza obecność w surowicy biorcy przeciwciał odpornościowych skierowanych do krwinek dawcy.

Aglutynacja w probówce nr 3 (surowica biorcy + krwinki wzorcowe) oznacza obecność przeciwciał skierowanych do antygenów krwinek wzorcowych.

Aglutynacja obecna we wszystkich probówkach najczęściej oznacza występowanie nieswoistej przyczyny. Interpretacja takiego badania jest niemożliwa.

Brak aglutynacji we wszystkich probówkach oznacza, że procedura badania została wykonana nieprawidłowo. Interpretacja badania jest niemożliwa.

WYNIK PRZEPROWADZONEGO BADANIA:.....

Wykrywanie obecności przeciwciał odpornościowych w surowicy biorcy skierowanych do krwinek dawcy (właściwa próba zgodności serologicznej) oraz krwinek wzorcowych pośrednim testem antyglobulinowym (PTA) w środowisku niskojonowym

Badanie wykonać zgodnie z ryciną 2.10.

Interpretacja badania: jak w metodzie enzymatycznej LEN.

WYNIK PRZEPROWADZONEGO BADANIA:.....

OCENA WYKONANEJ PRÓBY ZGODNOŚCI:.....

Uwaga:

W rutynowych pracowniach serologicznych próbę zgodności serologicznej (wykrywanie w surowicy biorcy przeciwciał przeciwko krwinkom dawcy) wykonuje się tylko w pośrednim teście antyglobulinowym. Po badaniu krew przechowywana jest przez 5 dni w temp. +4°C.

	1	2	3	4	5	
krwinki biorcy	*					
krwinki dawcy		*				2 krople krwinek w LISS
krwinki wzorcowe			*			
kontrola O(+)				*		
kontrola O(-)					*	
surowica biorcy	*	*	*			2 krople
standard anty-D				*	*	2 krople
inkubacja 20 min., 37 °C →						
4 x przemyć krwinek solą fizjologiczną						
surowica antyglobulinowa poliwalentna	*	*	*	*	*	2 krople
wirowanie 1 min/1000 obr/min →						
odczyt						

Ryc. 2.10. Wykrywanie obecności przeciwciał odpornościowych w surowicy biorcy skierowanych do krwinek dawcy (właściwa próba zgodności serologicznej) oraz krwinek wzorcowych pośrednim testem antyglobulinowym (PTA) w środowisku niskojonowym

3. ENZYMATYCZNE I BIAŁKOWE MARKERY PATOLOGII NARZĄDOWYCH

Tadeusz Pawełczyk

Enzymologia kliniczna jest praktycznym wykorzystaniem nauki o enzymach do diagnozowania stanów chorobowych pacjentów. Od strony analitycznej polega to na pomiarze aktywności lub określeniu poziomu białka enzymu w płynach ustrojowych (surowica/osocze, płyny śródtkankowe, moczu), gdzie w normalnych warunkach enzymy występują w niewielkich ilościach. Każda tkanka posiada swój specyficzny profil enzymatyczny. Dlatego wykrycie zmiany poziomu określonych enzymów w stanach chorobowych pozwala wnioskować o lokalizacji i rodzaju zmian patologicznych zachodzących w organizmie.

3.1. Nazewnictwo enzymów

Enzymy są białkami posiadającymi właściwości katalizatorów biologicznych tj. substancji przyspieszających reakcje chemiczne. Międzynarodowa Unia Biochemiczna (IUB) wprowadziła uniwersalny system nazewnictwa i klasyfikacji pozwalający jednoznacznie opisać enzymy dotąd poznane oraz te, które zostaną odkryte w przyszłości (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>). W systemie tym każdy enzym jest opisany przez nazwę zwyczajową, nazwę systemową oraz uniwersalny numer składający się z liter EC oraz czterocyfrowego numeru, w którym każda cyfra jest oddzielona kropką. W tabeli 3.1 podano nazwy zwyczajowe i systemowe oraz odpowiadające im numery EC dla enzymów najczęściej używanych w diagnostyce medycznej. Pierwsza cyfra w tym numerze określa przynależność enzymu do jednej z sześciu klas: 1, oksydoreduktazy; 2, transferazy; 3, hydrolazy; 4, liazy; 5, izomerazy; 6, ligazy. Dwie następne cyfry określają odpowiednie podklasy, a ostatnia cyfra jest numerem porządkowym w obrębie danej podklasy. Zasady wydzielania poszczególnych podklas i pod-podklas są odrębne dla każdej klasy głównej. I tak, w klasie pierwszej, do której należą oksydoreduktazy (EC 1) podklasy (EC 1.n) utworzone są w zależności od rodzaju grupy, która jest donorem elektronu, natomiast przynależność enzymu do pod-podklasy (EC 1.n.n) zależy od rodzaju grupy, która jest akceptorem elektronu. Z kolei w klasie 3, do której należą hydrolazy (EC.3) podklasy (EC.3.n) utworzone są według kryterium rodzaju wiązania, które jest przez dany enzym hydrolizowane, a przynależność do pod-podklasy (EC 3.n.n) zależy od rodzaju związku chemicznego (kwasy karboksylowe, tioestry, DNA, peptydy itp.) będącego substratem danego enzymu. W codziennej praktyce używane są zarówno nazwy zwyczajowe jak i systemowe (zależy to od laboratorium lub regionu Europy, a także firmy produkującej dany zestaw do oznaczeń), dlatego w razie wątpliwości powinno się zwracać uwagę również na numer EC, który jest unikalny dla danego enzymu.

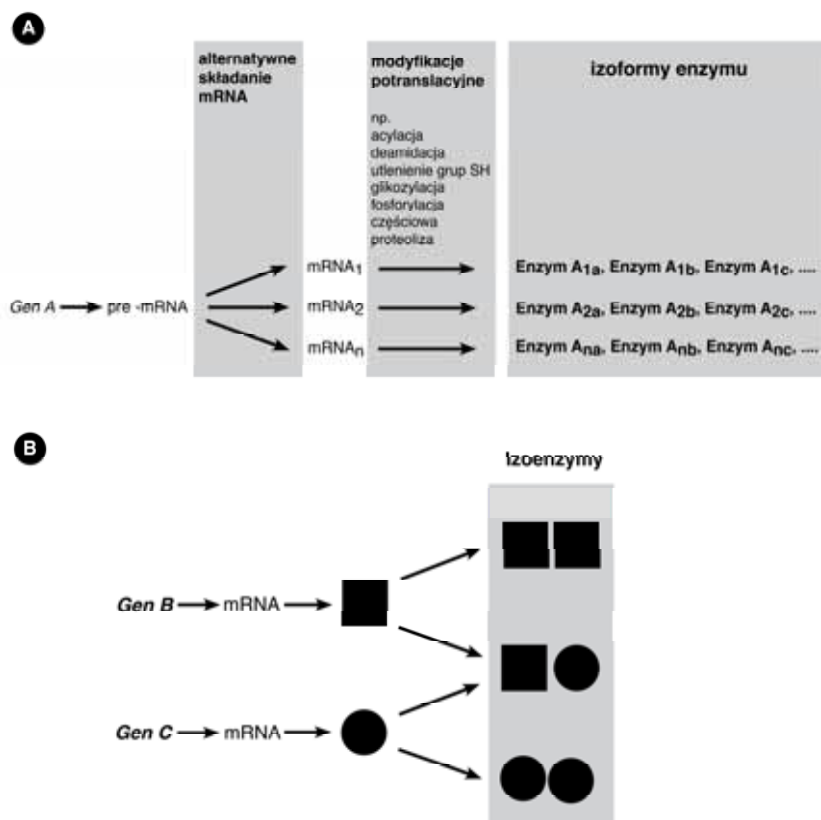
Tabela 3.1. Numery EC i nazwy niektórych enzymów stosowanych w diagnostyce medycznej

Numer EC	Nazwa systemowa	Nazwa zwyczajowa	Symbol
1.1.1.27	L-mleczan:NAD ⁺ oksydoreduktaza	dehydrogenaza mleczanowa	LD, LDH
2.6.1.1	L-asparaginian:2-oksoglutaran aminotransferaza	aminotransferaza asparaginianowa, transaminaza asparaginowa	AST, AspAT, SGOT
2.6.1.2	L-alanina:2-oksoglutaran aminotransferaza	aminotransferaza alaninowa, transaminaza alaninowa	ALT, AlAT, SGPT
2.7.3.2	ATP:kreatyna N-fosfotransferaza	kinaza kreatynowa	CK
1.4.1.3	L-glutaminian:NAD(P ⁺) oksydoreduktaza	dehydrogenaza glutaminianowa	GLDH
2.3.2.2	(5-glutamyl)-peptyd:aminokwas 5-glutamylotransferaza	γ -glutamylotransferaza, γ -glutamylotranspeptydaza	GGT, GGTP
3.1.1.8	acylohydrolaza acylocholinowa	cholinesteraza, pseudocholinesteraza, esteraza cholinowa II, cholinesteraza osoczowa	ChE, SChe
3.1.3.1	fosfohydrolaza monoestru-ortofosforowego (z optimum alkalicznym)	alkaliczna fosfataza	ALP
3.1.3.2	fosfohydrolaza monoestru-ortofosforowego (z optimum kwaśnym)	kwaśna fosfataza	ACP
3.1.3.5	fosfohydrolaza 5'-rybonukleotydu	5'-nukleotydaza	5'-NT, NTP
3.2.1.1	glikanohydrolaza 1,4- α -D-glikanu	amylaza, α -amylaza	AMY

3.2. Izoenzymy i izoformy enzymów

Enzymy, podobnie jak inne białka podlegają wielu potranslacyjnym przemianom, które często są charakterystyczne dla danego rodzaju komórki. Prowadzi to do powstania różnorodnych wariantów tego samego enzymu nazywanych izoformami. Izoformy te czasami różnią się między sobą specyficznością sub-

stratową, właściwościami regulacyjnymi lub odpornością na utratę aktywności. Wspólną cechą wszystkich izoform danego enzymu jest to, że są odmianami tego samego białka enzymatycznego kodowanego przez jeden gen (ryc. 3.1).



Ryc. 3.1. Schemat ilustrujący mechanizmy powstawania izoform enzymów (A) oraz izoenzymów (B)

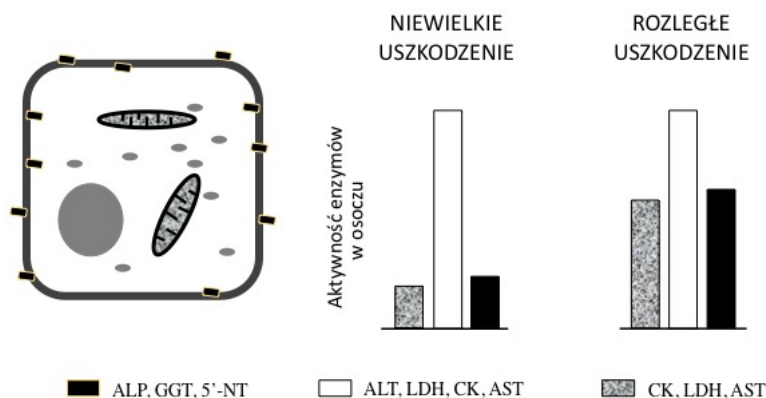
Istnieją również formy enzymu różniące się między sobą strukturą pierwszorzędową, czyli rodzajem i uporządkowaniem aminokwasów w łańcuchu peptydowym. Białka te są produktami różnych genów i noszą nazwę izoenzymów. Cechą wspólną izoenzymów jest to, że katalizują tę samą reakcję chemiczną, pomimo nieraz znaczących różnic w budowie i właściwościach regulatorowych. W codziennej praktyce określenia izoforma i izoenzym używa się często wymiennie, chociaż nie jest to poprawne. Występowanie enzymów w postaci izoform oraz izoenzymów ma istotne implikacje praktyczne w enzymologii klinicznej. Wiadomo, że w niektórych narządach lub typach komórek występują określone formy enzymów przy jednoczesnym braku pozostałych. Stwarza to moż-

liwość identyfikacji narządu, w którym zachodzą zmiany patologiczne, jeżeli dysponuje się metodą pozwalającą mierzyć poziom określonego izoenzymu lub jego izoformy.

3.3. Pochodzenie enzymów osocza

Naturalnym miejscem występowania i działania większości enzymów są komórki. Niektóre enzymy wydzielane są do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie katalizują odpowiednie reakcje chemiczne. Enzymy te określane są mianem enzymów sekrecyjnych i należą do nich między innymi trombina i białko C, które biorą udział w procesie krzepnięcia krwi, czy acylotransferaza lecytyna-cholesterol katalizująca w osoczu krwi estryfikację cholesterolu. Istnieje również grupa enzymów określana mianem enzymów wydzielniczych (sekrecyjnych), które syntetyzowane są przez komórki, a następnie są wydzielane do krwi oraz innych płynów ustrojowych. Do enzymów tych należą między innymi acylotransferaza lecytyna-cholesterol, jak również enzymy układu krzepnięcia krwi (trombina, plazmina, urokinaza, streptokinaza). Istnieje również grupa enzymów określana mianem enzymów wydaliniczych (ekskrecyjnych), które syntetyzowane są przez komórki narządów wydaliniczych, a następnie są wydzielane do światła przewodu pokarmowego, śliny oraz innych płynów ustrojowych. Do enzymów tych należą np. lipaza, amylaza, trypsyna czy rybonukleaza. W osoczu pochodzącym od zdrowego człowieka poza enzymami sekrecyjnymi można wykryć obecność niskich aktywności enzymów komórkowych oraz wydaliniczych. Przyczyną pojawiania się tych enzymów w osoczu jest nieustanny cykl obumierania i proliferacji komórek. W normalnych warunkach w każdej komórce z większym lub mniejszym nasileniem przebiegają również procesy endo- i egzocytozy, które niezbędne są do zapewnienia komórce odpowiedniego do danych warunków składu białek błony plazmatycznej. Uwolnione do osocza białka enzymatyczne eliminowane są z krwioobiegu poprzez wychwyt i metabolizm w narządach mięszowych lub są wydalone z moczem. Poziom białek enzymatycznych w osoczu jest zatem wypadkową szybkości ich uwalniania oraz eliminacji. W porównaniu do osocza stężenie enzymów w komórce jest kilka rzędów wielkości wyższe, dlatego nawet niewielki wzrost szybkości uwalniania enzymów z komórki skutkuje dużymi zmianami ich aktywności w osoczu. Warunkiem niezbędnym, aby doszło do istotnego wypływu enzymów z komórki jest naruszenie integralności błony plazmatycznej. Przerwanie błony plazmatycznej może być wynikiem zmian patologicznych prowadzących do obniżenia komórkowych zasobów ATP (ischemia, anoksja) lub następstwem bezpośredniego działania wirusów czy też toksycznych związków organicznych i nieorganicznych (alkohol, rozpuszczalniki organiczne, związki fosforoorganiczne, ołów itp). Szybkość i wielkość zmian aktywności/poziomu enzymu w osoczu zależy od szeregu czynników, takich jak jego zawartość w komórce, droga jaką przebywa uwolniony z komórki enzym do światła naczynia (bezpośredni transfer

przez błonę naczyń, bądź przez naczynia limfatyczne) oraz rozległość uszkodzenia tkanki. W komórce enzymy rozmieszczone są w poszczególnych przedziałach w sposób nierównomierny. Niektóre z nich występują tylko w cytoplazmie bądź w błonie plazmatycznej, podczas gdy inne rozmieszczone są zarówno w cytoplazmie oraz innych organellach komórkowych (mitochondria, lizosomy, jądro). Przy niewielkich uszkodzeniach komórki (które często są odwracalne) dochodzi przede wszystkim do wypływu enzymów zlokalizowanych w cytoplazmie (ryc. 2). Natomiast enzymy mitochondrialne uwalniane są w znacznie mniejszych ilościach. Znaczący wzrost wypływu tych enzymów obserwuje się dopiero w ciężkich i nieodwracalnych uszkodzeniach komórki.



Ryc. 3.2. Aktywności enzymów komórkowych w osoczu w zależności od rodzaju uszkodzenia komórki

Zależność między rodzajem i rozległością uszkodzenia tkanki, a poziomem uwolnionych enzymów najlepiej widać w zawale serca, w którym niedotlenienie i martwica kardiomiocytów przekłada się na pojawienie się w osoczu aktywności enzymatycznych o specyficznym profilu. Z kolei w patologii o powolnym rozwoju jak np. marskość wątroby wzajemne stosunki aktywności enzymów w osoczu zależą również od szybkości usuwania poszczególnych enzymów z krążenia, jak również są wypadkową zmian w szybkości ich syntezy w uszkodzonej tkance. Wzrost aktywności niektórych enzymów w osoczu można obserwować również w sytuacjach, kiedy nie dochodzi do naruszenia integralności błony plazmatycznej. Dotyczy to enzymów zlokalizowanych na powierzchni komórek (ektoenzymy), które mogą być w pewnych warunkach wymywane z komórki. Przykładem może być gammaglutamylotransferaza (GGT), której aktywność w osoczu wzrasta w stanach niedrożności dróg żółciowych. Nagromadzające się w takich sytuacjach sole kwasów żółciowych działają jak detergenty wymywając białka powierzchniowe komórek wyściełających przewody żółciowe. Inną przyczyną podwyższonej aktywności GGT w osoczu pomimo zachowania integralności hepatocytów jest wzrost biosyntezy tego i innych białek enzymatycznych

indukowany niektórymi lekami lub alkoholem. Również wzrost liczby i aktywności komórek określonego rodzaju może prowadzić do zwiększenia aktywności enzymów w osoczu. Sytuacja taka ma miejsce u rosnących dzieci, u których obserwuje się zwiększenie liczby osteoblastów w kościach, co skutkuje wzrostem aktywności alkalicznej (zasadowej) fosfatazy (ALP) w osoczu.

3.4. Aktywność enzymu

Szybkość reakcji katalizowanej przez enzym jest wprost proporcjonalna do ilości aktywnego enzymu w mieszaninie reakcyjnej. Ta prosta zależność jest jednak modyfikowana przez wiele czynników. I tak:

- Przemiany zachodzące w izolowanym materiale biologicznym nie zanikają z chwilą pobrania, ale przebiegają z różną szybkością w zależności od warunków przechowywania. Białka w trakcie przechowywania materiału biologicznego podlegają proteolitycznej degradacji i denaturacji, które prowadzącą do utraty natywnej struktury i spadku aktywności. Wrażliwość na te zmiany zależy od rodzaju białka oraz warunków przechowywania (temperatura, czas).
- Enzymy są białkami zbudowanymi z łańcucha aminokwasowego, który odpowiednio zwinięty tworzy skomplikowaną strukturę przestrzenną stabilizowaną oddziaływaniami grup funkcyjnych w aminokwasach oraz często obecnością różnego rodzaju cząsteczek w rodzaju jonów metali takich jak wapń, magnez, żelazo, miedź, mangan, nikiel, a także rozmaitych związków odgrywających rolę kofaktorów. W związku z tym na wynik pomiaru wpływ mają pH, siła jonowa, skład mieszaniny reakcyjne oraz temperatura, pomiaru.

Czynniki te powodują, że wyniki badań aktywności enzymów wykonane w różnych laboratoriach są trudne do porównania. Z uwagi na to, iż w warunkach patologicznych obserwujemy przeważnie znaczący wzrost aktywności enzymatycznych, dlatego często wyniki oznaczeń enzymatycznych wyrażone są krotnościami wartości górnej granicy przedziału referencyjnego.

3.4.1. *Optymalizacja i standaryzacja pomiarów aktywności enzymatycznych*

Aby uzyskać wiarygodny pomiar aktywności enzymu mieszanina reakcyjna musi zawierać wszystkie niezbędne substraty i kofaktory w takich stężeniach, aby mierzona aktywność zależała wyłącznie od poziomu enzymu w materiale biologicznym. Z uwagi na niskie aktywności enzymów w badanym materiale metoda pomiaru powinna zapewnić odpowiedniej wielkości sygnał. Aby spełnić te wymagania warunki pomiaru muszą być indywidualnie dostosowane do poszczególnych enzymów i skrupulatnie kontrolowane. Optymalizacja metody

obejmuje również dobór buforu o odpowiedniej sile jonowej i pH oraz ustalenie właściwego czasu pomiaru, tak aby nie dochodziło do hamowania reakcji przez powstające produkty reakcji. Prace te doprowadziły z czasem do powstania standardowych metod pomiaru aktywności poszczególnych enzymów w materiale biologicznym, zalecanych do użycia w laboratoriach medycznych. W skali międzynarodowej problemy standaryzacji oznaczeń enzymatycznych kontroluje Grupa Robocza ds. Enzymów Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC).

Miarą aktywności enzymu jest szybkość reakcji chemicznej mierzona przyrostem ilości produktu, lub ubytkiem substratu w jednostce czasu w przeliczeniu na jednostkę objętości materiału biologicznego. Komisja ds. Enzymów IUB zaproponowała międzynarodową jednostkę aktywności enzymatycznej (U) odpowiadającą takiej ilości enzymu, która katalizuje przekształcenie 1 μ mola substratu w ciągu jednej minuty. Obecnie wiele laboratoriów analitycznych podaje wielkości aktywności enzymatycznych w U/L bądź w kU/L. Inna metoda standaryzacji prezentowania aktywności enzymatycznych oparta jest o stosowanie jednostek SI. W układzie SI jednostka aktywności enzymatycznej wyrażana jest w katalach. Enzym o aktywności 1 katala (kat) katalizuje przekształcenie 1 mola substratu w czasie 1 sekundy. Pomimo rekomendacji w 1999 roku przez Międzynarodową Federację Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, aby aktywności enzymatyczne wyrażać w kat/L jednostka ta jak dotąd jest sporadycznie używana przez laboratoria analityczne.

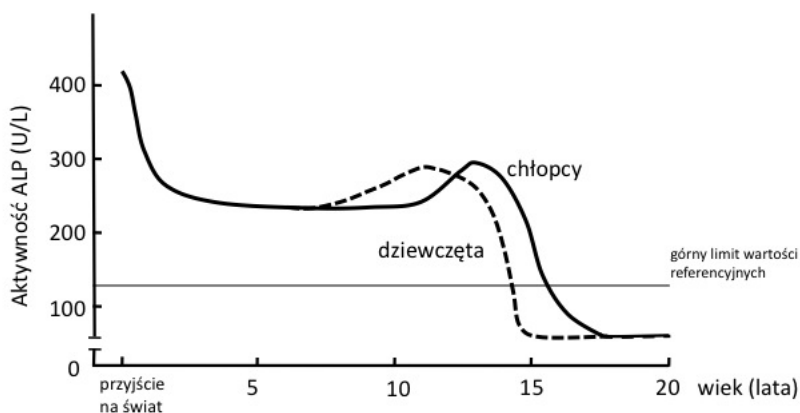
3.4.2. Wartości referencyjne

Poziom danego enzymu w osoczu zdrowego człowieka jakkolwiek jest cechą indywidualną to mieści się w przedziale wartości spotykanych w populacji ludzi zdrowych. Przedział ten określany jest mianem zakresu wartości referencyjnych. Porównując wyniki analiz aktywności enzymów pochodzące z różnych laboratoriów należy zwrócić uwagę na zakres wartości referencyjnych podanych na wyniku ponieważ mogą być one wyrażone w różnych jednostkach. Wielkość zakresu wartości referencyjnych dla niektórych enzymów zależy od stanu fizjologicznego, wieku oraz płci. Przykładem może tu być fosfataza alkaliczna, której aktywność w osoczu zmienia się w trakcie rozwoju osobniczego (ryc. 3.3).

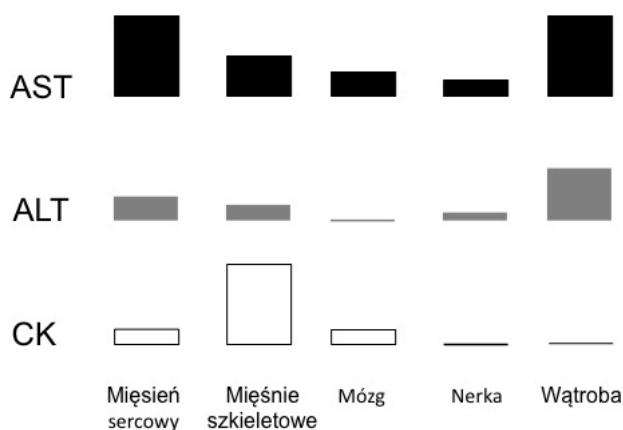
3.5. Ograniczenia wykorzystania oznaczeń enzymatycznych

Główną niedogodnością ograniczającą wykorzystanie oznaczeń enzymatycznych do lokalizacji zmian patologicznych w określonym narządzie jest brak specyficzności. Wiele enzymów występuje powszechnie w różnych typach tkanek i komórek, dlatego wzrost w osoczu aktywności określonego enzymu może pochodzić z któregośkolwiek narządu. Problem ten można obejść porównując

wzajemne stosunki dwóch lub więcej enzymów, jeżeli wzajemny stosunek aktywności tych enzymów w danym narządzie jest dla niego charakterystyczny (ryc. 3.4). Można to prześledzić na przykładzie aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej, które występują między innymi w komórkach mięśnia sercowego, hepatocytach oraz komórkach mięśni szkieletowych, lecz w każdym z tych dwóch typów komórek mięśniowych aminotransferazy alaninowej jest bardzo niewiele. Dlatego w przypadku uszkodzenia komórek wątroby, w osoczu obserwuje się wzrost aktywności ALT i AST w stosunku charakterystycznym dla hepatocytów.

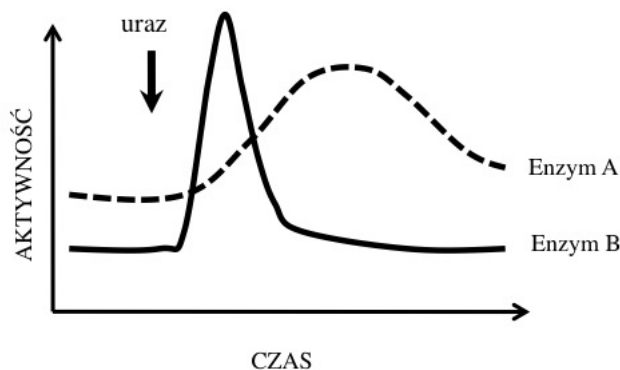


Ryc. 3.3. Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) w zależności od wieku i płci



Ryc. 3.4. Przykład dystrybucji tkankowej aminotransferazy asparaginowej (ASP), aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz kinazy kreatynowej (CK)

Inną metodą pomocną w identyfikacji uszkodzonego narządu jest pomiar aktywności specyficznej (bądź poziomu białka) charakterystycznej dla danego narządu, izoformy enzymu, lub izoenzymu. Analizując wyniki oznaczeń enzymatycznych trzeba zdawać sobie sprawę z zależności czasowych, które są charakterystyczne dla pojawiania się wzrostu poziomu enzymu w różnych patologiach. Po incydencie, w wyniku którego doszło do uszkodzenia tkanki poziom enzymów w osoczu rośnie w miarę ich uwalniania z uszkodzonych komórek, a następnie ulega obniżeniu do wartości wyjściowych w wyniku eliminacji. Dynamika tych zmian jest różna dla różnych enzymów i zależy od tkanki z której są uwalniane (ryc. 3.5). Dlatego dla każdego markera istnieje „okienko diagnostyczne“, w którym materiał powinien zostać pobrany do analizy. Wielkość tego okienka jest różna, chociaż istnieje ogólna prawidłowość wskazująca na to, że enzymy uwalniane wcześnie po incydencie szybko osiągają swoje maksimum i szybko są eliminowane z krążenia (CK w przebiegu zawału serca). Natomiast enzymy, których aktywność zaczyna wzrastać w okresie późniejszym pozostają w surowicy na podwyższonym poziomie dłużej (LDH w zawale serca). Prawidłowa interpretacja wyników badań enzymologicznych, podobnie jak innych badań laboratoryjnych, nie może być dokonana bez uwzględnienia obserwacji klinicznych oraz wszelkich innych dostępnych informacji o pacjencie.



Ryc. 3.5. Przykład odmiennej kinetyki zmian aktywności enzymów w surowicy

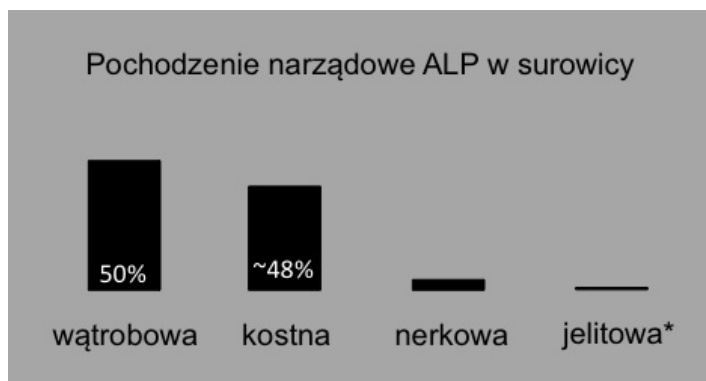
3.6. Stany chorobowe powodujące zmiany aktywności wybranych enzymów w surowicy

Spośród wielu enzymów, których zmiany aktywności w surowicy towarzyszą stanom chorobowym tylko niewielka ilość okazuje się przydatna dla celów diagnostycznych, z czego rutynowo w laboratoriach analitycznych prowadzi się oznaczania tylko kilku.

3.6.1. Fosfataza alkaliczna (zasadowa)

Fosfataza alkaliczna (EC 3.1.3.1) jest enzymem hydrolizującym estry monofosforanowe i wykazującym w warunkach *in vitro* optimum aktywności w pH 9-10. Chociaż dokładna funkcja tego enzymu w warunkach *in vivo* nie jest znana przypuszcza się, że uczestniczy on między innymi w transporcie lipidów w jelicie oraz w procesie kalcyfikacji kości. W komórce ALP zlokalizowana jest na zewnętrznej stronie błony plazmatycznej. Enzym ten występuje powszechnie w różnych rodzajach komórek i tkanek w formie wielu izoenzymów i izoform (ryc. 6).

- **ALPL (tkankowo niespecyficzna alkaliczna fosfataza; ALP, wątroba/kości/nerki)**
 - gen zlokalizowany na chromosomie 1 w pozycji 1p36.1-p34
 - enzym wrażliwy na inhibicję przez winian
- **ALPP (alkaliczna fosfataza, łożyskowa; izoenzym Regan'a)**
 - gen zlokalizowany na chromosomie 2 w pozycji 2q37
 - odporny na wysoką temperaturę (60 -70°C)
- **ALPL2 (alkaliczna fosfataza, podobna do ALPP; izoenzym Nagao)**
 - gen zlokalizowany na chromosomie 2 w pozycji 2q37
 - ulega ekspresji w jądrach i zarodkowych komórkach nowotworowych
- **ALPI (alkaliczna fosfataza, jelitowa; izoenzym Kasahara)**
 - gen zlokalizowany na chromosomie 2 w pozycji 2q37.1
 - enzym wrażliwy na inhibicję przez feniloalaninę



Ryc. 3.6. Pochodzenie izoenzymów i izoform fosfatazy alkalicznej (ALP) oraz ich profil aktywności w surowicy w warunkach normalnych. Niewielkie ilości izoenzymu jelitowego (*) są wykrywane w surowicy osób z grupą krwi 0 i B

Aktywność ALP w surowicy ludzi zdrowych jest prawie w 50% pochodzenia wątrobowego, a pozostała część pochodzi z kości, przy czym wzajemne stosunki tych dwóch pul ALP zmieniają się z wiekiem. U ludzi z grupą krwi B lub O niewielka część ALP w surowicy jest pochodzenia jelitowego. Sytuacje kliniczne, w których dochodzi do wzrostu aktywności ALP w surowicy przedstawiono w tabeli 3.2.

Aktywność fosfatazy alkalicznej jest często oznaczana, gdyż wchodzi w skład wielu narządowych profili diagnostycznych. Nierzadko można zaobserwować podwyższone wartości aktywności ALP w surowicy bez objawów klinicznych charakterystycznych dla choroby kości oraz nieobecności zmian innych parametrów biochemicznych. W wyjaśnieniu takich przypadków niezbędne jest określenie narządowego pochodzenia ALP. Pomocnym w tym jest szereg technik takich jak: rozdział elektroforetyczny, pomiar odporności na denaturację temperaturową, pomiar aktywności w obecności szeregu inhibitorów, pomiar powinowactwa do lektyny, immunodetekcja.

Tabela 3.2. Przyczyny wzrostu aktywności fosfatazy alkalicznej w surowicy. GZWN: górny zakres wartości referencyjnych

• FIZJOLOGICZNE	• PATOLOGICZNE
- ciąża (ostatni trymester) - rozwój osobniczy - spożywanie pokarmów	często > 5xGZWR - choroba kości Paget'a - demineralizacja kości, krzywica - zastój żółci (wewnątrż- i zewnątrżwątrobowy) - marskość wątroby zazwyczaj < 5xGZWR - nowotwory kości - nerkozależna resorpcja kości - nadczynność przytarczyc - gojenie się złamań - zapalenie szpiku - wewnątrżwątrobowe zmiany rozrostowe - nowotwór naciekający wątrobę - żółtaczką - zapalenie jelit

3.6.2. Fosfataza kwaśna

Fosfataza kwaśna (EC 3.1.3.2) występuje podobnie jak ALP w postaci wielu izoenzymów i izoform enzymatycznych. Do grupy tej zalicza się wszystkie enzymy hydrolizujące estry fosforanowe i mające optimum aktywności w pH niż-

szym od 7.0. W komórce fosfataza kwaśna (ACP) zlokalizowana jest głównie w lizosomach, chociaż w wielu komórkach ACP można znaleźć również i w innych kompartmentach. Głównym źródłem ACP jest gruczoł krokowy, lecz znaczące ilości tego enzymu występują również w erytrocytach, płytkach krwi, szpiku, kościach (osteoklasty), śledzionie, nerkach, wątrobie i w jelicie. W osoczu występuje 5 izoenzymów ACP, przy czym 30% wszystkich izoenzymów stanowi izoenzym sterczowy (PAP). PAP (ang. *prostatic acid phosphatase*) jest izoenzymem ACP bardzo nietrwałym w temperaturach powyżej 37 °C i pH wyższym od 7.0. PAP można odróżnić od pozostałych izoenzymów ACP oznaczając aktywność ACP w obecności winianu, który jest silnym inhibitorem PAP, podczas gdy inne izoenzymy ACP są na ten związek niewrażliwe. Zmiany poziomu ACP w osoczu obserwuje się w chorobie Pageta, chorobach kości, szpiczaku, u chorych z przerzutami nowotworowymi do kości oraz u mężczyzn z rakiem stercza. Oznaczanie poziomu PAP ma pewne znaczenie kliniczne w diagnostyce raka stercza (monitorowanie skuteczności leczenia) zwłaszcza w sytuacjach, kiedy brak jest wyraźnych zmian poziomu antygenu sterczowego (PSA).

3.6.3. Aminotransferazy

W analityce enzymologicznej wykorzystuje się oznaczenia dwóch aminotransferaz: aminotransferazy alaninowej (EC 2.6.1.2) i aminotransferazy asparaginianowej (EC 2.6.1.1). W komórce aminotransferaza alaninowa (ALT) występuje w cytoplazmie, natomiast aminotransferaza asparaginianowa (AST) zlokalizowana jest w mitochondrium (izoenzym mitochondrialny) i cytoplazmie (izoenzym cytoplazmatyczny). Znane są dwa izoenzymy ALT, z których jeden (ALT1) kodowany jest przez gen położony na chromosomie 8 w pozycji 8q24.3. Gen dla drugiego izoenzymu (ALT2) znajduje się na chromosomie 16 w pozycji 16q12.1. Izoenzym mitochondrialny AST kodowany jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 16 w pozycji 16q21, natomiast gen dla izoenzymu cytoplazmatycznego AST znajduje się na chromosomie 10 w pozycji 10q24.1-q25.1. Obydwie aminotransferazy występują powszechnie w szeregu narządach. Jednakże poziom ALT w tkankach pozawątrobowych jest niski. Ponadto poziomy ekspresji obydwu izoenzymów ALT różnią się wyraźnie. I tak ALT1 występuje głównie w nerkach, wątrobie i sercu, natomiast znaczące ilości ALT2 znajdują się w mięśniach, tkance tłuszczowej i nerkach. W analityce enzymologicznej zjawisko występowania ALT w postaci izoenzymów nie znalazło jeszcze praktycznego zastosowania w diagnostyce, gdyż fakt istnienia tego enzymu w formie dwóch izoenzymów znany jest dopiero od 2002 roku. Ze względu na powszechność występowania, wzrost aktywności AST w surowicy obserwuje się praktycznie przy uszkodzeniu komórek każdego narządu. Bardzo znaczne wzrosty poziomu AST w surowicy, które nieraz przekraczają 100-krotnie górny zakres wartości referencyjnych (GZWR) obserwuje się w rozległych uszkodzeniach mięśni. Duży wzrost poziomu AST w surowicy ma miejsce również w zawale

mięśnia sercowego (10 x GZWR) oraz ostrych fazach chorób wątroby (10-20 x GZWR). Wzrostom aktywności AST w surowicy towarzyszy również wzrost aktywności ALT, lecz w znacznie mniejszym zakresie, co powoduje, że stosunek aktywności obu aminotransferaz odpowiada w przybliżeniu stosunkowi tych enzymów w komórkach narządu, który uległ uszkodzeniu. Z uwagi na brak specyficzności narządowej analiza poziomu aminotransferaz w surowicy ma ograniczoną użyteczność kliniczną. Wyjątkiem są choroby wątroby, w których analiza zmian poziomu aminotransferaz w surowicy może być pomocna w różnicowaniu poszczególnych stanów patologicznych wątroby. W wirusowym zapaleniu wątroby i innych chorobach związanych z ostrą martwicą hepatocytów aktywności obu aminotransferaz w surowicy mogą wzrosnąć nawet 100-krotnie, chociaż zazwyczaj obserwuje się wzrosty rzędu 10-40-razy powyżej WR, przy czym poziom aktywności ALT dorównuje lub przekracza poziom AST. W przewlekłych chorobach wątroby (marskość, zastój w krążeniu wrotnym, cholestaza) obserwuje się umiarkowany (2-5 x WR) wzrost poziomu aminotransferaz, ale wzrost poziomu AST w surowicy jest wyższy niż ALT.

3.6.4. *Gamma-glutamylotransferaza*

Gamma-glutamylotransferaza (CE 2.3.2.2) jest enzymem związanym z błonami siateczki śródplazmatycznej komórek nabłonka dróg żółciowych, wątroby, trzustki, jelita i nerki. Gen kodujący ten enzym znajduje się na chromosomie 22 w pozycji 22q11.23. Wzrost aktywności gamma-glutamylotransferazy (GGT) obserwuje się w ostrych i przewlekłych chorobach wątroby. Pomiar GGT stanowi czuły wskaźnik stanu wątrobowych dróg żółciowych. GGT jest przykładem enzymu, którego poziom w surowicy może być indukowany przez szereg związków. Wzrost GGT w surowicy obserwuje się u ludzi przyjmujących barbiturany, leki przeciwpadaczkowe (fenytoina), estrogeny, a także po spożyciu dużych ilości alkoholu (u 70% osób). W sytuacjach tych, wzrost GGT w surowicy nie jest następstwem uszkodzenia komórek, lecz wynikiem wzrostu biosyntezy enzymu w komórce. Pomiar aktywności GGT w surowicy pozwala kontrolować utrzymywanie abstynencji przez alkoholików podczas terapii odwykowej.

3.6.5. *Dehydrogenaza mleczanowa*

Dehydrogenaza mleczanowa (EC 1.1.1.27) jest tetramerem utworzonym przez dwie podjednostki H (B) i M (A), z których każda kodowana jest przez osobny gen. Gen kodujący podjednostkę H zlokalizowany jest na chromosomie 12 w pozycji 12p12.1-p12.2, a gen dla podjednostki M leży w obrębie chromosomu 11 w pozycji 11p15.4. Połączenie tych dwóch rodzajów podjednostek w strukturę tetramery prowadzi w rezultacie do utworzenia pięciu izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej (LDH). LDH zlokalizowana jest w cytoplazmie

każdej komórki organizmu, przy czym stosunki ilościowe poszczególnych izoenzymów LDH są cechą charakterystyczną danego typu komórki. Wszystkie pięć izoenzymów LDH obecne jest w surowicy zdrowych osób. Poza pięcioma powszechnie występującymi izoenzymami LDH istnieje szósty izoenzym LDH-C₄ (LDH-X), który zlokalizowany jest wyłącznie w jądrach i plemnikach. Gen kodujący podjednostkę C umiejscowiony jest na chromosomie 11 w pozycji 11p15.5-p15.3. Do ekspresji LDH-C₄ dochodzi po osiągnięciu dojrzałości płciowej. W plemnikach LDH-C₄ zlokalizowany jest na powierzchni komórki (10%), w cytoplazmie (80%) oraz mitochondrium (10%).

Stężenie LDH w komórce jest kilkaset razy wyższe niż w surowicy, dlatego wypływ enzymu, nawet z niewielkiej liczby uszkodzonych komórek prowadzi do istotnego wzrostu poziomu LDH w surowicy. Z uwagi na to, iż poszczególne izoenzymy LDH różnią się między sobą właściwościami (różnice w powinowactwie i specyficzności substratowej, inna ruchliwość elektroforetyczna) możliwe jest oznaczenie poziomu poszczególnych izoenzymów w surowicy. Ocena stosunku izoenzymów LDH w surowicy może być pomocna w identyfikacji uszkodzonej tkanki. Z uwagi na charakterystyczny profil izoenzymów LDH w mięśniu sercowym (głównie LDH₁, LDH₂) oznaczanie LDH dawniej wykorzystywano w diagnostyce zawału mięśnia sercowego, lecz ze względu na późny czas, w którym dochodzi do zmian poziomu LDH w surowicy obecnie test ten nie jest używany. Pewne znaczenie diagnostyczne ma oznaczanie izoenzymu LDH-C₄ w płynie nasiennym mężczyzn z oligospermią poddanych terapii testosteronowej. U pacjentów odpowiadających pozytywnie na leczenie testosteronem obserwuje się wzrost aktywności LDH-C₄ przed wzrostem liczby plemników, co pozwala wyselekcjonować grupę osób, w stosunku, do których terapia może zakończyć się sukcesem. Z kolei u pacjentów z azoospermią, wysoka aktywność LDH-C₄ w płynie nasiennym wskazuje na zachowaną normalną spermatogenezę i może być przesłanką do wdrożenia terapii hormonalnej z uwagi na duże prawdopodobieństwo pozytywnej odpowiedzi.

3.6.6. *Kinaza kreatynowa*

Kinaza kreatynowa (EC 2.7.3.2) jest białkiem enzymatycznym składającym się z dwóch podjednostek M i B kodowanych przez różne geny. Gen dla podjednostki M zlokalizowany jest na chromosomie 19 w pozycji 19q13.2-q13.3, a podjednostka B kodowana jest przez gen położony na chromosomie 14 w pozycji 14q32. Z uwagi na dimeryczną strukturę kinazy kreatynowej (CK) występuje ona w postaci trzech izoenzymów (MM, MB, BB). CK katalizuje reakcję fosforylacji kreatyny (Cr), w której donorem grupy fosforanowej jest ATP. Fosfokreatyna stanowi rezerwę energetyczną komórek mięśniowych, które podczas skurczu zużywają ją na odtworzenie ATP z ADP, przy czym reakcja ta jest 2-6 razy szybsza niż reakcja fosforylacji Cr. Największe aktywności CK występują w mięśniach szkieletowych, mózgu i sercu. Znacznie mniejsze poziomy CK

stwierdza się również w innych narządach, takich jak żołądek, okrężnica, jelito cienkie, pęcherzyk żółciowy, nerki, a także w śladowych ilościach w wątrobie. Zawartość poszczególnych izoenzymów jest cechą charakterystyczną dla danego narządu. W mózgu występuje wyłącznie izoenzym BB, podczas gdy w mięśniach szkieletowych 95% całkowitej ilości CK stanowi izoenzym MM, a pozostałe 5% to izoenzym MB. W kardiomiocytach izoenzymy CK-MM i CK-MB stanowią odpowiednio 60% i 40% całkowitej ilości CK. W osoczu ludzi zdrowych występuje prawie wyłącznie izoenzym CK-MM (95% całkowitej aktywności) przy całkowitym braku izoenzymu CK-BB. Nawet przy dużych uszkodzeniach mózgu w osoczu obserwuje się tylko minimalne poziomy CK-BB. Wzrost aktywności CK w osoczu jest zazwyczaj wynikiem uszkodzenia mięśni szkieletowych lub mięśnia sercowego (tab. 3.3).

Z uwagi na odmienny profil izoenzymatyczny CK w mięśniu szkieletowym i mięśniu sercowym możliwe jest, poprzez pomiar izoenzymów CK rozróżnienie z jakiego rodzaju komórek mięśniowych pochodzi obserwowany wzrost CK w osoczu. Stwierdzenie większej niż 5% zawartości izoenzymu CK-MB w całkowitej puli aktywności CK w osoczu, wskazuje na pochodzenie enzymu z mięśnia sercowego. Do identyfikacji i pomiaru poszczególnych izoenzymów CK w osoczu wykorzystuje się z reguły szereg metod immunologicznych, rzadko metodę rozdzielu elektroforetycznego. Do niedawna oznaczanie CK w osoczu miało duże znaczenie w diagnostyce zawału mięśnia sercowego.

Tabela 3.3. Przyczyny wzrostu poziomu aktywności kinazy kreatynowej w surowicy. WR; wartości referencyjne

<i>często >10 x WR</i>	<i>zazwyczaj <5 x WR</i>
- zapalenie wielomięśniowe - rozpad mięśni prądkowanych (np. uraz, złośliwa hiperpireksja) - dystrofia mięśniowa Duchenne'a - zawał mięśnia sercowego	- fizjologiczne (rasa czarna) - niedoczynność tarczycy - przyjmowanie leków (statyny)
5-10 x WR	
- zabiegi chirurgiczne - uraz mięśni szkieletowych - ciężki wysiłek fizyczny - napady padaczkowe - zapalenie mięśni - nosiciel dystrofii mięśniowej Duchenne'a	

Obecnie, z uwagi na wprowadzenie procedury udrażniania tętnic wieńcowych we wczesnych fazach zawału mięśnia sercowego, kiedy nie dochodzi jesz-

cze do powstania rozległego ogniska martwiczego i powszechne użycie oznaczania troponiny T lub I (patrz niżej), oznaczanie poziomu CK w osoczu straciło znaczenie w klinicznej diagnostyce zawału. Wynika to z relatywnie późnego wzrostu aktywności CK w osoczu, której maksymalny poziom obserwuje się w 12-24 godzinie po zawale. W pierwszych 6 godzinach po zawale serca poziom CK-MB w osoczu jest nieznacznie podwyższony tylko u 30% chorych. Oznaczanie poziomu CK w osoczu pomocne jest w diagnostyce postępujących dystrofii mięśniowych. Aktywność CK wzrasta znacząco u niemowląt i dzieci (7-10 lat) chorych na dystrofię mięśniową. Wzrost ten często wyprzedza w czasie pojawienie się objawów klinicznych. Wraz z dorastaniem i utratą masy mięśniowej poziom CK w osoczu tych chorych maleje. W przypadku dystrofii Duchenne’a obserwuje się 3-6-krotnie podwyższony poziom CK w osoczu kobiet (50-80%) będących bezobjawowymi nosicielkami zmutowanego genu dystrofiny. U osób tych często obserwuje się normalny poziom CK, jeżeli krew do badań została pobrana w okresie braku aktywności fizycznej.

3.6.7. *Amylaza*

α -Amylaza (EC 3.2.1.1) jest enzymem hydrolizującym wiązania 1,4- α -glikozydowe w wielocukrach (amyloza, amylopektyna, glikogen). Amylaza (AMY) jest małym białkiem (54-62 kDa), które występuje w formie wielu izoenzymów i izoform. Geny kodujące 5 znanych izoenzymów AMY zlokalizowane są na chromosomie 1 w regionie 1p21. Izoenzymy AMY podlegają również potranslacyjnym modyfikacjom polegającym na glikozylacji, deglikozylacji i deamidacji, co prowadzi do powstania szeregu izoform. Najwyższe stężenie AMY występuje w śliniankach, gdzie zlokalizowane są trzy izoenzymy (AMY1A, AMY1B, AMY1C) zaliczane do typu S-AMY. S-AMY wydzielana jest do śliny i światła przełyku, gdzie hydrolizuje skrobię, a po dotarciu do żołądka ulega dezaktywacji w kwaśnym pH. Drugim istotnym źródłem AMY jest trzustka, w której występują dwa izoenzymy (AMY2A, AMY2B) określane mianem typu P-AMY. Izoenzymy typu P wydzielane są do jelit. Niższe poziomy AMY występują również w jądrach, jajnikach, jajowodzie, mięśniach prąkowanych, płucach i tkance tłuszczowej. Niektóre rodzaje nowotworów (rak płuc, rak jajników) zawierają również znaczące poziomy AMY. W osoczu i moczu ludzi zdrowych występuje zarówno typ S jak i P izoenzymów AMY. Do identyfikacji i oznaczania poszczególnych izoenzymów AMY stosuje się szereg metod opartych na rozdziale elektroforetycznym białek, elektroogniskowaniu, chromatografii oraz metod immunologicznych i enzymatycznych z zastosowaniem specyficznych inhibitorów. W praktyce laboratorium analitycznego, tylko metody oparte o selektywną inhibicję poszczególnych izoenzymów AMY z udziałem monoklonalnych przeciwciał gwarantują otrzymanie wyników z zadawalającą czułością, specyficznością i szybkością. Wzrost aktywności AMY w osoczu

obserwuje się w ostrym zapaleniu trzustki i zapaleniu ślinianek oraz chorobach układu pokarmowego i nerek (tab. 3.4).

Z powodu małych rozmiarów AMY swobodnie przechodzi przez kłębuszki nerkowe, dlatego jest jedynym enzymem osoczym obecnym również w moczu zdrowych osób. W większości przypadków badanie AMY w moczu nie przynosi dodatkowych korzyści diagnostycznych w porównaniu do oznaczeń AMY w surowicy. Oznaczenia AMY w moczu są pomocne w rozpoznaniu makroamylazemii. W tej rzadkiej chorobie obserwuje się wzrost poziomu AMY w osoczu przy obniżonym lub niezmiennym wydalaniu jej z moczem. Powodem tego jest powstawanie kompleksów enzymu z immunoglobulinami, które ze względu na duże rozmiary nie są filtrowane przez kłębuszki nerkowe do moczu.

Tabela 3.4. Przyczyny wzrostu poziomu aktywności amylazy w surowicy

często >10 x WR
- ostre zapalenie trzustki
> 5 x WR
- perforacja wrzodów dwunastnicy
- niedrożność jelit
- inne ostre zaburzenia brzuszne
- ostra niewydolność nerek
- cukrzycowa kwasica ketonowa
- uszkodzenie jajowodu
zazwyczaj <5 x WR
- choroby ślinianek (zatkanie przewodu, zapalenie)
- przewlekła niewydolność nerek
- makroamylazemia
- przyjmowanie morfiny

3.6.8. Lipaza

Lipaza (EC 3.1.1.3) jest sekrecyjnym enzymem hydrolizującym estry kwasów tłuszczowych i glicerolu (w pozycji 1 i 3), w wyniku czego dochodzi do

uwolnienia kwasów tłuszczowych z triglicerydów. Gen kodujący lipazę (LPS) zlokalizowany jest na 10 chromosomie w pozycji 10q26.1. LPS jest białkiem enzymatycznym zbudowanym z pojedynczego łańcucha aminokwasowego o masie 48 kDa. Ze względu na małą masę LPS swobodnie przechodzi przez błonę filtrującą kłębuszków nerkowych, lecz w kanalikach nerkowych podlega całkowitej resorpcji. Dlatego enzym ten nie występuje w moczu. Najwięcej LPS występuje w trzustce, gdzie stężenie tego enzymu jest nawet 5000 razy wyższe niż w jakimkolwiek innym narządzie. Gradient stężeń LPS między trzustką i osoczem u osób zdrowych wynosi w przybliżeniu 20 000. W związku z tym można się spodziewać, że większość lipazy w osoczu jest pochodzenia trzustkowego, a pozostała część pochodzi z żołądka, jelit, ślinianek oraz płuc. Oznaczanie LPS w osoczu jest używane w diagnostyce ostrego zapalenia trzustki. W niewydolności nerek, kiedy dochodzi do spadku filtracji kłębuszkowej, LPS nie jest usuwana z osocza, co prowadzi do wzrostu jej poziomu. Dlatego wyniki oznaczenia poziomu LPS u pacjentów z chorobami nerek muszą być interpretowane z ostrożnością. U osób przyjmujących opiaty poziom LPS w osoczu również może być podwyższony.

3.6.9. *Cholinesteraza*

Cholinesterazy są enzymami hydrolizującymi estry choline, w wyniku czego dochodzi do powstania kwasu tłuszczowego i choline. Zdolność do katalizowania tej reakcji wykazują dwa spokrewnione białka enzymatyczne.

Jednym z nich jest acetylocholinesteraza (EC 3.1.1.7), określana również mianem prawdziwej cholinesterazy lub esterazy cholinowej, której gen położony jest na chromosomie 7 w pozycji 7q22. Acetylocholinesteraza (AChE) występuje w erytrocytach, płucach, śledzionie, zakończeniach nerwów oraz istocie szarej mózgu.

Drugim enzymem hydrolizującym acetylocholinę jest hydrolaza acylocholinowa (EC3.1.1.8), nazywana również pseudocholinesterazą, cholinesterazą osoczną, butyrylocholinesterazą lub esterazą cholinową II. Pseudocholinesteraza (ChE) występuje w wątrobie, trzustce, sercu oraz istocie białej mózgu. W osoczu ludzi zdrowych ChE występuje w postaci szeregu form molekularnych utworzonych poprzez asocjację kilku jednostek ChE w jedną multimeryczną cząsteczkę. Poszczególne kompleksy ChE różnią się liczbą podstawowych jednostek enzymatycznych. Rozdział elektroforetyczny białek osocza daje w rezultacie od 7 do 12 prążków białkowych rozpoznawanych przez przeciwciała dla ChE. W osoczu niektórych osób nie wykazujących objawów chorobowych i uznawanych za zdrowe występuje ChE o obniżonym powinowactwie do acetylocholine. Jest to wynik zmienności genetycznej manifestującej się istnieniem wielu różnych form allelicznych genu dla ChE. Cztery główne formy to Eu, Ea, Ef, Es, których kombinacja prowadzi do wystąpienia jednego normalnego i dziewięciu nieprawidłowych genotypów. W sumie, znanych jest co najmniej 40 różnych odmian

genu dla ChE położonych w obrębie dwóch loci E1 i E2 na chromosomie 3 w pozycji 3q26.1-q26.2. Normalny genotyp oznaczony jest indeksem "u" (EuEu) i występuje on u większości ludzi (95% populacji). Wariant genu kodującego ChE z niską aktywnością i dużą opornością na hamowanie przez dibukainę oznaczany jest indeksem "a". U homozygot EaEa (0,05% populacji) aktywność ChE w osoczu jest znacząco obniżona. Gen oznaczony jako Ef koduje ChE o obniżonej aktywności podanej na inhibicję dibukainą, ale odpornej na hamowanie fluorkiem. Z kolei wariant genu oznaczany jako Es koduje ChE całkowicie pozbawioną aktywności enzymatycznej. Niektóre związki zwiotczające używane do znieczulenia (suksametonium, miwakurium) są substratami dla ChE, która je hydrolizuje i unieczynnia. Dlatego dawka tych leków jest podawana pacjentom w ilości odpowiedniej do rodzaju zabiegu z uwzględnieniem normalnie występującej aktywności ChE. Osoby z genetycznie uwarunkowaną niższą aktywnością ChE są bardziej wrażliwe na te leki, co może prowadzić do ich dłuższego działania i przedłużonego bezdechu. Dlatego u osób z historią rodzinną wykazującą przypadki nadwrażliwości na anestetyki powinno się przed zabiegiem wymagającym stosowania tego typu leków przeprowadzać badanie aktywności ChE w osoczu oraz jej wrażliwości na hamowanie przez dibukainę i fluorki.

Oznaczanie poziomu ChE w osoczu służy jako wskaźnik funkcji wątroby oraz wykorzystywane jest w diagnostyce zatruc związkami fosforoorganicznymi. Obniżenie aktywności ChE w osoczu, po wykluczeniu czynników genetycznych i działania znanych inhibitorów, wskazuje na upośledzenie funkcji wątroby. W ostrym zapaleniu wątroby obserwuje się spadek ChE w osoczu rzędu 30-50%. Większe spadki aktywności ChE w osoczu (50-70%) mają miejsce w marskości wątroby oraz przerzutach nowotworu do tego narządu. Poziom ChE nie zmienia się w żółtacze zastoinowej za wyjątkiem sytuacji, kiedy jest spowodowana nowotworem. Seryjne oznaczenia ChE w osoczu są wykonywane w trakcie monitorowania postępów leczenia oraz u pacjentów po przeszczepach wątroby jako wskaźnik przywrócenia funkcji tego narządu.

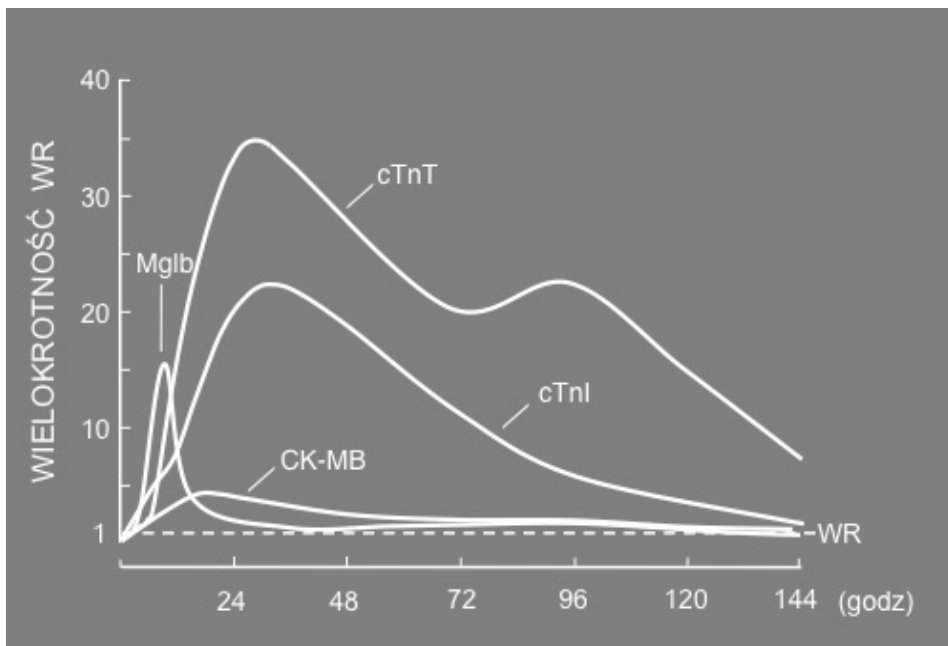
Aktywność ChE oraz AChE hamowana jest przez wiele związków fosforoorganicznych, w tym paration, sarin oraz pirofosforan czteroetylku, które wchodzi w skład środków owadobójczych. U osób ekspozowanych na te środki (często poprzez inhalację) dochodzi do spadku aktywności obu cholinesteraz, przy czym aktywność ChE w osoczu spada znacznie szybciej niż aktywność AChE w erytrocytach. 40% spadek aktywności ChE w osoczu wyprzedza kliniczne objawy zatrucia. Dopiero 80% obniżenie aktywności ChE w osoczu powoduje wystąpienie zaburzeń nerwowo-mięśniowych. Spadek aktywności ChE w osoczu do wartości bliskich zeru jest wskazaniem do natychmiastowego podania odpowiednich aktywatorów cholinesterazy (oksym aldehydu pirydynowego).

3.7. Enzymy i białka jako markery wybranych patologii narządowych

3.7.1. Zawał mięśnia sercowego

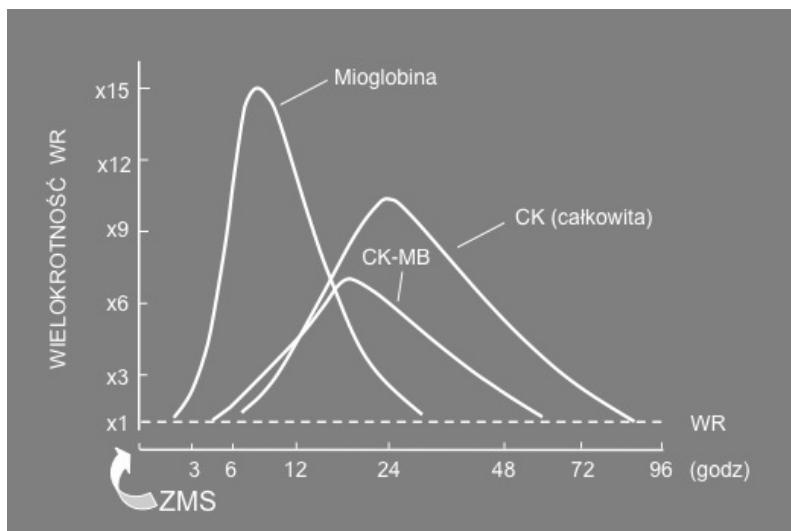
Niedokrwienie mięśnia sercowego powoduje zahamowanie przemian oksydacyjnych w kardiomiocytach i niedobory energetyczne prowadzące do szeregu zmian metabolicznych, czynnościowych i strukturalnych w sercu. Przyczyną niedokrwienia jest zmniejszenie lub całkowite zahamowanie przepływu wieńcowego spowodowane najczęściej przez zakrzep powstający na skutek pęknięcia blaszki miażdżycowej i/lub skurcz zgrubiałej ściany tętnicy wieńcowej. Rozmiar obszaru niedokrwionego zależy od wielkości naczynia, które uległo zamknięciu. Początkowo (1-2 godziny) zmiany powstające w niedokrwionym obszarze mają charakter odwracalny i w tym okresie nie dochodzi do znaczącego uszkodzenia komórek mięśnia sercowego. Przedłużająca się ischemia prowadzi początkowo do uszkodzenia struktur wewnątrzkomórkowych (2-6 godzina), a następnie zniszczenia komórek, co powoduje tworzenie się ognisk martwiczych w nieukrwionym obszarze mięśnia sercowego (6-9 godzina). W trakcie tego procesu do krwiobiegu uwalniane są białka kardiomiocytów, których stężenie w surowicy zmienia się w czasie przebiegu zawału mięśnia sercowego. Analiza stężenia tych białek w surowicy jest istotnym elementem diagnostyki zawału mięśnia sercowego i monitorowania jego leczenia (ryc. 3.7).

Analiza zmian poziomu izoenzymów LDH1 i LDH2 dehydrogenazy mleczanowej (HBDH), aminotransferazy asparaginianowej oraz aktywności kinazy kreatynowej była przez długie lata stosowana w diagnostyce zawału mięśnia sercowego, lecz obecnie oznaczenia te nie są już używane. Zostały one zastąpione przez oznaczanie poziomu mioglobiny, troponiny T lub I. Badanie masy izoenzymu MB kinazy kreatynowej w diagnostyce ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego nie jest zalecane ze względu na stosunkową małą swoistość i późny czas wystąpienia zmian. Pomimo tego w Polsce badanie to jest wykonywane w niektórych ośrodkach.



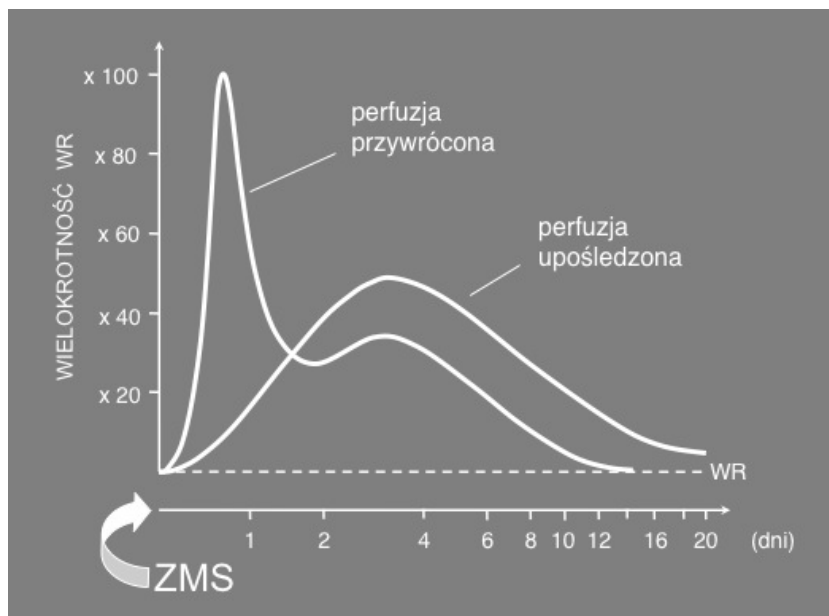
Ryc. 3.7. Zmiany poziomu izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CK-MB), mioglobiny (Mglb), sercowej troponiny T (cTnT) oraz sercowej troponiny I (cTnI) w surowicy podczas przebiegu zawału mięśnia sercowego.

Mioglobina jest małym białkiem (17,5 kDa) wiążącym tlen i występującym zarówno w mięśniu sercowym jak i mięśniach szkieletowych, przy czym w porównaniu do mięśni szkieletowych jej poziom w sercu jest niewysoki. Białko to nie jest zatem specyficznym markerem dla mięśnia sercowego. Ze względu na małą masę i lokalizację w pobliżu błony plazmatycznej, mioglobina uwalniana jest z niedotlenionych komórek jeszcze przed ich zniszczeniem. Znaczący wzrost poziomu mioglobiny w surowicy obserwuje się już w 1-2 godzinie od wystąpienia niedokrwienia mięśnia sercowego. Maksymalny wzrost stężenia tego białka osiągający 15-krotność wartości normalnych występuje zazwyczaj w 6-8 godzinie zawału. Chociaż wzrost stężenia mioglobiny w surowicy nie jest specyficznym wskaźnikiem niedotlenienia mięśnia sercowego, to obserwuje się go u 100% osób między 3 i 5 godziną zawału serca. Dla porównania, maksymalny wzrost masy CK-MB ma miejsce dopiero w 12-15 godzinie od wystąpienia niedokrwienia. Dlatego wzrost poziomu mioglobiny w surowicy jest wczesnym i czułym markerem niedotlenienia mięśnia sercowego, chociaż nie jest to marker swoisty. Poziom mioglobiny w surowicy wraca do wartości normalnych pod koniec pierwszej doby od wystąpienia zawału. Poziom referencyjny (poziom odcięcia) dla mioglobiny w surowicy wynosi 80 $\mu\text{g/L}$ i zależy od wieku oraz płci.



Ryc. 3.8. Przebieg zmian poziomu mioglobiny i kinazy kreatynowej w surowicy podczas zawału mięśnia sercowego (ZMS)

W strukturze włókna mięśnia sercowego, podobnie jak w innych mięśniach, wyróżnić można filamenty cienkie i grube, przy czym te ostatnie zbudowane są z miozyny, natomiast aktyna, tropomiozyna i trzy rodzaje troponiny tworzą filamenty cienkie. Struktury troponinowe zbudowane są z troponiny T (TnT), troponiny I (TnI) oraz troponiny C (TnC) i występują tylko w mięśniach prążkowanych i mięśniu sercowym. Izoformy TnT i TnI obecne w sercu różnią się od izoform tego białka w innych mięśniach. Troponiny są małymi białkami o masach 18-37 kDa, które tworzą kompleks będący elementem regulatorowym aparatu kurczliwego. Tylko niewielka ilość TnT (5%) występuje w stanie wolnym w cytoplazmie kardiomiocytów. Dzięki niewielkim rozmiarom pula rozpuszczalnej TnT uwalniana jest z komórek na wczesnych etapach niedotlenienia. W okresie 4-5 godzin od wystąpienia niedokrwienia poziom TnT w osoczu wzrasta 5-krotnie w stosunku do wartości normalnych. Rozwój obszaru martwiczego związany z rozpadem aparatu kurczliwego i obumieraniem kardiomiocytów prowadzi do masywnego uwolnienia białek strukturalnych, w tym troponiny T. W okresie między 2-4 dniem od wystąpienia niedokrwienia obserwuje się 40-60-krotny wzrost poziomu TnT w osoczu, który spada do wartości normalnych po 8-10 dniach. Ze względu na długi czas utrzymywania się podwyższonego stężenia TnT w surowicy oznaczanie poziomu TnT wyparło stosowane dotąd badanie LDH (LDH1, LDH2) dla diagnostyki pacjentów z podejrzeniem wystąpienia epizodu niedokrwienego w czasie ostatnich kilku dni przed kontaktem z lekarzem.

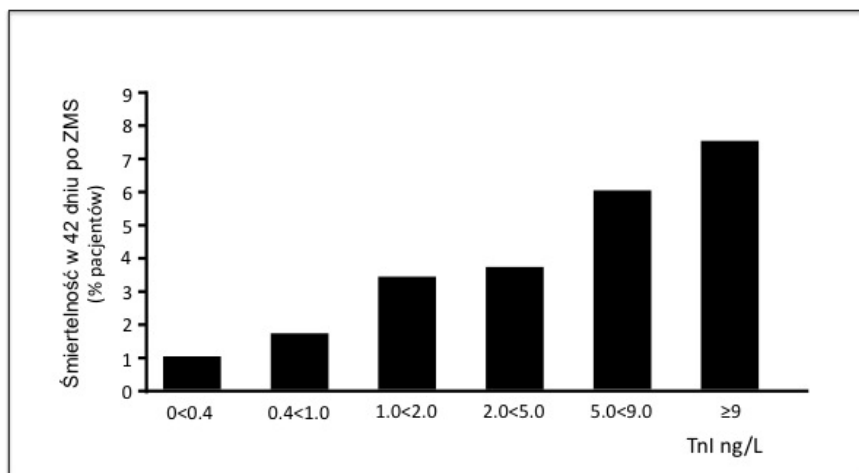


Ryc. 3.9. Przebieg zmian poziomu troponiny T w zależności od skuteczności terapii trombolitycznej

W oparciu o analizę zmian stężenia TnT w surowicy można między innymi wnioskować o skuteczności terapii trombolitycznej. Przywrócenie przepływu krwi w niedrożnym naczyniu powoduje wymycie nagromadzonej TnT i gwałtowny wzrost jej poziomu w osoczu, który w 90 minucie powinien osiągnąć wartości 6 razy wyższe od wyjściowych. Stanowi to nieinwazyjny wskaźnik sukcesu terapeutycznego. Wzrost ten może osiągać nawet wartości 100-krotnie przewyższające poziom normalny i jest on wyższy od poziomu TnT w 3-4 dobie. Brak dwufazowego przebiegu zmian stężenia TnT w surowicy świadczy o niepowodzeniu terapii trombolitycznej (ryc. 3.9).

Czułym i swoistym testem uszkodzenia miokardium jest również badanie poziomu TnI. Jej stężenie w przebiegu zawału mięśnia sercowego wzrasta nieco później niż stężenie TnT i osiąga pod koniec pierwszej doby wartość maksymalną równą 40-50-krotności poziomu normalnego. Podwyższony poziom TnI zaczyna spadać w trzeciej dobie i osiąga wartości normalne w 5-6 dniu. Zaletą oznaczeń troponin w stosunku do badania masy CK-MB w zawałe mięśnia sercowego jest ich wartość rokownicza, której brakuje w przypadku oznaczeń enzymatycznych. W oparciu o wysokość poziomu troponin możliwa jest ocena ryzyka zgonu pacjenta, co pomaga w doborze sposobu opieki nad pacjentem (leczenie szpitalne lub wizyty w przychodni) oraz w doborze terapii (blokerы płytkowych receptorów dla glikoprotein IIb/IIIa, aspiryna, niskocząsteczkowe heparyny, rewaskularyzacja). Wiele obserwacji klinicznych wskazuje, że wdrożenie leczenia farmakologicznego w oparciu o poziomy troponin u pacjentów

z zawałem mięśnia sercowego znacząco obniża ryzyko zgonu i prowadzi do optymalizacji kosztów leczenia.



Ryc. 3.10. Związek między poziomem troponiny I, a zwiększonym ryzykiem zgonu pacjentów po zawałe mięśnia sercowego (ZMS)

Analiza poziomu TnT pomocna jest w diagnostyce niestabilnej choroby wieńcowej i pozwala na wyodrębnienie pacjentów szczególnie zagrożonych zawałem mięśnia sercowego, którzy wymagają interwencji chirurgicznej ($\text{TnT} \geq 0,03 \mu\text{g/L}$). Obserwacje kliniczne wskazują, że ryzyko zawału serca dla pacjentów z poziomem $\text{TnT} < 0,03 \mu\text{g/L}$ nie zależy od sposobu leczenia (inwazyjne, farmakologiczne).

3.7.2. Choroby wątroby

Wczesna diagnostyka kliniczna chorób wątroby czasami następuje z trudnością, gdyż zdarza się, że pomimo patologicznych zmian, funkcja tego narządu pozostaje zachowana. Dużą pomocą w postępowaniu diagnostycznym w takich przypadkach jest analiza zmian aktywności enzymów w osoczu.

Diagnostyka laboratoryjna chorób wątroby opiera się na wykorzystaniu pomiarów czterech enzymów, tj. AST, ALT, ALP i GGT. Czasami używa się również oznaczeń dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Chociaż ALT i GGT obecne są również w innych narządach (najwięcej GGT w nerkach), to ich poziom w osoczu determinowany jest głównie uwalnianiem z wątroby. AST i LDH poza wątrobą obecne są w wielu narządach, dlatego nie są one specyficznymi markerami wątrobowymi. ALP znajduje się w wielu tkankach, lecz w osoczu występują głównie izoformy ALP z kości i wątroby.

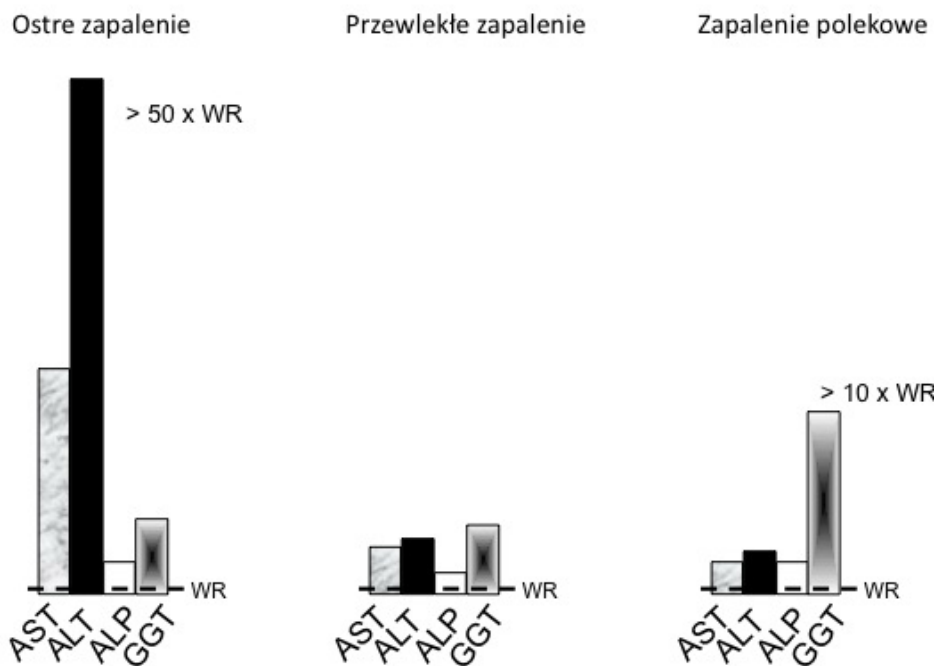
ALT, AST i LDH są enzymami cytoplazmatycznymi, więc uwalniane są z uszkodzonej komórki relatywnie wcześnie. W hepatocytach również występują izoenzymy ALT i AST, które zlokalizowane są w mitochondrium. W przypadku ALT, pula izoenzymu mitochondrialnego jest bardzo mała, a okres jego półtrwania w osoczu jest bardzo krótki. Z kolei izoenzym mitochondrialny AST stanowi znaczącą część całkowitej puli tego enzymu w hepatocytach. ALP i GGT są enzymami błonowymi, które zlokalizowane są na zewnętrznej stronie błony luminalnej hepatocytów.

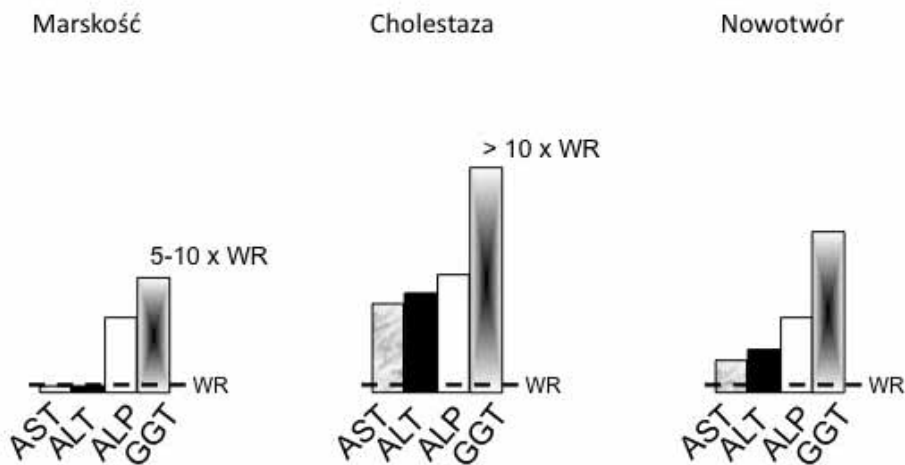
Stany zapalne wątroby z ogniskami martwiczymi prowadzą do wzrostu poziomu ALT i AST w osoczu, przy czym wzrost AST pochodzi od izoenzymu cytoplazmatycznego, natomiast stanom tym nie towarzyszy istotna zmiana aktywności ALP i GGT. Wzrost ekspresji mitochondrialnej AST i jej eksport na zewnątrz hepatocytów indukowany jest przez alkohol, dlatego w alkoholowym zapaleniu wątroby, poza dużym wzrostem aktywności GGT, obserwuje się wzrost poziomu mitochondrialnej AST w surowicy. Mechanizmy uwalniania z hepatocytów enzymów błonowych (GGT, ALP) nie są do końca poznane. Wiadomo, że w niektórych chorobach wątroby dochodzi do wzrostu syntezy GGT i ALT, lecz proces uwolnienia enzymu związanego z błoną plazmatyczną do osocza nie jest jeszcze dokładnie poznany. W osoczu pacjentów z cholestazą wątrobową obserwuje się pojawienie fragmentów błon hepatocytów bogatych w białka ALP i GGT. Przypuszcza się, że kwasy żółciowe, które mają właściwości detergentu mogą wymywać białka błonowe z hepatocytów.

Choroby wątroby mogą być wywołane przez czynniki egzogenne (związki chemiczne, wirusy i bakterie) i endogenne (zastój żółci, przerzuty nowotworu). Najbardziej znanymi związkami chemicznymi uszkadzającymi wątrobę są czterochlorek węgla i acetaminofen (paracetamol), które w małych ilościach są efektywnie metabolizowane przez wątrobę, ale przy większych stężeniach dochodzi do nagromadzenia się toksycznych metabolitów niszczących hepatocyty. Rozpad hepatocytów związany jest z masowym uwalnianiem enzymów. Niektóre toksyny pochodzenia naturalnego (rośliny, grzyby) również prowadzą do ciężkich uszkodzeń wątroby. Najczęstszym zatruciem jest zatrucie amanityną pochodzącą z muchomora sromotnikowego (*Amanita phalloides*), który mylony jest często z innymi grzybami jadalnymi. Spożycie nawet niewielkiej ilości tego grzyba prowadzi do ciężkiego uszkodzenia wątroby. W osoczu osób zatrutych amanityną dochodzi do ponad 20-krotnego wzrostu ALT w ciągu pierwszych 24 godzin od spożycia muchomora. Wzrost ALT w tym czasie przewyższa wzrost poziomu AST. W okresie tym nie obserwuje się jeszcze znaczących zmian poziomu bilirubiny, której poziom zaczyna wzrastać w trzeciej dobie.

Ostre zapalenie wątroby najczęściej wywoływane jest przez czynniki biologiczne. Przebieg wirusowego zapalenia wątroby zależy od typu wirusa (A, B, C, D) ma bardziej lub mniej ciężki przebieg, lecz we wszystkich tych stanach obserwuje się w początkowej-ostrej fazie choroby wzrost poziomu aminotransferaz, który wyprzedza pojawienie się żółtaczki. Aktywność AST może wzrastać

5-100 razy a ALT 3-100 razy powyżej ich górnych poziomów referencyjnych. W okresie tym obserwuje się niewielki wzrost GGT w surowicy, lecz rzadko dochodzi do wzrostu poziomu ALP. W stanach przewlekłych (WZW B, WZW C), poziom aminotransferaz i GGT w surowicy utrzymuje się na podwyższonym poziomie (2-3-krotność wartości normalnych). Niewielkie zwiększenie aktywności aminotransferaz z towarzyszącym wzrostem ALP i GGT obserwuje się u pacjentów z cholestazą wątrobową. Inne choroby przewlekłe, jak marskość wątroby lub rozwój nowotworu charakteryzują się brakiem zmian aktywności aminotransferaz w surowicy, przy jednoczesnym podwyższonym poziomie aktywności ALP i GGT (ryc. 3.11). Należy pamiętać, że w zależności od etiologii, rozległości i czasu trwania choroby, obok zmian enzymologicznych występuje wiele zmian parametrów laboratoryjnych, które są omawiane w innych rozdziałach takich jak hiperbilirubinemia, hipoalbuminemia, hipergammaglobulinemia, niedobory wątrobowych czynników krzepnięcia, wzrost stężenia markerów nowotworowych, antygenów i przeciwciał przeciw wirusom zapalenia wątroby i wiele innych.





Ryc. 3.11. Poziomy enzymów w surowicy w chorobach wątroby

3.7.3. Choroby trzustki

Ostre zapalenie trzustki jest czasami trudne do zdiagnozowania ze względu na podobieństwo objawów występujących w ostrych stanach brzucha, takich jak perforacja wrzodu żołądka i jelit, niedrożność jelit, niedrożność dróg żółciowych. W różnicowaniu tych stanów pomocne jest łączne oznaczanie poziomu LPS i AMY.

W przebiegu ostrego zapalenia trzustki poziom AMY w osoczu zaczyna wzrastać w ciągu 5-8 godzin od wystąpienia objawów (maksimum w 12 godzinie) i następnie wraca do wartości normalnych po upływie 3-4 dni. W moczu obserwuje się większy wzrost AMY, który utrzymuje się dłużej niż w osoczu. Z uwagi na to, iż do wzrostu AMY dochodzi również w innych chorobach przewodu pokarmowego, oznaczanie całkowitej aktywności AMY w celu potwierdzenia zapalenia trzustki ma niską wartość diagnostyczną. Specyficzność diagnostyczna oznaczeń AMY w zapaleniu trzustki znacznie rośnie, kiedy oznaczane są izoenzymy AMY typu P. Przy zastosowaniu punktu odcięcia na poziomie całkowitej aktywności AMY, większej lub równej trzykrotnej wartości górnej granicy zakresu normy, oznaczenie izoenzymów typu P-AMY daje ponad 90% specyficzność dla diagnostyki ostrego zapalenia trzustki. Ponadto u 80% pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki poziom P-AMY w osoczu pozostaje podwyższony przez okres 7 dni, podczas gdy tylko u 30% pacjentów można po tym czasie stwierdzić zwiększony poziom całkowitej aktywności AMY. Innym

białkowym, bardziej specyficznym i czułym markerem zapalenia trzustki jest wzrost poziomu białka elastazy 1 w surowicy.

Specyficzność diagnostyczną oznaczeń całkowitej aktywności AMY w ostrym zapaleniu trzustki można również poprawić przez jednoczesne oznaczanie aktywności LPS. Wzrost poziomu LPS w osoczu obserwuje się w 4-8 godzinie od wystąpienia objawów (maksimum w 24 godzinie) i wraca on do wartości normalnych w ciągu 8-14 dni. W ostrym zapaleniu trzustki poziom LPS w osoczu może często osiągać wielkość 50-krotnie przekraczającą górną granicę wartości normalnych. Czułość i specyficzność tego parametru mieści się w granicach 80-100%. Jednak wielkość wzrostu aktywności LPS w osoczu nie zawsze pozostaje w związku z przebiegiem zapalenia.

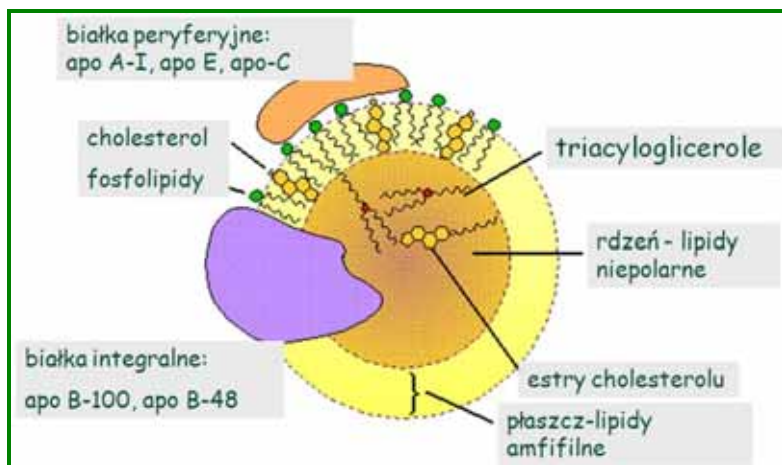
Spadek poziomu P-AMY w osoczu poniżej dolnej granicy wartości normalnych wskazuje na niewydolność wydzielniczą trzustki. Obserwacja ta może być podstawą do stwierdzenia upośledzonej funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki i może zastąpić testy inwazyjne. Trzeba pamiętać, że normalny poziom P-AMY w osoczu nie wyklucza obniżenia wydzielniczej funkcji trzustki. Pomocne w diagnozowaniu egzokrynnej niewydolności trzustki jest wykazanie obniżonego poziomu elastazy 1 w kale.

4. DIAGNOSTYKA ZABURZEŃ METABOLIZMU LIPOPROTEIN OSOCZA

Małgorzata Wróblewska

4.1. Lipidy i lipoproteiny

Tłuszcze (lipidy) to grupa substancji o różnej strukturze chemicznej, których wspólną cechą jest nierozpuszczalność w wodzie. Wehikułami umożliwiającymi transport lipidów we krwi są lipoproteiny - makromolekularne kompleksy złożone z lipidów oraz swoistych białek, zwanych apolipoproteinami (apo), charakteryzujących się wysokim powinowactwem do lipidów. W budowie cząstki lipoproteinowej można wyróżnić wewnętrzne „jądro” zawierające lipidy niepolarne (cholesterol zestryfikowany i triacyloglicerole), oraz zewnętrzny „płaszcz” zbudowany z lipidów amfifilnych (fosfolipidy, cholesterol niezestryfikowany).



Ryc. 4.1. Budowa cząstki lipoproteinowej

4.1.1. Frakcje lipoproteinowe

Lipoproteiny osocza dzieli się na kilka klas, różniących się gęstością właściwą, która jest wypadkową stosunku lipidów do białek w cząstkach lipoproteinowych (tab. 4.1, ryc. 4.2). Są to:

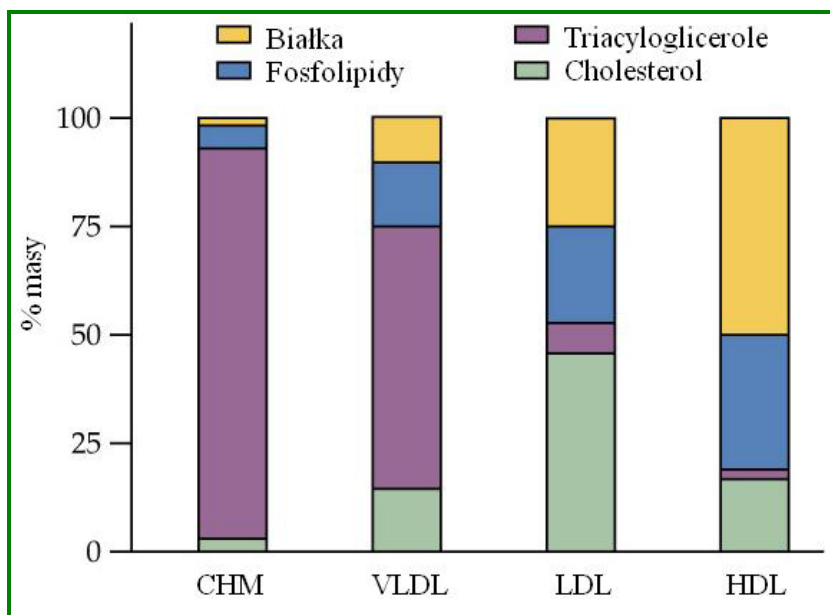
- chylomikrony - CHM,
- lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości - VLDL (ang. *Very Low Density Lipoproteins*),

- lipoproteiny o pośredniej gęstości - IDL (ang. *Intermediate Density Lipoproteins*),
- lipoproteiny o niskiej gęstości - LDL (ang. *Low Density Lipoproteins*),
- lipoproteiny o wysokiej gęstości - HDL - (ang. *High Density Lipoproteins*).

Tabela 4.1. Charakterystyka lipoprotein osocza

Klasa lipoprotein	Gęstość [g/ml]	Masa molowa $\times 10^6$	Stężenie we krwi [mg/dl]
CHM	<0,95	40-100	-*
VLDL	0,95-1,006	10-100	39-114
IDL	1,006-1,019	5-10	12-46
LDL	1,019-1,063	2-3	223-337
HDL	1,063-1,21	0,17-0,35	281-394

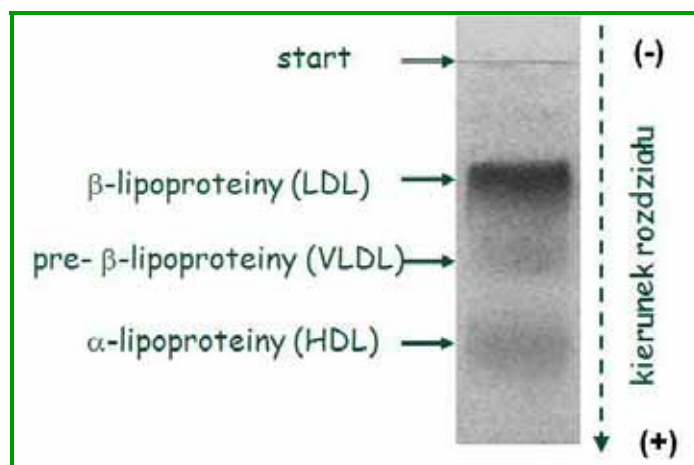
* Na czczo, w warunkach prawidłowego metabolizmu lipoprotein, chylomikrony nie są obecne we krwi.



Ryc. 4.2. Skład głównych klas lipoprotein osocza

Izolacja poszczególnych klas lipoprotein z osocza wymaga zastosowania czasochłonnej i drogiej, wieloetapowej procedury ultrawirowania. W laborato-

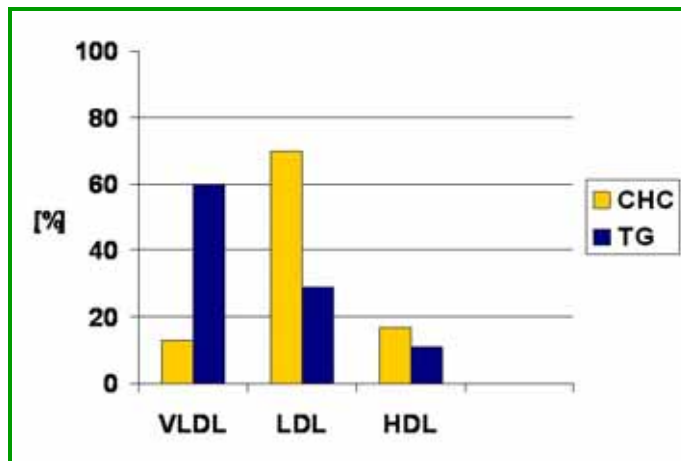
riach medycznych do oceny stanu lipoprotein osocza wykorzystuje się metodę elektroforezy w żelu agarozowym. Podczas wędrówki w polu elektrycznym poszczególne klasy lipoprotein rozdzielają się w zależności od ładunku powierzchniowego, na frakcje o ruchliwości określanej jako β , pre- β i α (ryc. 4.3). Rozdział taki pozwala jedynie na jakościową ocenę frakcji lipoproteinowych osocza. Sposób nazewnictwa oparty na ruchliwości lipoprotein w żelu agarozowym jest powszechnie stosowany w definiowaniu zaburzeń metabolizmu lipoprotein.



Ryc. 4.3. Prawidłowy rozdział lipoprotein osocza w warunkach na czczo, w żelu agarozowym

Główne lipidy transportowane przez lipoproteiny to triacyloglicerole (TG), cholesterol (CH) i fosfolipidy (FL) (ryc. 4.2). Udział poszczególnych klas lipoprotein w transporcie lipidów przez osocze jest wypadkową ich stężenia we krwi oraz składu lipidowego. W prawidłowych warunkach, na czczo, VLDL są głównymi transporterami TG, natomiast LDL transportują większość CH (ryc. 4.4). Zmiany stężeń lipidów z reguły odzwierciedlają zmiany stężeń lipoprotein, ale zmiany jakościowe lipoprotein też mogą wpływać na obraz lipidów we krwi.

W prawidłowych warunkach stężenie IDL jest bardzo niskie w porównaniu do innych frakcji lipoproteinowych (tab. 4.1) i nie jest brane pod uwagę w ocenie stanu lipoprotein osocza, jednakże w niektórych hiperlipidemiach stężenie IDL może istotnie wzrastać i wpływać na stężenia lipidów. Zwiększoną ilość frakcji pośrednich można wykryć wykonując elektroforezę lipoprotein w żelu agarozowym.



Ryc. 4.4. Udział frakcji lipoproteinowych w transporcie lipidów w osoczu, w prawidłowych warunkach, na czczo

4.1.2. Apolipoproteiny

Skład białkowy poszczególnych frakcji lipoproteinowych jest zróżnicowany (tab. 4.2). Podstawowe funkcje apolipoprotein obejmują:

- udział w syntezie cząstek lipoproteinowych (białka strukturalne: apo B-48, apo B-100, apo A-I),
- aktywację/inhibicję enzymów biorących udział w przemianach lipoprotein w osoczu (apo A-I, apo C-II),
- interakcję z receptorami lipoprotein na błonach komórkowych (apo B-100, apo E, apo A-I).

Niektóre apolipoproteiny pełnią więcej niż jedną z powyższych funkcji (np. apo A-I).

Apo B-48 i apo B-100 są produktami tego samego genu. Synteza apo B-48 ma miejsce w jelicie, gdzie w trakcie transkrypcji genu apo B do mRNA wprowadzany jest kodon stop i w rezultacie powstaje białko o masie 241 kDa. Apo B-48 cechuje się zdolnością wiązania bardzo dużych ilości TG. Transkrypcja genu apo B w wątrobie przebiega w całości i powstaje białko o masie 512 kDa, zdolne nie tylko do wiązania dużych ilości TG, ale posiadające także sekwencje rozpoznawane przez receptory LDL.

Tabela 4.2. Skład białkowy frakcji lipoproteinowych i najważniejsze funkcje apolipoprotein

Apo -	% białka we frakcji				Funkcje
	CHM	VLDL	LDL	HDL	
A-I	7	<1	<1	64	Aktywacja LCAT, budowa HDL, transport powrotny cholesterolu
A-II	5	-	-	20	?
A-IV	14	-	-	?	Aktywacja LCAT, transport powrotny cholesterolu?
B-48	19	4	-	-	Sekrecja chylomikronów
B-100	-	32	80	-	Sekrecja VLDL, strukturalne białko LDL, receptorowy katabolizm LDL
C-I	11	3	<1	6	?
C-II	15	7	<3	1	Aktywacja lipazy lipoproteinowej
C-III	41	40	10	4	Inhibicja wątrobowego wychwytu chylomikronów i VLDL
E	10	13	5	2	Wątrobowy klirens cząstek resztkowych CHM i IDL

4.1.3. Enzymy i białka transportowe biorące udział w osoczym metabolizmie lipoprotein

Transport lipidów przez lipoproteiny związany jest z przemianami enzymatycznymi lipidów, katalizowanymi przez swoiste enzymy, wykazujące powinowactwo do określonych klas lipoprotein. Najważniejsze enzymy zaangażowane w osoczy metabolizm lipoprotein to:

- **acylotransferaza lecytynowo-cholesterolowa** (ang. *Lecithin: Cholesterol Acyltransferase*, LCAT). Enzym jest syntetyzowany w wątrobie i wydzielany do krwi, gdzie katalizuje reakcję estryfikacji cholesterolu w osoczu. Zachodzi ona w cząstkach HDL i jest kluczowym etapem tworzenia dojrzałych cząstek HDL. W całej puli cholesterolu transportowanego przez lipoproteiny estry cholesterolu (CHE) stanowią około 75%. Zmniejszony udział CHE obserwuje się w chorobach wątroby.
- **lipazy lipoproteinowe**. Enzymy te są syntetyzowane w tkankach i wiązane na śródbłonku naczyń krwionośnych. We krwi wynaczynionej ich aktywność jest śladowa.
 - **lipaza lipoproteinowa** - powoduje hydrolizę triacylogliceroli, transportowanych przez chylomikrony i VLDL, do wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) i glicerolu. Wymaga obecności apolipoproteiny C-II. Największa ilość tego enzymu znajduje się w tkankach: tłuszczowej, mięśniowej i płucnej.
 - **lipaza lipoproteinowa wątrobową** - występuje na śródbłonku naczyń krwionośnych wątroby. Nie wymaga obecności apo C-II. Poza

aktywnością hydrolazy triacylogliceroli posiada ona jeszcze aktywność fosfolipazy. Substratami są dla niej lipidy cząstek VLDL, LDL i HDL.

- o **lipaza endotelialna** - występuje na komórkach śródbłonna, między innymi naczyń wieńcowych i w makrofagach. Bierze udział w katabolizmie HDL, katalizując przede wszystkim hydrolizę fosfolipidów transportowanych przez HDL.

Osoczowe przemiany lipoprotein związane są także z przemieszczaniem się lipidów pomiędzy cząstkami lipoprotein różnych klas. Transport ten umożliwiają/ułatwiają białka transportujące lipidy. Jednym z nich jest białko przenoszące estry cholesterolu (ang. *cholesteryl ester transfer protein*, CETP). Jest to glikoproteina umożliwiająca transport estrów cholesterolu pomiędzy lipoproteinami. Najważniejszą funkcją CETP jest transport CHE pomiędzy HDL (miejscem estryfikacji cholesterolu) a lipoproteinami VLDL i LDL. Przeniesieniu jednej cząsteczki CHE z HDL do VLDL towarzyszy przeniesienie jednej cząsteczki TG z VLDL do HDL. CETP odgrywa ważne znaczenie w regulacji stężenia cholesterolu we frakcjach HDL i LDL.

Stwierdzono, że mutacje w genie CETP, obniżające aktywność CETP, skutkują bardzo wysokim poziomem cholesterolu we frakcji HDL. Na tej podstawie można przypuszczać, że farmakologiczne hamowanie aktywności CETP spowoduje obniżanie LDL-cholesterolu i wzrost HDL-cholesterolu. Inhibitory CETP są obecnie badane jako potencjalne leki przeciwmiażdżycowe.

4.1.4. Receptory lipoprotein

Przekazywanie lipidów przez cząstki lipoproteinowe do komórek odbywa się z udziałem swoistych receptorów, zlokalizowanych na błonach komórkowych (tab. 4.4). Większość receptorów pośredniczy w procesach endocytozy cząstek lipoproteinowych (receptory B/E, receptory apo E, makrofagowe receptory zmiatające), które są następnie w całości katabolizowane wewnątrz komórek. Natomiast receptor zmiatający typu B-I wiąże cząstki HDL i umożliwia przekazywanie estrów cholesterolu z HDL do komórek.

Za odkrycie receptora LDL i wyjaśnienie jego roli w metabolizmie cholesterolu Joseph Goldstein i Michael Brown otrzymali nagrodę Nobla w 1985 r.

Tabela. 4.3. Wybrane receptory lipoprotein

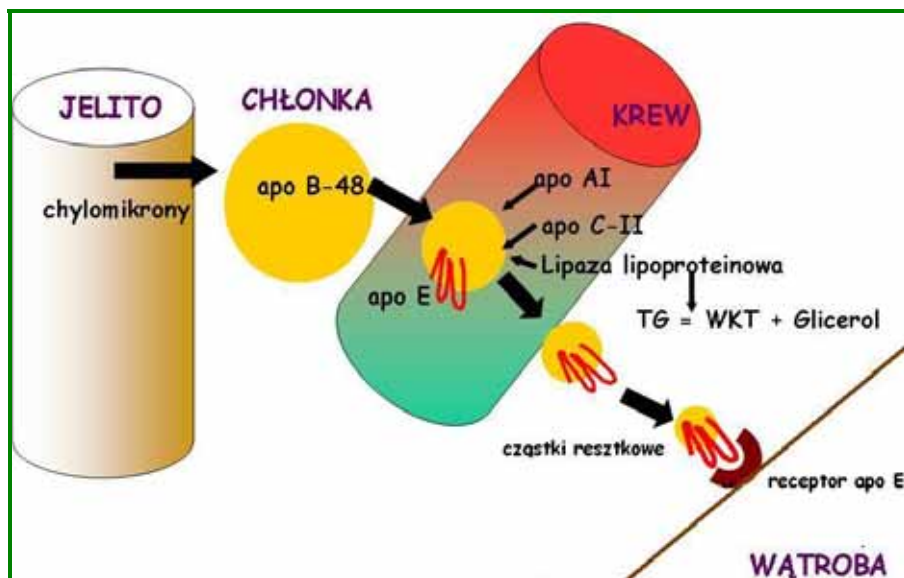
Receptor	Występowanie	Wiązane lipoproteiny	Ligandy
Receptor B/E (Receptor LDL)	Wszystkie komórki	IDL, LDL	Apo B-100, Apo E
Receptor apo E (Receptor cząstek reszkowych)	Wątroba	Remnanty CHM, remnanty VLDL	Apo E
Makrofagowy receptor zmiatający („scavenger”)	Makrofagi	Zmodyfikowane lipoproteiny (oksydowane LDL)	Układ ładunków
Receptor zmiatający klasy B-I (SR B-I)	Wątroba, komórki steroidogenne	HDL	Elementy struktury apolipoprotein

4.2. Metabolizm lipoprotein

4.2.1. Metabolizm chylomikronów

95% spożywanych tłuszczów stanowią triacyloglicerole. Powinny one pokrywać około 25-30% dobowego zapotrzebowania energetycznego (dla dorosłych w wieku 26-60 lat wynosi to: 57-97 g dla kobiet i 73-120 g dla mężczyzn). Absorpcja jelitowa TG jest bardzo wydajna i w normalnych warunkach sięga około 90% TG zawartych w diecie.

Podczas procesu trawienia w przewodzie pokarmowym lipidy są hydrolizowane i wchłaniane do komórek błony śluzowej jelita cienkiego. Tam syntetyzowane są chylomikrony (ryc. 4.5). Strukturalnym białkiem chylomikronów jest apo B-48, które posiada zdolność wiązania bardzo dużych ilości TG. Tworzenie chylomikronów następuje w trakcie syntezy apo B-48 i zależy od obecności mikrosomalnego białka transportowego (ang. *microsomal transport protein*, MTP), które przenosi TG do miejsca syntezy apo B. Genetycznie uwarunkowany brak MTP powoduje ciężkie zaburzenie zwane abetalipoproteinemią (patrz dalej). Powstające chylomikrony wchłaniane są do naczyń chłonnych i następnie dostają się wraz z chłonką do łożyska naczyniowego. Tam zostają wzbogacone w apo C, apo E i apo A-I pozyskiwane od innych lipoprotein. Bardzo szybko następuje hydroliza TG chylomikronów, katalizowana przez lipazę lipoproteinową w obecności apo C-II. Wraz ze zmniejszaniem się zawartości TG następuje odłączanie apolipoprotein i w rezultacie powstają znacznie mniejsze cząstki, o zwiększonym udziale estrów cholesterolu, zawierające już tylko apo B-48 i apo E. Takie struktury noszą nazwę **cząstek reszkowych** (remnantów) chylomikronów. Są one usuwane z krążenia przez wątrobę za pośrednictwem receptorów apo E.



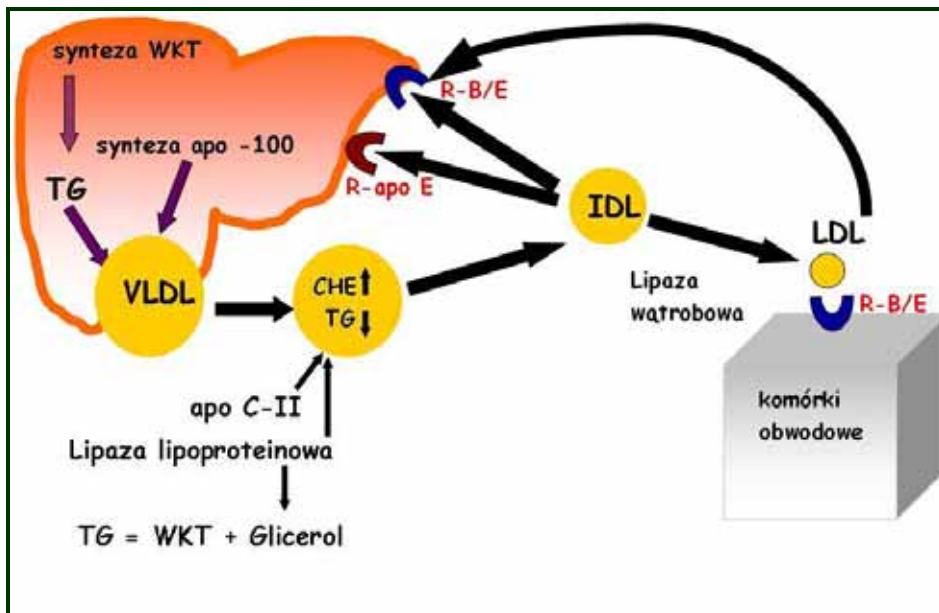
Ryc. 4.5. Metabolizm chylomikronów; WKT – wolne kwasy tłuszczowe

Ocenia się, że jedna cząstka chylomikronowa przebywa we krwi 7-10 minut. Szybki katabolizm i stopniowe pojawianie się chylomikronów we krwi sprawiają, że po posiłku w normalnych warunkach utrzymuje się przez pewien czas stosunkowo niewielka ilość chylomikronów we krwi, co objawia się umiarkowanym wzrostem TG, ale nie wpływa istotnie na poziom CH (lipemia pokarmowa). W zaburzeniach metabolizmu chylomikronów poziom TG we krwi jest bardzo wysoki, wzrasta też stężenie cholesterolu.

4.2.2. Metabolizm VLDL i IDL oraz powstawanie LDL

VLDL syntetyzowane są w hepatocytach. Strukturalnym białkiem VLDL jest apo B-100. Synteza VLDL odbywa się, podobnie jak synteza chylomikronów, z udziałem MTP. Tylko część TG wbudowywanych do VLDL jest syntetyzowana *de novo* w hepatocytach, większość pochodzi z cząstek reszkowych chylomikronów. VLDL wydzielane z wątroby mają cholesterol zestryfikowany w około 50%. Przemiany VLDL w osoczu (ryc. 4.6) polegają początkowo na wzbogaceniu cząstek w apolipoproteiny A-I, C-II i E, których donorem są HDL. Jednocześnie TG są hydrolizowane przez lipazę lipoproteinową, a cholesterol niezestryfikowany (wolny, CHW) przemieszcza się do HDL i po estryfikacji (CHE) wraca do VLDL za pośrednictwem CETP. Jednocześnie CETP przenosi TG z VLDL do HDL. W efekcie powstają lipoproteiny zawierające mniej więcej równoważną ilość TG i CH - frakcje pośrednie (IDL, cząstki reszkowe VLDL, remnanty VLDL). Część IDL (75%) jest wychwytywana i katabolizowana przez wątrobę z udziałem receptorów LDL i receptorów apo E. Pozostałe cząstki IDL

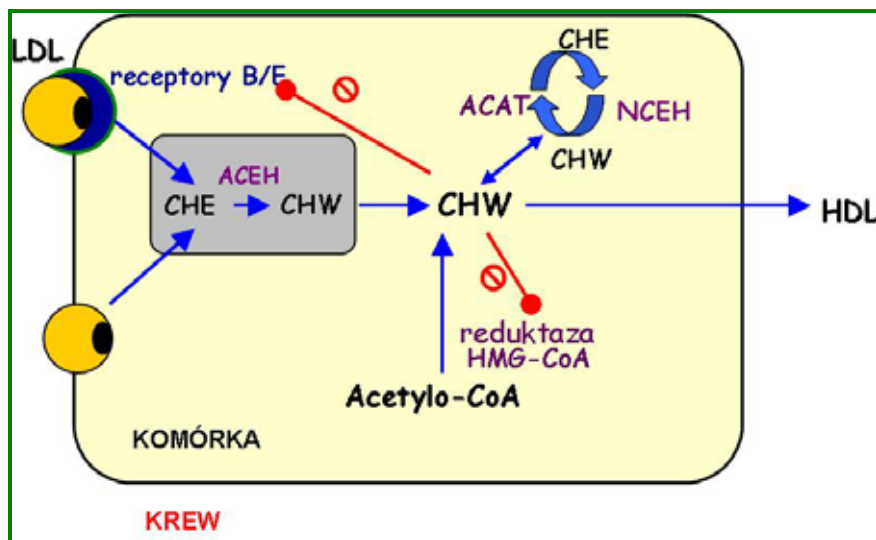
ulegają dalszym przemianom z udziałem lipazy lipoproteinowej wątrobowej. Maleje w nich zawartość TG, natomiast rośnie ilość CH. Apolipoproteiny A-I, C-II i E odłączają się i apo B-100 pozostaje jedynym białkiem cząstek, które definiujemy jako LDL (ryc.4.6).



Ryc.4.6. Metabolizm VLDL i IDL. R-B/E – receptory LDL, R-apo E – receptory cząstek resztkowych, TG – triacyloglicerole, WKT – wolne kwasy tłuszczowe

4.2.3. Katabolizm LDL. Równowaga cholesterolowa w komórce

U człowieka cholesterol jest składnikiem wszystkich błon biologicznych, prekursorem hormonów sterydowych, kwasów żółciowych oraz witaminy D. Około 40% całego cholesterolu ustroju znajduje się w tkance nerwowej, gdzie stanowi on główny składnik mieliny. Większość cholesterolu ma postać cholesterolu wolnego. Z wyjątkiem tkanek nerwowej i mięśniowej, cholesterol pochodzi głównie z własnej syntezy (substratem jest acetylo-koenzym A). Kluczowym enzymem szlaku syntezy cholesterolu jest reduktaza beta-hydroksy-beta-metyloglutarylo-koenzymu A (reduktaza HMG-CoA), której aktywność jest hamowana zwrotnie przez cholesterol. Źródłem cholesterolu egzogenego dla większości komórek są cząstki LDL. Receptorowy transport LDL do komórek jest podstawowym mechanizmem kontroli stężenia LDL we krwi. Receptory LDL odkryto we wszystkich tkankach, przy czym około 2/3 receptorów zlokalizowane jest w wątrobie. Aktywność i ilość receptorów LDL w komórce są ściśle kontrolowane przez poziom cholesterolu (ryc. 4.7).



Ryc. 4.7. Równowaga cholesterolowa w komórce. CHE – cholesterol zestryfikowany, CHW – cholesterol wolny, HMG-CoA – beta-hydroksy-beta-metyloglutarylo-koenzym A, ACAT – acylotransferaza acetylo-CoA-cholesterol, NCEH – neutralna hydrolaza estrów cholesterolu.

W warunkach prawidłowych, u człowieka, 20-33% LDL wnika do komórek bez udziału receptorów. Pozareceptorowy transport LDL jest proporcjonalny do stężenia LDL w osoczu. Przy deficycie receptorów lub ich wadliwym funkcjonowaniu rośnie udział pozareceptorowej drogi pobierania LDL.

Kontrola syntezy endogennego cholesterolu i receptorowego transportu LDL do komórek to dwa główne sposoby regulowania zawartości cholesterolu w komórkach. Trzeci mechanizm związany jest z obecnością cytozolowego enzymu katalizującego estryfikację cholesterolu (acylotransferaza acetylo koenzym A - cholesterol, ACAT) (ryc. 4.7). Krople estrów cholesterolu w cytoplazmie stanowią zapas cholesterolu, który może być uwolniony w wyniku aktywności neutralnej hydrolazy estrów cholesterolu (NCEH). Trzeba jednak zaznaczyć, że w większości komórek obecna jest jedynie śladowa ilość estrów cholesterolu. Wysoka proporcja CHE występuje w lipoproteinach, w nadnerczach i płytkach miażdżycowych.

Ważnym ogniwem w utrzymywaniu równowagi cholesterolowej w komórkach jest przechwytywanie nadmiaru cholesterolu przez cząstki HDL (ryc. 4.7), gdzie jest on estryfikowany i przekazywany do wątroby. Ten proces nosi miano powrotnego (zwrotnego) transportu cholesterolu.

4.2.4. *Metabolizm HDL*

HDL są najbardziej polimorficzną klasą lipoprotein. W zależności od kryterium podziału można wyróżnić nawet kilkanaście podfrakcji HDL, o różnym

składzie białkowym i lipidowym, a co za tym idzie o odmiennych właściwościach fizyko-chemicznych. Przypuszcza się, że takie zróżnicowanie odzwierciedla różny udział poszczególnych rodzajów cząstek HDL w transporcie powrotnym cholesterolu. Obecnie najważniejszą rolę w tym procesie przypisuje się apo A-I.

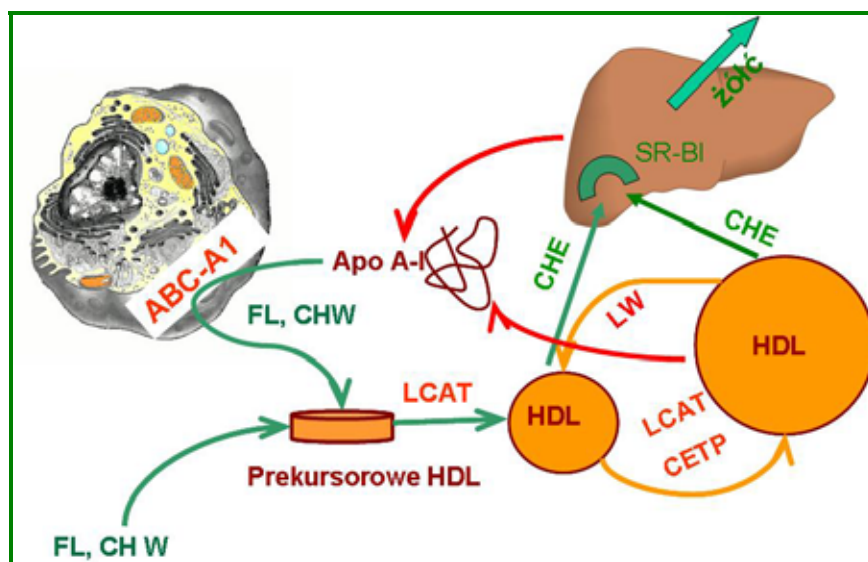
Apo A-I jest syntetyzowana w wątrobie i jelicie i w większości wydzielana w postaci wolnej apo A-I, która reaguje z transporterem przez błonowy ABC A-1 (ang. *ATP Binding Cassette Transporter A-1*). Uruchamia to wewnątrz komórki kaskadę sygnałów prowadzących do uwolnienia z błony komórkowej fosfolipidów i cholesterolu niezestryfikowanego. Są one wiązane przez apo A-I i w ten sposób powstają prekursorowe HDL o dyskowych kształtach, uwarunkowanych brakiem niepolarnych lipidów (TG i CHE) (ryc. 4.8). Po estryfikacji cholesterolu przez LCAT tworzy się hydrofobowy rdzeń i cząstki zmieniają kształt na sferyczny, stając się dojrzałymi HDL. One również przechwytyują cholesterol z komórek, za pośrednictwem innej klasy transporterów przez błonowych (ABC G-1). Dojrzałe HDL przechodzą w osoczu dalsze przemiany z udziałem enzymów i białek transportujących lipidy, podczas których część apo A-I jest ponownie uwalniana z cząstek HDL. W trakcie przemian cząstki HDL przekazują estry cholesterolu do hepatocytów za pośrednictwem receptorów zmiatających klasy B-I (ryc. 4.8).

W 1960 r. Friedrickson po raz pierwszy opisał przypadek tzw. choroby tangierskiej. To bardzo rzadkie zaburzenie cechuje się całkowitym brakiem HDL we krwi, a jednocześnie w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego akumuluje się od 50 do 100 większa ilość estrów cholesterolu niż w warunkach normalnych. U schyłku XX wieku odkryto, że choroba tangierska jest uwarunkowana defektami genu transportera ABC A-1. Obecnie prowadzone są badania nad możliwością farmakologicznej intensyfikacji transportu powrotnego poprzez wpływ na funkcje transporterów ABC lub na drodze wprowadzania do krążenia tzw. mimetyków HDL. Są nimi dyskowe struktury tworzone przez apo A-I i fosfolipidy, analogiczne do prekursorowych HDL występujących we krwi.

4.2.5. Równowaga cholesterolowa ustroju

Okolo 50% cholesterolu zawartego w pokarmie wchłania się z przewodu pokarmowego odpowiednio do podaży, która wynosi dziennie 400-600 mg. Endogenna dzienna synteza wynosi od 0,8 do 1,2 grama. Największy udział w syntezie cholesterolu mają wątroba (85%), jelito cienkie (8%) i skóra (5%). Wątroba jest głównym organem utrzymującym równowagę cholesterolową organizmu (ryc. 4.9). Cholesterol pokarmowy dociera do wątroby razem z cząstkami resztkowymi chylomikronów. Wątroba włącza cholesterol w syntetyzowane przez siebie lipoproteiny VLDL. Cholesterol nie wychwycony przez tkanki wraca do wątroby za pośrednictwem IDL i LDL. Cholesterol zbędny dla komórek jest odbierany przez HDL i również dostarczany do wątroby. Ponad 90% cholesterolu jest usuwane z organizmu z żółcią, w postaci niezmięnionej lub po przekształ-

ceniu w kwasy żółciowe, których synteza jest regulowana na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego przez ilość kwasów żółciowych wracających do wątroby.



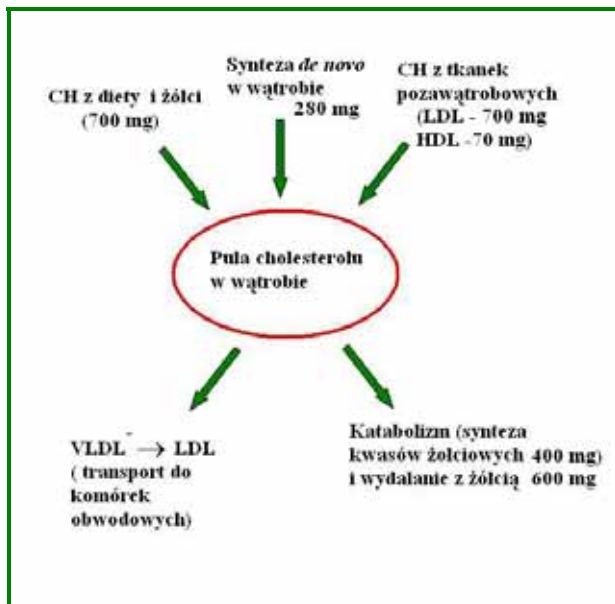
Ryc. 4.8. Metabolizm HDL. FL - fosfolipidy, CHW - cholesterol wolny, CHE – cholesterol zestryfikowany, LW - lipaza wątrobową, LCAT – acylotransferaza lecytyna-cholesterol, CETP – białko przenoszące estry cholesterolu, SR-BI – receptory zmiatające klasy BI, ABC A-1 – transporter przez błonowy A-1.

4.3. Lipidy a miażdżyca

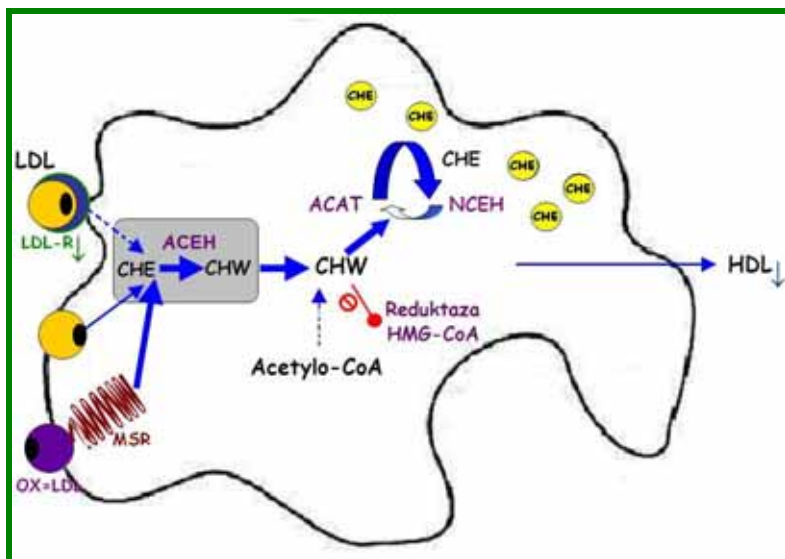
4.3.1. Rola LDL i makrofagów w powstawaniu ogniska miażdżycowego

Powstawanie zmian miażdżycowych jest procesem długotrwałym, a jego mechanizm nie jest do końca wyjaśniony. Wiele dowodów wskazuje, że istotną rolę w rozwoju miażdżycy odgrywają zmodyfikowane LDL i ich wychwyt przez makrofagi (ryc. 4.10).

Pewna ilość cząstek LDL może przedostawać się do warstwy podśródbłonkowej tętnic. Zwiększonej infiltracji LDL sprzyja podwyższony poziom LDL oraz uszkodzenie funkcji śródbłonka następujące np. w wyniku działania sił hemodynamicznych w nadciśnieniu tętniczym lub pod wpływem toksyn bakteryjnych.



Ryc. 4.9. Rola wątroby w gospodarce cholesterolu.

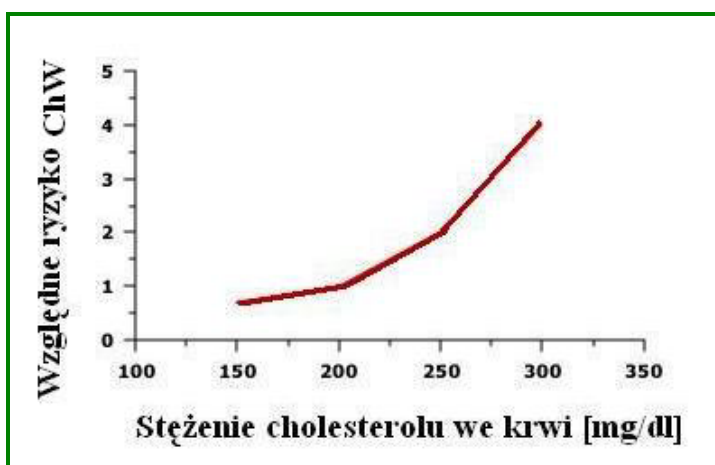


Ryc. 4.10. Udział oksydowanych LDL i makrofagowych receptorów zmiatających w przekształcaniu makrofagów w komórki piankowe. CHE – cholesterol zestryfikowany, CHW – cholesterol wolny, HMG-CoA – beta-hydroksy-beta-metyloglutarylo-koenzym A, ACAT - acylotransferaza acetylo-koenzym A-cholesterol, NCEH – neutralna hydrolaza estrów cholesterolu, MSR – makrofagowe receptory zmiatające, OX-LDL – zmodyfikowane LDL, LDL-R – receptor LDL.

W ścianie naczyń dochodzi do modyfikacji LDL na skutek między innymi glikozylacji lipoprotein, działania wolnych rodników, fosfolipaz i proteaz. Zmiany dotyczą zarówno apo B-100 jak i lipidów. Makrofagi i pokrewne im komórki (monocyty, komórki szpiku kostnego, komórki Kupffera) posiadają szczególną klasę receptorów – makrofagowe receptory zmiatające (ang. *Macrophage Scavenger Receptor*, MSR), które rozpoznają i wychwytyują zmodyfikowane LDL. Są to receptory **nieregulowane**. Brak jest sprzężenia pomiędzy ich aktywnością a ilością lipoprotein, jakie dostają się do komórek. Kiedy makrofagi pobiorą więcej cholesterolu niż wymaga tego normalny metabolizm komórkowy, i/lub kiedy powrotny transport cholesterolu nie jest odpowiednio wydajny, dochodzi do gromadzenia estrów cholesterolu w cytoplazmie. Konsekwencją tego jest przekształcenie się makrofagów w komórki piankowe, które następnie ulegają destrukcji pozostawiając złogi estrów cholesterolu. Cechą charakterystyczną dla wczesnych stadiów miażdżycy jest proliferacja komórek mięśniówki gładkiej, które również mogą ulegać odróżnicowaniu i akumulować oksydowane LDL, powiększając ilość komórek piankowych.

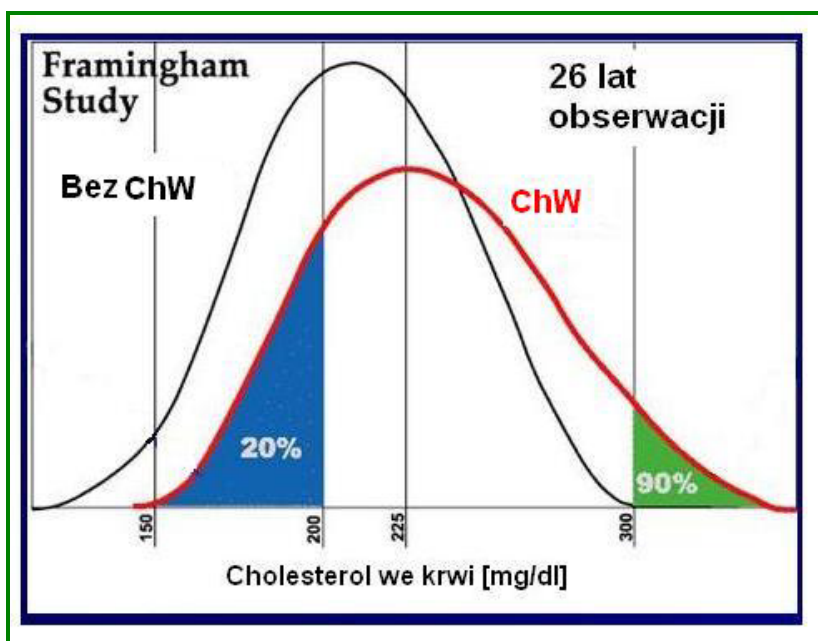
4.3.2. Lipidowe czynniki ryzyka miażdżycy

W skrócie czynnik ryzyka można określić jako cechę lub styl życia ilościowo i przyczynowo związany z chorobą, których wyeliminowanie lub zredukowanie prowadzi odwrócenia lub złagodzenia procesu chorobowego i konsekwencji klinicznych. Badania epidemiologiczne wskazują, że zmiany ilościowe i jakościowe lipoprotein osocza stanowią istotne, tzw. lipidowe czynniki ryzyka miażdżycy. Do najważniejszych lipidowych czynników ryzyka miażdżycy należy poziom cholesterolu we krwi (ryc. 4.11).



Ryc. 4.11. Zależność pomiędzy ryzykiem zachorowania na chorobę wieńcową (ChW) i stężeniem cholesterolu we krwi.

Statystycznie ustalone przedziały wartości prawidłowych nie odzwierciedlają ryzyka miażdżycy związanego ze stężeniami lipidów/lipoprotein (ryc. 4.12).



Ryc. 4.12 Rozkład stężeń cholesterolu we krwi a zachorowalność na chorobę wieńcową (ChW), na podstawie badań Framingham

Czarny histogram – rozkład stężeń cholesterolu we krwi u osób, u których podczas pierwszych 26 lat obserwacji nie doszło do rozwoju ChW.

Czerwony histogram – rozkład stężeń cholesterolu we krwi u osób, u których podczas pierwszych 26 lat obserwacji doszło do rozwoju ChW.

Niebieskie pole – ryzyko ChW u osób, u których stężenia cholesterolu we krwi mieszczą się w zakresie od 150 do 200 mg/dL wynosi 20%. Jest to około 40% populacji.

Zielone pole – ryzyko ChW u osób, u których stężenia cholesterolu we krwi są wyższe niż 300 mg/dL wynosi 90%. Jest to około 3% populacji.

Przy poziomie cholesterolu 225 mg/dL ryzyko ChW wynosi 40%.

Zalecenia amerykańskiego Narodowego Programu Edukacji Cholesterolowej (National Cholesterol Education Program - NCEP) dotyczące wykrywania i leczenia hipercholesterolemii u dorosłych przedstawiają Raporty Zespołu Ekspertów ds. Wykrywania, Oceny i Leczenia Hipercholesterolemii u Dorosłych (Adult Treatment Panel [ATP]) (www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/). Ostatni raport (ATP III) został opublikowany w 2001 r. i uzupełniony w 2004 r. Według ATP głównym celem leczenia zmniejszającego stężenie cholesterolu powinno być stężenie cholesterolu we frakcji LDL. Klasyfikację stężeń lipidów/lipoprotein proponowaną przez ATP III przedstawia tabela 4.4.

Tabela 4.4. Klasyfikacja stężeń lipidów i lipoprotein wg ATP III

Klasyfikacja	Cholesterol całkowity (CH)
Stężenie pożądane	<200 mg/dL (<5,2 mmola/L)
Stężenie granicznie duże	200-239 mg/dL (5,2-6,1 mmola/L)
Stężenie duże	≥240 mg/dL (≥6,2 mmola/L)
	Cholesterol LDL (LDL-CH)
Stężenie optymalne	<100 mg/dL (<2,6 mmola/L)
Stężenie prawie optymalne	100-129 mg/dL (2,6-3,3 mmola/L)
Stężenie granicznie duże	130-159 mg/dL (3,4-4,1 mmola/L)
Stężenie duże	160-189 mg/dL (4,1-4,9 mmola/L)
Stężenie bardzo duże	≥190 mg/dL (≥4,9 mmola/L)
	Triacyloglicerole (TG)
Stężenie prawidłowe	<150 mg/dL (<1,7 mmola/L)
Stężenie granicznie duże	150-199 mg/dL (1,7-2,3 mmola/L)
Stężenie duże	200-499 mg/dL* (2,3-5,7 mmola/L)
Stężenie bardzo duże	≥500 mg/dL** (≥5,7 mmola/L)
	Cholesterol HDL (HDL-CH)
Stężenie małe	<40 mg/dL (<1,0 mmola/L)
Stężenie duże	≥60 mg/dL (≥1,5 mmola/L)

* stężenie TG w zakresie 200-499 mg/dL stanowi czynnik ryzyka miażdżycy, ponieważ najczęściej jest ono spowodowane obecnością aterogennych cząstek reszkowych VLDL.

** stężenie TG >1000 mg/dL, najczęściej związane jest z obecnością dużej ilości chylomikronów i stanowi czynnik ryzyka ostrego zapalenia trzustki.

4.3.3. Inne czynniki ryzyka choroby wieńcowej

Ze zwiększonym ryzykiem ChW wiążą się również inne, nielipidowe czynniki ryzyka, do których należą:

- nadciśnienie tętnicze,
- palenie papierosów,
- stan prozakrzepowy,
- cukrzyca,
- otyłość,
- mała aktywność fizyczna,
- dieta aterogenna,
- wiek,
- płeć męska,
- przedwczesna CHW w wywiadzie rodzinnym.

4.3.4. Docelowe stężenia LDL-CH w grupach ryzyka

Działania podejmowane w celu redukcji ryzyka ChW powinny bezpośrednio zależeć od stopnia ryzyka incydentów wieńcowych. Dla różnych grup ryzyka proponowane są odmienne – tzw. docelowe poziomy LDL-CH, czyli stężenia LDL-CH jakie powinny być uzyskane w efekcie terapii (tab. 4.5).

Tabela 4.5. Docelowe stężenia LDL-CH w grupach ryzyka

Grupa ryzyka	Docelowe stężenie LDL-CH
ChW lub równoważnik ChW*	<100 mg/dL (<2,6 mmola/L)
≥2 czynniki ryzyka	<130 mg/dL** (<3,4 mmola/L)
≤1 czynnik ryzyka	<160 mg/dL (<4,1 mmola/L)

* równoważniki ChW jako czynnika ryzyka: inne niż ChW kliniczne postaci miażdżycy (miażdżycy tętnic kończyn dolnych, miażdżycy tętnic szyjnych [przemijające napady niedokrwienia lub udar mózgu, związane z chorobą tętnic szyjnych lub zwężenie >50% tętnicy szyjnej uwidocznione w angiografii lub ultrasonograficznie] i tętniak aorty brzusznej), cukrzyca oraz współistniejące liczne czynniki ryzyka

** Docelowe stężenie LDL-CH u osób z licznymi czynnikami ryzyka, u których 10-letnie ryzyko wystąpienia incydentów wieńcowych przekracza 20%, wynosi <100 mg/dL.

W przypadku dużych stężeń TG, drugim celem leczenia jest tzw. nie-HDL-CH, wyliczany z różnicy pomiędzy cholesterolem całkowitym i HDL-CH. Odzwierciedla on cały cholesterol transportowany w aterogennych lipoproteinach zawierających apo B (LDL, VLDL, IDL i cząstki reszkowe VLDL). Docelowy nie-HDL-CH powinien być tylko o 30 mg/dL wyższy niż docelowy LDL.

4.4. Badania laboratoryjne w diagnostyce zaburzeń metabolizmu lipoprotein

Najczęściej wykonywanym badaniem laboratoryjnym jest pomiar stężenia cholesterolu całkowitego we krwi, który może być przeprowadzony w próbce pobranej o dowolnej porze. Jest to pewnego rodzaju „badanie przesiewowe” służące do wykrywania osób z hipercholesterolemią. Według zaleceń ATP III, z punktu widzenia prewencji ChW, najlepszym postępowaniem jest ocena profilu lipidowego obejmującego pomiary stężeń CH, HDL-CH i TG. Na ich podstawie, w większości przypadków, można wyliczyć stężenie LDL-CH, posługując się wzorem Friedewalda (patrz dalej). Dla celów prewencji pierwotnej ocena profilu lipidowego powinna być przeprowadzana u wszystkich osób dorosłych (>20 lat) raz na 5 lat. W okresie 3 tygodni poprzedzających badanie pacjent powinien zachować swoją zwykłą dietę i stałą wagę. Częstsze pomiary są konieczne u

osób z licznymi czynnikami ryzyka i osób poddawanych leczeniu hipolipemizującemu.

Badania wchodzące w skład profilu lipidowego powinny być wykonywane we krwi pobranej w warunkach standardowych, na czczo. Pacjent powinien wówczas powstrzymać się od posiłków przez 10-12 godzin. Krew należy pobierać po 10 minutowym spoczynku w pozycji siedzącej, staza powinna trwać krótko. Stężenia lipidów w osoczu są o około 4% niższe niż w surowicy, należy więc zachować stały wybór materiału do badań. Diagnoza powinna opierać się na przynajmniej dwóch badaniach wykonanych w odstępie 2 - 3 tygodniowym.

W ciąży występuje fizjologiczna hiperlipidemia, w tym czasie kobiety nie powinny być włączane do badań przesiewowych.

Obecnie wszystkie badania laboratoryjne wykorzystywane do diagnostyki zaburzeń metabolizmu lipoprotein wykonuje się z użyciem autoanalyzerów. Pomiaru wykonywane są za pomocą metod enzymatycznych, które pozwoliły na eliminację etapów ekstrakcji lipidów z osocza, a ponadto cechują się wysoką swoistością i precyzją.

4.4.1. Stężenie cholesterolu we frakcjach LDL i HDL

Ilość frakcji LDL i HDL ocenia się poprzez stężenie cholesterolu transportowanego przez te lipoproteiny. Do mierzenia stężeń HDL-CH wykorzystywane są obecnie tzw. metody bezpośrednie, nie wymagające izolacji frakcji HDL z osocza. Cholesterol LDL może być wyliczany wg. **formuły Friedewalda**:

$$\text{cholesterol LDL} = \text{CH} - (\text{CH-HDL} + \text{TG}/5) \quad [\text{mg/dL}]$$

lub

$$\text{cholesterol LDL} = \text{CH} - (\text{CH-HDL} + \text{TG}/2,22) \quad [\text{mmol/L}]$$

Obliczanie cholesterolu LDL za pomocą przedstawionego wzoru jest wiarygodne pod warunkiem, że stężenie TG we krwi nie przekracza wartości 350 mg/dL i że we krwi nie są obecne chylomikrony (pacjent musi być na czczo!) ani podwyższona ilość frakcji pośrednich.

Obecnie coraz powszechniej stosowane są także metody bezpośredniego oznaczania poziomu cholesterolu LDL. Kiedy stosuje się metody bezpośrednie, dopuszcza się pomiar HDL-CH i LDL-CH we krwi pobranej nie na czczo.

4.4.2. Stężenie triacylogliceroli we krwi

Stężenie TG powinno być mierzone we krwi pobranej na czczo. Stwierdzenie dużego i bardzo dużego poziomu TG (tab. 4.4) wymaga od laboratorium zdefiniowania obecności lub braku chylomikronów. Chylomikrony wykrywa się łatwo, ponieważ samorzutnie wypływają (flotują) na powierzchnię osocza (surowicy) i po kilkunastu godzinach przechowywania materiału w lodówce tworzą na powierzchni wyraźną białą warstwę. Jest to tzw. test zimnej flotacji.

Duża ilość chylomikronów (TG>1000 mg/dl) może interferować w pomiaru stężeń innych składników osocza. W takim wypadku chylomikrony powinny

być oddzielone od krwi/osocza np. za pomocą ultrawirowania (podczas wirowania osocza przy dużej sile odśrodkowej chylomikrony flotują na powierzchni).

4.4.3. Stężenia apolipoprotein

W praktyce wykorzystuje się pomiary stężeń apo B oraz apo A-I. Stosunek apo B/apo A-I odzwierciedla zależność pomiędzy pro-aterogennymi lipoproteinami zawierającymi apo B i anty-aterogennymi populacjami HDL. Badania epidemiologiczne wykazały, że stosunek ten jest najsilniejszym wskaźnikiem ryzyka miażdżycowej choroby sercowo-naczyniowej. Ponadto badania poziomu apo B są przydatne dla diagnostyki abetalipoproteinemii oraz hipobetalipoproteinemii.

4.5. Klasyfikacja hiperlipidemii

Klasyfikacja stężeń lipidów/lipoprotein zaproponowana przez ATP III (tab. 4.4) służy do wykrywania i leczenia hipercholesterolemii u dorosłych. Nie uwzględnia ona wszystkich zaburzeń metabolizmu lipoprotein, a zwłaszcza ciężkich hipertriglicerydemii lub mieszanych hiperlipidemii związanych z zaburzeniami metabolizmu chylomikronów. Klasyfikację, która obejmuje niemal wszystkie rodzaje hiperlipidemii, a ponadto uwzględnia jakościowe zmiany lipoprotein osocza, zaproponowali Friedrickson, Levy i Less (1970 r.). Została ona zaaprobowana przez Komitet Ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia. Klasyfikacja ta oparta jest na obrazie lipoprotein rozdzielonych metodą elektroforezy w żelu agarozowym i stężeniach CH oraz TG. Wyróżnia ona 5 głównych fenotypów hiperlipidemii (ryc. 4.13), które mogą być wywołane różnymi czynnikami etiologicznymi (mającymi podłoże zarówno pierwotne jak i wtórne).

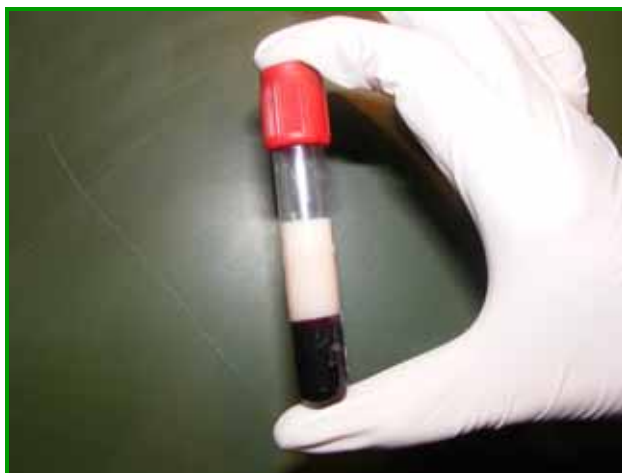
4.5.1. HLP typ I (hiperchylomikronemia na czczo)

Charakteryzuje się obecnością chylomikronów w osoczu pobranym na czczo. Stężenia triacylogliceroli są wybitnie zwiększone, nawet powyżej 10.000 mg/dL (ryc. 4.14), podwyższone jest również stężenie cholesterolu. Charakterystyczny jest stosunek stężenia cholesterolu całkowitego do stężenia triacylogliceroli - poniżej 0,1. Przyczyną zaburzenia jest brak aktywności lipazy lipoproteinowej związany z upośledzeniem syntezy enzymu, jego nieprawidłową budową, lub deficytem apolipoproteiny C-II. Ujawnia się tylko u homozygot. Objawy kliniczne mogą występować już w pierwszej dekadzie życia, a ich nasilenie zależy od wielkości hipertriglicerydemii. Z reguły pojawiają się, gdy stężenie triacylogliceroli utrzymuje się powyżej 2000 mg/dL. Należą do nich rozsiane zmiany ksantomatyczne, zmiany w siatkówce oka (*lipemia retinalis*), hepatosplenomegalia. Chorzy cierpią z powodu ostrych, napadowych bólów brzucha związanych z rozciąganiem torebki wątrobowej. Występują nawracające zapalenia

trzustki. Nie stwierdzono u pacjentów predyspozycji do rozwoju miażdżycy. Dieta beztłuszczowa powoduje szybki spadek ilości triacylogliceroli w osoczu.

Obraz elektroforetyczny	Nazwa	Przyczyna genetyczna
	Chylomikronemia na czczo (HLP typ I)	Brak/defekt LPL lub apo C-II (1:100 000)
	Hipercholesterolemia izolowana (HLP typ IIa)	Defekt receptora LDL Defekt apo B (1:500)
	Mieszana rodzinna hiperlipidemia (HLP typ IIb)	Nadprodukcja Apo B 100 1: 200
	Dysbetalipoproteinemia (Hiperlipidemia frakcji pośrednich, HLP typ III)	Typ izoformy apo E: E2/E2 (1:3000)
	Hipertriglicerydemia endogenna (HLP typ IV)	Nadprodukcja VLDL (1:500)
	Ciężka mieszana hiperlipidemia (HLP typ V)	? (1:10 000)

Ryc. 4.13. Fenotypy hiperlipidemii wg Friedricksona, ich przyczyny pierwotne i częstość występowania. HLP – hiperlipoproteinemia



Ryc. 4.14. Surowica pacjenta z HLP typ I. Nagromadzenie chylomikronów powoduje bardzo silną lipemię

4.5.2. *HLP typ II a*

Podwyższone stężenie frakcji LDL (wysokie stężenie cholesterolu w osoczu). ***Hipercholesterolemia rodzinna*** (autosomalna, dominująca) wywołana jest defektem receptorów dla LDL. Heterozygoty występują z częstością 1/500, homozygoty 1/1.000.000. U heterozygot stężenie cholesterolu może przekraczać dwukrotnie wartości pożądane osiągając wartości do 600 mg/dL. W przypadkach homozygotycznych stężenia cholesterolu sięgają nawet ponad 1000 mg/dL. U heterozygot zmiany ksantomatyczne pojawiają się w drugiej dekadzie życia, u homozygot już we wczesnym dzieciństwie. Objawy kliniczne choroby wieńcowej w postaci homozygotycznej obserwowane są w pierwszej dekadzie, u nie leczonych zgon z powodu zawału serca ma miejsce przed ukończeniem 20 roku życia. U heterozygot częstość występowania choroby wieńcowej i jej przebieg są różne. Mają tu wpływ nie tylko poziom cholesterolu, ale również inne czynniki zwiększające ryzyko miażdżycy. ***Rodzinny defekt apo B*** (autosomalny, dominujący) jest efektem mutacji w apolipoproteinie B, która powoduje, że LDL posiadają tylko 3-5% prawidłowej aktywności wiązania z receptorami. Dotychczas opisano tylko postacie heterozygotyczne. Średnie stężenie cholesterolu całkowitego w granicach 270 mg/dl, cholesterolu frakcji LDL 200 mg/dL. Podwyższony poziom cholesterolu w ***hipercholesterolemii pospolitej*** nie wykazuje cech dziedziczenia. Przyczyn upatruje się m. in. w niewłaściwej diecie i zaawansowanym wieku pacjenta. Ryzyko miażdżycy - odpowiednie do poziomu hipercholesterolemii i innych czynników ryzyka.

4.5.3. *HLP typ II b (złożona hiperlipoproteinemia)*

Podwyższone poziomy frakcji LDL i VLDL. Stężenie cholesterolu najczęściej od 200 do 300 mg/dL i triacylogliceroli od 200 do 500 mg/dL. Występuje duża biologiczna zmienność osobnicza, ten sam pacjent może mieć w kilku kolejnych badaniach różne fenotypy (II b, II lub IV). Znaczna część pacjentów cechuje się otyłością i cukrzycą. Charakterystyczne dla hipercholesterolemii zmiany ksantomatyczne mogą nie występować. Przyczyną ***rodzinnej złożonej hiperlipoproteinemii*** (autosomalna, dominująca) jest prawdopodobnie nadprodukcja apolipoproteiny B. Wśród chorych na chorobę wieńcową poniżej 60-tego roku życia osobnicy z rodzinną złożoną hiperlipidemią stanowią 10%. Potwierdzenie rodzinnej złożonej hiperlipoproteinemii wymaga wnikliwych badań członków najbliższej rodziny pacjenta.

4.5.4. *HLP typ III (dysbetalipoproteinemia)*

Duża ilość frakcji pośrednich. Podwyższone są poziomy cholesterolu (300-460 mg/dL) i triacylogliceroli (nawet do około 1000 mg/dL), stosunek cholesterolu całkowitego do triacylogliceroli - zazwyczaj około 1. W niektórych przypadkach dodatkowo występuje na czczo niewielka ilość chylomikronów. Obraz

elektroforetyczny określa się jako "szeroki prążek beta". Cholesterol HDL jest często obniżony. Do objawów klinicznych należą zmiany ksantomatyczne na dłoniach (ok. 50% przypadków), zmiany ksantomatyczne guzowate na łokciach i kolanach. U 50% chorych występuje tendencja do przyspieszonej miażdżycy, w tym u ponad 30% miażdżycy rozwija się w tętnicach obwodowych. U znacznej części pacjentów upośledzona tolerancja glukozy, otyłość, niedoczynność przytarczyc i zwiększony poziom kwasu moczowego. Nagromadzanie się frakcji pośrednich związane jest z obecnością izoform E₂ apolipoproteiny E. Choroba ujawnia się gdy obecne są inne czynniki genetyczne lub środowiskowe. Potwierdzeniem powinno być określenie fenotypu apolipoproteiny E u pacjenta. Wśród pacjentów z typem III HLP 75 - 90 % to homozygoty E₂/2.

4.5.5. *HLP typ IV (hipertriglicerydemia endogenna)*

Podwyższone stężenie VLDL, wysokie stężenie triacylogliceroli (do około 1000 mg/dL), często obniżony cholesterol HDL. Fenotyp ten może pojawiać się okresowo pod wpływem długotrwałego nieprawidłowego odżywiania się lub spożywania alkoholu. Do obrazu klinicznego typu IV należy również otyłość. Przy utrzymującej się hiperlipidemii występują zmiany ksantomatyczne. **Rodzinna hipertriglicerydemia** ma niewyjaśnioną patogenezę. Pierwotnym defektem metabolicznym może być oporność komórkowa na insulinę. Połowa pacjentów z hipertriglicerydemią endogenną ma upośledzoną tolerancję węglowodanów.

4.5.6. *Hiperlipoproteinemia typ V*

Rzadkie zaburzenie, około 6,5% wszystkich hiperlipidemii. Podwyższone stężenie frakcji VLDL i chylomikronemia, znacznie podwyższony poziom cholesterolu (nawet do 1500 mg/dL) i triacylogliceroli (do 7000 mg/dL). Fenotyp ten jest wynikiem kombinacji czynników genetycznych i środowiskowych. Występuje w przebiegu alkoholizmu, w źle prowadzonej cukrzycy, w otyłości. U 50% chorych zwiększone stężenie kwasu moczowego. Zdarza się, że istniejąca u pacjenta hiperlipoproteinemia typu IV może pod wpływem wymienionych wyżej czynników przejść w postać typu V. Objawy kliniczne analogiczne jak w typie I. Wymaga różnicowania z typem I.

4.5.7. *Hiperlipidemie wtórne*

W przebiegu niektórych chorób, w wyniku zaburzeń hormonalnych a nawet pod wpływem niektórych leków może dojść do rozwoju hiperlipidemii (tab. 4.6). Jeżeli u danej osoby występują predyspozycje genetyczne, hiperlipidemia wtórna może być bardzo nasiloną. Następstwa hiperlipidemii wtórnych (ryzyko ChW w przypadku hipercholesterolemii, ryzyko zapalenia trzustki w przypadku hipertriglicerydemii) są analogiczne jak w przypadku hiperlipidemii pierwotnych.

Tabela 4.6 Wtórne hiperlipidemie

Przyczyna podstawowa	Główne kierunki zmian	Fenotyp	Bezpośrednia przyczyna
cukrzyca	TG↑, CH-HDL↓	typ IV, typ V	insulinooporność, nadprodukcja TG w wątrobie
alkoholizm	TG↑, HDL↓	typ IV, typ V, typ I	nadprodukcja TG w wątrobie
hipotyreoza	CH↑	typ II a/typ II b	zahamowanie funkcji receptora LDL
ciąża	TG↑, HDL↑	typ IV	podwyższony poziom estrogenów
zespół nerczycowy	CH↑ TG↑/N	typ II a, typ II b	nadprodukcja apo B-100 w wątrobie
niewydolność nerek	TG↑, HDL↓	typ IV	obniżona aktywność lipazy lipoproteinowej

4.6. Hipolipoproteinemie

4.6.1. Abetalipoproteinemia (zespół Bassena-Kornzweiga)

Zaburzenie bardzo rzadkie, cecha autosomalna, recesywna. Całkowity brak chylomikronów po posiłku tłuszczowym. W osoczu brak lipoprotein VLDL i LDL, obniżone są HDL. Stężenie cholesterolu całkowitego rzędu 22 mg/dL, fosfolipidów 45 mg/dL, triacyloglicerole nieoznaczalne rutynowymi metodami analitycznymi. Obraz kliniczny charakteryzuje się występowaniem biegunek w pierwszych latach życia związanych z zaburzeniami wchłaniania tłuszczu i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, wchłanianych wraz z chylomikronami (witaminy A, E i K). Niedobór cholesterolu i witaminy E powoduje zmiany w układzie nerwowym (demielinizacja nerwów), zmiany oczne (nocna ślepotą, zaburzenia ostrości widzenia, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki). We krwi występuje akantocytoza (zmieniony skład błony komórkowej erytrocytów), czas życia erytrocytów jest skrócony. Abetalipoproteinemia jest spowodowana defektami genetycznymi MTP, które zaburzają syntezę lipoprotein wewnątrz komórek śluzówki jelita i wątroby.

4.6.2. Rodzinna hipobetalipoproteinemia

Cecha autosomalna, dominująca. Efekt różnych mutacji w apo B, od całkowitego braku po mało zmienione białko. Częstość postaci heterozygotycznych ocenia się na 1/500 do 1/1000. U homozygot stężenie cholesterolu całkowitego od 25 do 70 mg/dL, w tym cholesterol LDL od 0 do 21 mg/dL. Frakcja HDL prawidłowa, lub nieco obniżona (ryc. 4.9). Brak jest chylomikronów po posiłku

tłuszczowym, występuje akantocytoza i objawy neurologiczne analogiczne jak w abetalipoproteinemii. Oboje rodzice mają obniżone stężenie cholesterolu i reprezentują postacie heterozygotyczne. Apo B i cholesterol LDL stanowią u nich od 1/4 do 1/2 wartości normalnych (cholesterol całkowity 90-140 mg/dL, cholesterol LDL rzędu 30-50 mg/dL). Stężenie cholesterolu HDL normalne lub nieco podwyższone. U heterozygot stężenie cholesterolu LDL jest obniżone (do ok. 50%), w pojedynczych wypadkach opisano upośledzenia wchłaniania, hipowitaminozy E i A oraz objawy neurologiczne.

4.6.3. Hipolipoproteinemie wtórne

Obniżone poziomy lipidów wtórnie mogą wystąpić w chorobach powodujących zaburzenia wchłaniania, w przewlekłej niedokrwistości, oraz w przebiegu chorób doprowadzających do znacznego wyniszczenia organizmu, jak choroby nowotworowe i gruźlica.

5. PATOMECHANIZMY I DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ RÓWNOWAGI KWASOWO-ZASADOWEJ

Andrzej Szutowicz

Organizm człowieka w wyniku przemian metabolicznych produkuje duże ilości CO₂ oraz kwasów nietlotnych: siarkowego, fosforowego, mlekowego, solnego, acetooctowego i β -hydroksymasłowego (tab. 5.1). CO₂ po uwodnieniu tworzy kwas węglowy, który z tego powodu nazywamy kwasem lotnym. Zdecydowana większość CO₂ powstaje w trzech reakcjach dekarboksylacji stanowiących etapy metabolizmu tlenowego komórek.

Podstawowym źródłem kwasów nietlotnych w organizmie jest metabolizm aminokwasów zawierających siarkę, aminokwasów kationowych, metabolizm fosfoprotein, fosfolipidów, lipoliza i beztlenowy metabolizm glukozy. Mimo tej ogromnej produkcji kwasów pH płynów ustrojowych pozostaje na względnie stałym poziomie (tab. 5.1, ryc. 5.1). Utrzymanie homeostazy jonu wodorowego ma podstawowe znaczenie dla przebiegu wszystkich przemian biochemicznych ustroju.

Równowaga kwasowo-zasadowa ma charakter bilansowy i jest odzwierciedleniem dwóch podstawowych procesów: ciągłej produkcji CO₂ i nietlotnych kwasów w przemianach komórkowych i jednoczesnego ciągłego wydalania CO₂ i jonów wodorowych z ustroju (tab. 5.1). Wobec ogromnej zarówno produkcji jak i wydalania CO₂ oraz nietlotnych jonów wodorowych nawet niewielkie zaburzenia bilansu mogą pociągać za sobą gwałtowne zmiany stanu równowagi kwasowo-zasadowej. Czynnikiem łagodzącymi te zaburzenia jest buforowanie zewnątrzkomórkowe oraz wewnątrzkomórkowe, w którym istotną rolę odgrywa metabolizm komórkowy (ryc. 5.1).

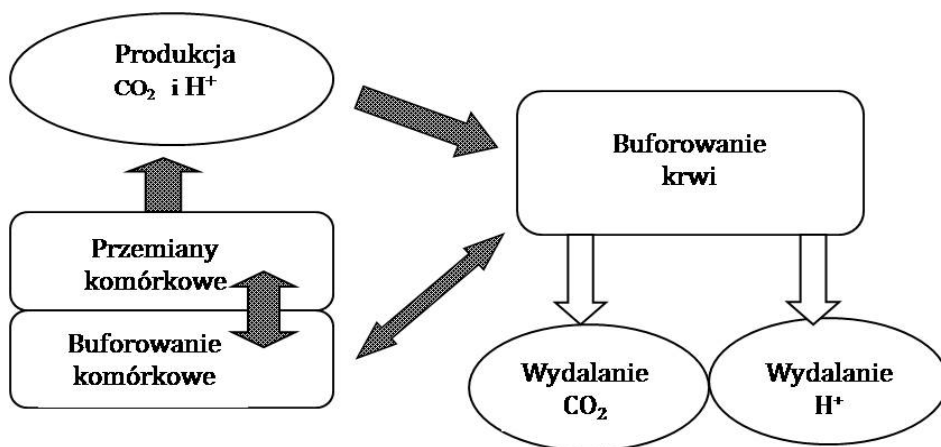
Utrzymanie względnie stałego poziomu jonów wodorowych w płynach ustrojowych jest możliwe dzięki:

- istnieniu układów buforowych – bufory krwi i bufory wewnątrzkomórkowe,
- dostosowaniu wydalania CO₂ przez płuca do jego produkcji – regulacja oddechowa gospodarki kwasowo zasadowej,
- dostosowaniu wydalania nietlotnych jonów wodorowych z moczem do ich produkcji - regulacja nieoddechowa (metaboliczna) gospodarki kwasowo zasadowej.

Tabela 5.1. Szacunkowy bilans kwasów u osoby dorosłej w stanie spoczynku

Kwas	Droga syntezy mmole/24 godz.	Droga eliminacji mmole/24 godz.
CO ₂	Oddychanie tkankowe 20.000	Płuca <u>20.000</u>
Kwas mlekowy	Glikoliza 1.300	Glukoneogeneza 1.300 Utlenianie
Wolne kwasy tłuszczowe	Lipoliza 600	Reestryfikacja 600 Utlenianie
Ketokwasy	Ketogeneza 400	Utlenianie 400
H ⁺ (HCl)	Synteza mocznika 1.100 Osteogeneza*	Utlenianie aminokwasów 1.100 Wydalenie z moczem
H ₃ PO ₄	Defosforylacje >100.000	Refosforylacje >100.000 Wydalenie z moczem <u>50</u>
H ₂ SO ₄	Aminokwasy siarkowe 40	Wydalenie z moczem <u>40</u>

*Szczególnie intensywna u dzieci. Synteza netto nietlotnych kwasów u osób dorosłych wynosi około 1 mmola/kg wagi/24 godz. *U niemowląt wzrost kości powoduje większą syntezę netto jonów wodorowych sięgającą 2 mmoli/kg wagi/24 godz. Ta ilość nietlotnych kwasów musi być wydalona przez nerki. Stanowi ona <0.1% całkowitego obrotu metabolicznego nietlotnych kwasów (tłusty druk, podkreślony). Natomiast niemal 100% syntetyzowanego CO₂ jest wydalone przez płuca.



Ryc. 5.1 Homeostaza jonów wodorowych

5.1. Układy buforowe organizmu

Kluczową rolę w homeostazie kwasowo-zasadowej odgrywa krew. Dzieje się to z dwóch powodów:

- we krwi znajdują się bufony w stężeniach istotnych dla stabilizacji stężenia jonów wodorowych, z których najważniejszy jest bufor wodorowęglanowy;
- krew kontaktuje tkanki produkujące CO_2 i H^+ z narządami odpowiedzialnymi za wydalanie tych metabolitów (nerki i płuca) (ryc.5.1).

Podstawową cechą buforu jest jego zdolność do łagodzenia zmian stężenia jonu wodorowego w roztworach wodnych. Jest ona determinowana właściwościami wchodzącego w jego skład słabego kwasu. Kwas ten tylko częściowo dysocjuje na jon wodorowy oraz pochodny anion, który z kolei ma zdolność wiązania jonu wodorowego. Anion taki jest więc zasadą.

Chemicznie można opisać bufor jako wodny roztwór słabego kwasu i sprzężonej z nim zasady, w którym stężenia tych składników przy danym pH zdeterminowane są wartością stałej dysocjacji (K) słabego kwasu.

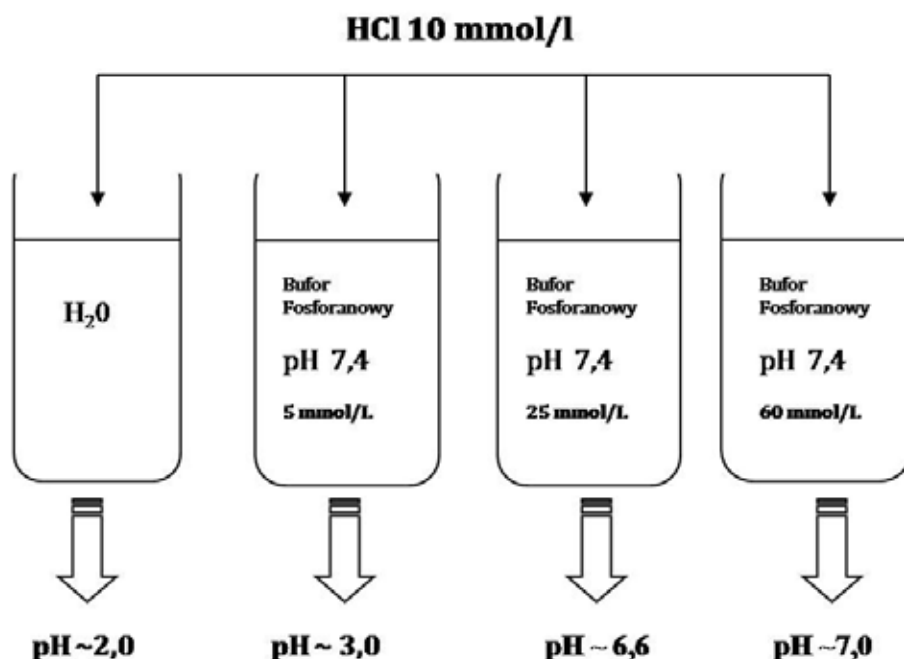


5.1.1. Pojemność buforowa

Pojemność buforowa jest to zdolność do przeciwdziałania zmianom pH roztworu, w którym znajduje się bufor. Bufory różnią się od siebie zdolnością do przeciwdziałania zmianom pH, a więc różnią się pojemnością buforową. Podstawowymi czynnikami wpływającymi na pojemność buforową buforu są jego stężenie oraz pH (ryc.5.2). Przy pH buforu równym jego stałej dysocjacji (pK) stosunek stężeń kwasu do pochodnego anionu wynosi 1:1. Dlatego przy danym stężeniu buforu jego pojemność buforowa jest w tych warunkach największa. Bufor traci zdolność buforowania, gdy różnica między aktualnym pH roztworu i pK jest większa od 1. W przestrzeni wewnątrzkomórkowej, w której pH wynosi około 7.0-7.1, głównym buforem jest bufor fosforanowy $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, którego pK jest równe 6.8. Jego stężenie w PWK wynosi około 100 mM (mięśnie). Z kolei w przestrzeni pozakomórkowej przy fizjologicznym pH 7.4, stężenie buforu fosforanowego jest kilkadziesiąt razy mniejsze - około 1.0-1.5 mmol/L i nie ma istotnego znaczenie dla pojemności buforowej krwi (ryc. 5.2).

5.1.2. Bufor wodorowęglanowy

Najważniejszym układem buforowym ustroju jest **bufor wodorowęglanowy**. Znajduje się on głównie w PPK. Składnikami tego buforu są kwas węglowy – H_2CO_3 oraz jony wodorowęglanowe – HCO_3^- .

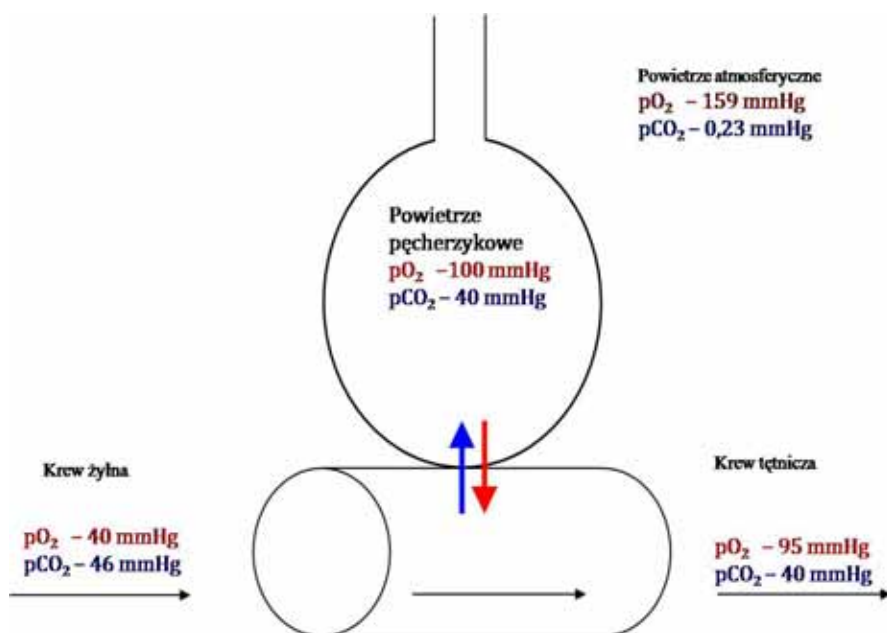


Ryc. 5.2. Pojemność buforowa w buforach nietlotnych

Przy prawidłowym pH PPK równym 7.4 stosunek $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$ wynosi 20:1. Jest więc poza nominalnym zakresem buforowania. Jednakże unikalne właściwości tego buforu związane są z faktem, że kwas węglowy ulega spontanicznej dehydratacji do CO_2 . Reakcja ta jest przyspieszana wielokrotnie przez obecny w tkankach enzym anhidrazę węglanową. Reakcja uwodnienia CO_2 , - odwodnienia H_2CO_3 jest odwracalna i w stanie równowagi chemicznej przesunięta w kierunku CO_2 . Stosunek stężeń $[\text{CO}_2] / [\text{H}_2\text{CO}_3]$ wynosi 800 :1. Dzięki anhidrazie węglanowej te dwie postacie dwutlenku węgla tworzą funkcjonalną jedność. CO_2 swobodnie dyfunduje przez ścianę pęcherzyków płucnych pomiędzy krwią a powietrzem pęcherzykowym. Gdyby jednak skład fazy gazowej w pęcherzykach był zbliżony do powietrza atmosferycznego, w którym ciśnienie parcjalne CO_2 , wynosi ok. 0,23 mmHg, to bezpośredni z nią kontakt krwi powodowałby całkowitą utratę CO_2 i H_2CO_3 z krwi. W takich warunkach układ buforu wodorowęglanowego przestałby istnieć. Jednakże w atmosferze pęcherzyków płucnych ciśnienie parcjalne CO_2 wynosi 40 mmHg i jest znacznie wyższe niż w powietrzu atmosferycznym (śluza gazowa) (ryc. 5.3). Umożliwia to funkcjonowanie buforu wodorowęglanowego w ustroju. Wobec istnienia ciągłej wymiany między CO_2 krwi i powietrzem pęcherzyków płucnych układ buforu wodorowęglanowego jest układem otwartym.

Unikalne właściwości i funkcjonowanie buforu wodorowęglanowego wynikają więc z:

- możliwości swobodnej dyfuzji CO_2 pomiędzy krwią, a powietrzem pęcherzykowym



Ryc. 5.3 Śluz gazowa w pęcherzykach płucnych

- istnienia przestrzeni gazowej w pęcherzykach płucnych o względnie wysokiej i regulowanej zawartości CO_2
- natychmiastowego uwodnienia CO_2 lub odwodnienia H_2CO_3 przez anhidrazę węglanową.

Wymienione wyżej właściwości upraszczają znacznie matematyczną formułę równania Hendersona–Hasselbalcha dla buforu wodorowęglanowego.

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \quad (2)$$

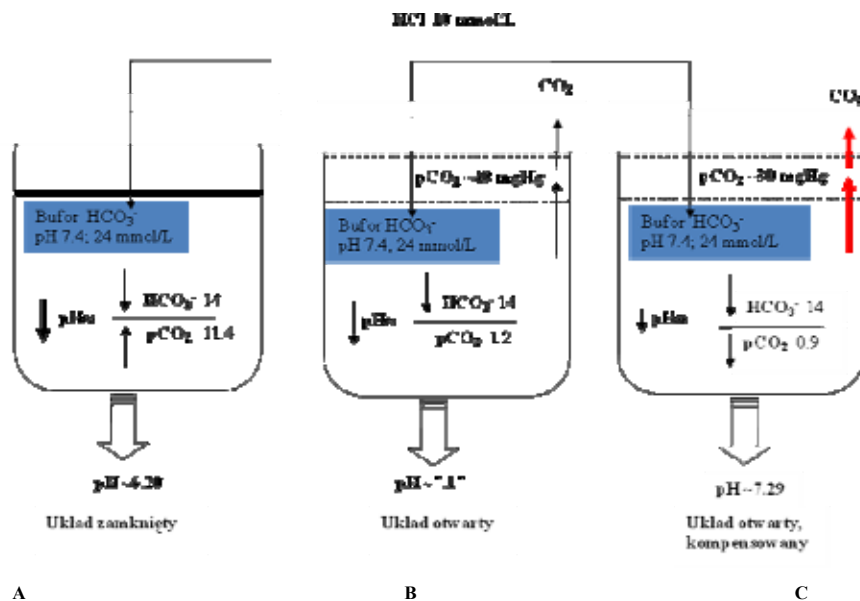
gdzie $\text{pK} = -\log$ stałej dysocjacji $\text{pK H}_2\text{CO}_3 = 6,1$

Równanie to możemy uprościć do proporcji:

$$\text{pH} \approx \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\alpha \times \text{pCO}_2]} \quad (3)$$

gdzie α = Współczynnik rozpuszczalności CO_2 w osoczu (w temperaturze 37°C wynoszący $0,03 \text{ mmol/L/mmHg}$).

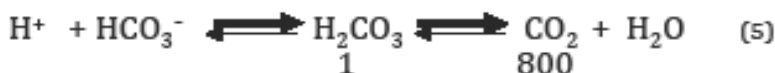
Wynika z niego, że pH buforu jest wprost proporcjonalne do $[\text{HCO}_3^-]$ i odwrotnie proporcjonalne do $\alpha \times \text{pCO}_2$. Istnienie śluzy gazowej o kontrolowanej zawartości CO_2 znacznie zwiększa pojemność buforu wodorowęglanowego (ryc. 5.4). Maksymalne efekty buforujące uzyskuje się wtedy gdy zawartość CO_2 w pęcherzykach płucnych „dopasowuje” się do stężenia komponenty zasadowej buforu we krwi, tzn. do stężenia HCO_3^- . (i *vice versa*). Dzięki temu dochodzi do aktywnego przeciwdziałania zmianom pH. Zjawisko to nosi nazwę kompensacji. Znaczenie CO_2 jako lotnej komponenty układu buforowego demonstruje przykład (ryc. 5.4).



Ryc. 5.4. Bufor wodorowęglanowy w: A. układzie zamkniętym; B. układzie otwartym; C. otwartym, kompensowanym

Silny kwas (np. HCl) dysocjuje w sposób całkowity i w związku z tym istotnie obniża pH roztworu. Jony wodorowe powstałe w wyniku dysocjacji silnego kwasu w roztworze buforu wodorowęglanowego są zobojętniane przez jony HCO_3^- . Powoduje to spadek stężenia HCO_3^- (zasad buforowych) z jednoczesnym

powstaniem równoważnych ilości H_2CO_3 . Kwas węglowy ulega z kolei natychmiastowej dehydratacji tworząc wodę i CO_2 . Ten ostatni ulega wydaleniu przez płuca zapobiegając wzrostowi pCO_2 (ryc. 5.4B)



Zgodnie z równaniem Hendersona-Hasselbalcha, pH buforu wodorowęglanowego zależy od stosunku stężeń HCO_3^- do CO_2 . Pojemność buforu wodorowęglanowego jest największa kiedy funkcjonuje on w układzie otwartym (kiedy wzrost H_2CO_3 powstającego w wyniku buforowania mocnego kwasu nie doprowadza do wzrostu prężności CO_2) (ryc. 5.4B) oraz kompensowanym (kiedy prężność CO_2 może być w sposób aktywny regulowana niwelując zmiany pH buforu) (ryc. 5.4C).

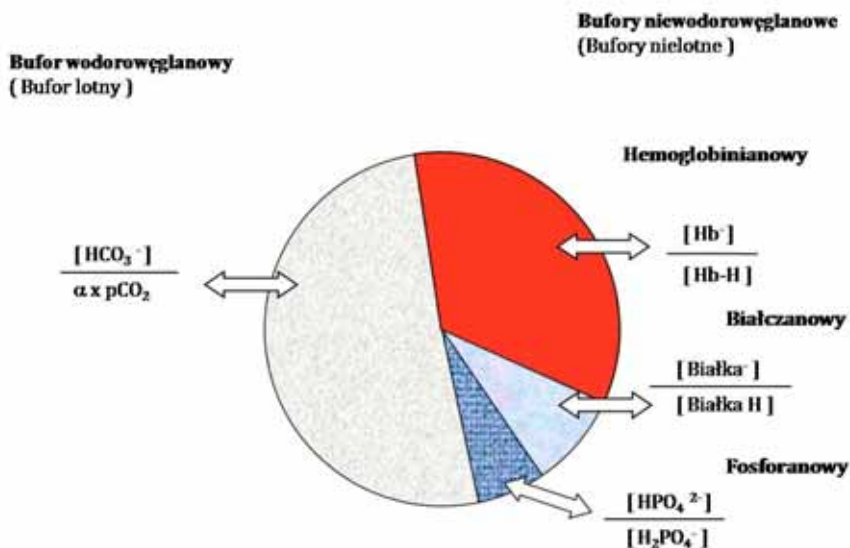
5.1.3. Zasady buforowe krwi

Bufor wodorowęglanowy jest najważniejszym, ale nie jedynym układem buforowym krwi. Wprawdzie cała regulacja stanu gospodarki kwasowo- zasadowej odbywa się poprzez zmiany stężenia składników tego właśnie buforu, ale zabezpiecza on netto nieco ponad połowę (52%) pojemności buforowej krwi. Pozostałe bufory, to bufor hemoglobinianowy (ok. 35%), bufor białczanowy (ok. 8%) oraz fosforanowy (ok. 5% pojemności buforowej). Bufory te zaliczane są do buforów zamkniętych. Ich stężenia nie dostosowują się bowiem w sposób aktywny do stanu gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju (ryc. 5.5). Niemniej dzięki współdziałaniu z buforem wodorowęglanowym tworzą układ, w którym komponenta kwasowa może podlegać regulacji. Prawidłowy zasób zasad buforowych krwi wynosi 48 mEq/L.

Ze względu na istotny udział anionów buforów nietlotnych w homeostazie jonu wodorowego, należy uwzględnić ich obecność w proporcji opisującej stan gospodarki kwasowo-zasadowej:

$$\text{pH}_{\text{krwi}} \approx \frac{[\text{HCO}_3^-] + [\text{Hb}^-] + [\text{Białka}^-] + [\text{HPO}_4^{2-}]}{[\alpha \times \text{pCO}_2]} \quad (6)$$

Licznik tego równania jest sumą stężeń komponent zasadowych wszystkich układów buforowych i nosi nazwę **zasad buforowych – ZB** (buffer base – BB). Biorąc pod uwagę ogromną produkcję, jak i wydalenie CO_2 , o wielkości mianownika decyduje w praktyce wartość pCO_2 .



Ryc. 5.5. Układy buforowe krwi

Istotną cechą charakteryzującą parametr ZB jest fakt, że stężenie zasad buforowych praktycznie nie zależy od zmian pCO_2 . Stężenie wodorowęglanów zmienia się proporcjonalnie do zmian prężności CO_2 , a buforów nielotnych odwrotnie proporcjonalnie do zmian prężności CO_2 . Stężenie ZB określa więc stan tej komponenty równowagi kwasowo-zasadowej, która nie jest związana z funkcjami oddechowymi (komponenta nie oddechowa = metaboliczna).

Dlatego uwagi stan gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju można opisać uproszczoną proporcją:

$$\text{pH}_{\text{krwi}} \approx \frac{[\text{ZB}]}{[\alpha \text{pCO}_2]} \quad (7)$$

W proporcji tej ZB określają komponentę nie oddechową (metaboliczną), a prężność CO_2 określa komponentę oddechową tego złożonego układu buforowego.

5.1.4. Zasady buforowe płynu śródmiąższowego

W płynie śródmiąższowym, stężenie zasad buforowych jest niższe ze względu na nieobecność buforu hemoglobinianowego i niskie stężenie białek i wynosi

ono około 30 mEq/L. Całkowity zasób zasad buforowych w PPK (krew + płyn śródmiąższowy) wynosi około 550 mEq.

5.1.5. Zasady buforowe przestrzeni wewnątrzkomórkowej

Głównymi zasadami buforowymi PWK są fosforany i białczany. Stężenie jonów wodorowych w cytoplazmie jest wyższe niż w PPK i pH wynosi około 7.0. Natomiast pH wewnątrz mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej i jądra komórkowego jest wyższe niż w cytoplazmie: 7.0-7.4. Pojemność buforowa PPK stanowi około 50% całkowitej pojemności buforowej organizmu człowieka wynoszącej 2100 mEq.

5.2. Działanie buforów w organizmie

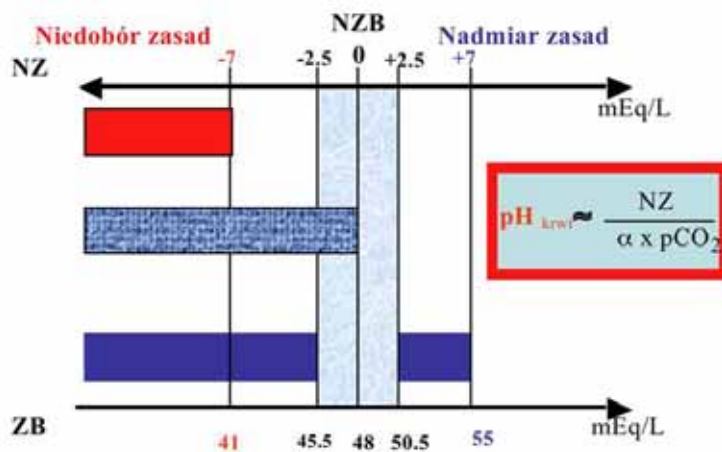
5.2.1. Buforowanie kwasów nietlotnych

Z powyższych zależności wynika, że stan gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju można określić na podstawie trzech parametrów: **pH krwi, pCO₂ oraz ZB krwi.**

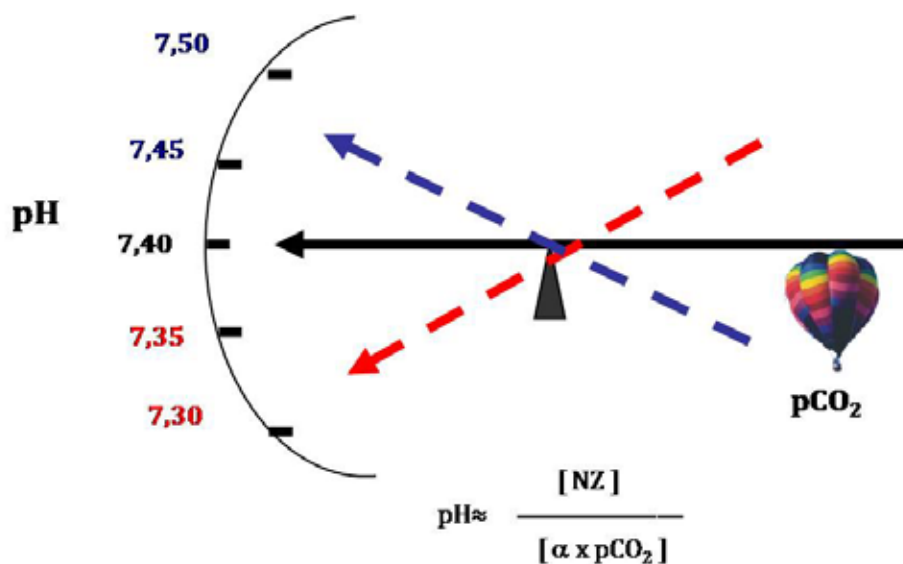
Prostym matematycznym odzwierciedleniem różnic pomiędzy aktualnym stężeniem zasad buforowych (ZB), a należnym (referencyjnym) stężeniem zasad buforowych (NZB) jest parametr nazywany **nadmiarem (niedoborem) zasad (NZ)** Base Excess (BE) (ryc. 5.6).

Wartość NZ daje lekarzowi bezpośredni wgląd w zmiany stężenia zasad buforowych krwi. Pozwala on ocenić czy w organizmie istnieje nadmierna akumulacja czy utrata netto nietlotnych kwasów. Parametr ten może być podstawą do obliczeń ilości podawanych pacjentowi wodorowęglanów – w razie zaistnienia takiej konieczności.

Zwiększenie zasobu zasad buforowych (>+2.5 mEq/L NZ) powoduje wzrost pH krwi –zasadowicę metaboliczną, a ich spadek (<-2.5 mEq/L NZ) obniżenie pH krwi – kwasicę metaboliczną (ryc. 5.7).



Ryc. 5.6. Nadmiar i niedobór zasad jako wynik buforowania nadmiaru lub niedoboru kwasów nietlotnych

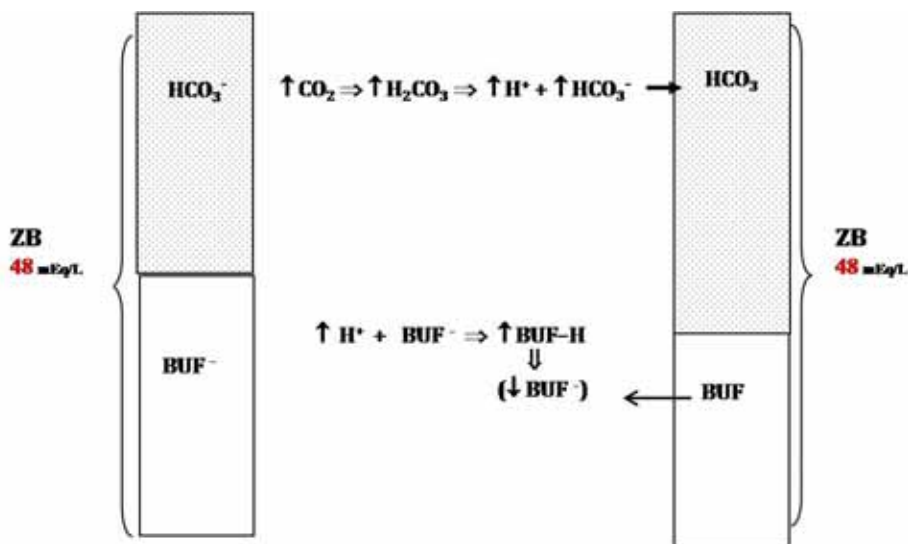


Ryc. 5.7. Zależności między parametrami krwi w niekompensowanych zaburzeniach metabolicznych gospodarki kwasowo zasadowej

5.2.2. Buforowanie CO_2

Następstwem ostrego wzrostu pCO_2 jest zwiększenie stężenia H_2CO_3 i jego natychmiastowa dysocjacja do jonów H^+ i HCO_3^- . Jony wodorowe są buforowane głównie przez aniony hemoglobinianowe i inne bufory nietlotne. Tak więc, wzrostowi ilości HCO_3^- towarzyszy równoważny spadek ilości buforów nietlotnych. W efekcie ogólny zasób zasad buforowych (ZB) pozostaje niezmienny. Przyjmuje się, że wzrostowi pCO_2 o 10 mmol/L towarzyszy wzrost HCO_3^- o około 1 mmol/L (ryc. 5.8).

W przypadku ostrego spadku pCO_2 zmiany stężeń buforów nietlotnych i HCO_3^- odbywają się w odwrotnym kierunku.



Ryc.5.8. Buforowanie CO_2 (BUF^- , aniony buforów nietlotnych; $\text{BUF}=\text{H}$, kwasy buforów nietlotnych; ZB, zasady buforowe)

5.2.3. Buforowanie komórkowe

System buforowy krwi wspomagany jest buforowaniem komórkowym. Głównymi buforami w tym przedziale są bufor fosforanowy i białczanowy. Należy również pamiętać, że komórki są zarówno źródłem, jak i akceptorem CO_2 oraz nietlotnych jonów wodorowych pod postacią kwasów- fosforanowego, siarkowego, mlekowego, ketokwasów, aminokwasów itp.

Zawartość nietlotnych kwasów i pochodnych anionów jest w przybliżeniu odzwierciedlana przez **łukę anionową** (aniony zalegające, residual anions, anion

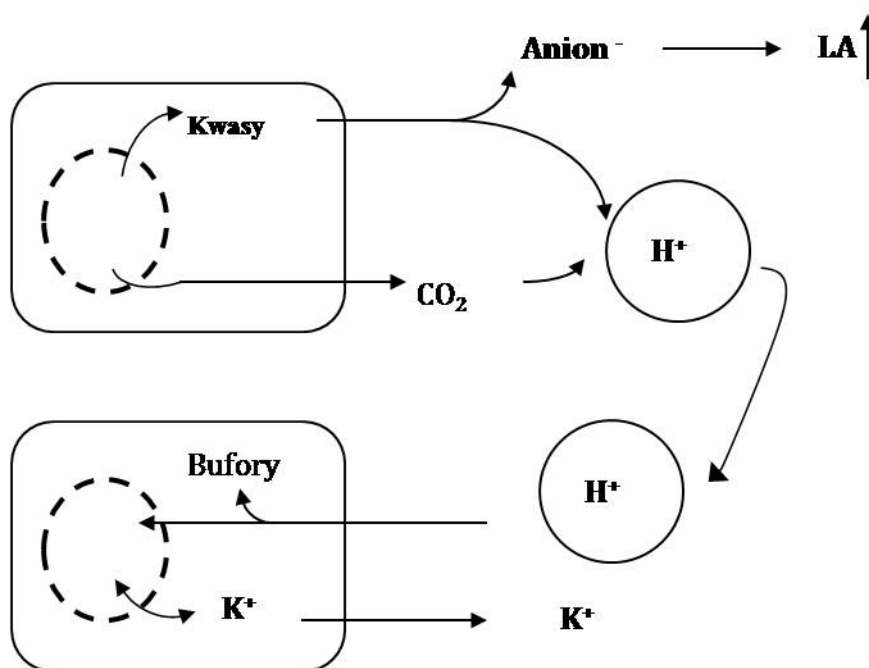
gap). Wartość tą wylicza się z różnicy pomiędzy stężeniem w surowicy sodu, a sumą stężeń chlorków i wodorowęglanów.

$$LA = [Na^+] - ([Cl^-] + [HCO_3^-]) \quad (8)$$

Transport jonu wodorowego H^+ przez błony plazmatyczne jest związany z przesunięciem na zewnątrz kationu potasowego (K^+), który jest głównym kationem przestrzeni wewnątrzkomórkowej (ryc. 5.9).

Przyrost wartości LA spowodowany może być zarówno zwiększonym wytwarzaniem anionów zalegających, jak również zmniejszonym ich wydalaniem (np. kwasica azotowa). Jednocześnie komórki mogą być akceptorem jonów wodorowych. Są one tam wiązane zarówno przez wewnątrzkomórkowe układy buforowe (fosforanowe, białczanowe), jak i zużywane w procesie metabolizmu w związkach nie dysocjujących (np. glukoneogeneza).

Nie jest znany specyficzny wymiennicz $H^+ \leftrightarrow K^+$ (ryc. 5.9). Stężenie jonu potasowego we krwi jest pośrednim wskaźnikiem wielkości buforowania komórkowego.



Ryc. 5.9. Buforowanie komórkowe

Ocena kalemii jako wskaźnika buforowania komórkowego musi zawsze uwzględniać inne czynniki wpływające na poziom potasu. Należy pamiętać, że stężenie potasu w osoczu zależy od wydajności wydalniczej nerek dla tego jonu oraz utraty go innymi drogami np. z kałem biegunkowym (patrz rozdz.6).

5.3. Regulacja gospodarki kwasowo-zasadowej

Utrzymanie równowagi kwasowo-zasadowej ustroju zależy z jednej strony od wytwarzania ogromnych ilości CO_2 (ok. 20 mol/dobę) i H^+ (ponad 100 moli brutto, a z drugiej strony od równoczesnego ich ponownego, odpowiedniego ilościowo wydalania i zużycia (tab. 5.1). CO_2 i H^+ są produktami podstawowych procesów metabolicznych. Dlatego nie istnieją systemowe mechanizmy regulujące gospodarkę kwasowo-zasadową ustroju na tym etapie. Wszystkie mechanizmy regulujące gospodarkę kwasowo-zasadową są więc skoncentrowane na etapach wydalania CO_2 i H^+

5.3.1. Regulacja wydalania CO_2

Proces ten komplikuje fakt, że płuca spełniają również zasadniczą rolę w regulacji podaży tlenu – podstawowego substratu do utleniania komórkowego służącego syntezie związków wysokoenergetycznych. Regulacja ta odbywa się poprzez układy receptorów, których impulsy, są synchronizowane i przetwarzane przez ośrodek oddechowy. Decydują one (w ograniczonym zakresie) o wielkości wydalania CO_2 i podaży O_2 . Pierwszy z tych układów stanowią komórki receptorowe w zatoce tętnicy szyjnej i łuku aorty (receptory obwodowe). Są one wrażliwe na obniżoną zawartość tlenu we krwi. Drugi ośrodek zlokalizowany jest w rdzeniu przedłużonym (receptory centralne) i reaguje w głównej mierze na wzrost stężenia H^+ w płynie mózgowo-rdzeniowym wynikający ze wzrostu pCO_2 . Trzeci układ znajduje się w ścianie klatki piersiowej i przeponie (mechanoreceptory płuc). Przesyła on swoje impulsy za pośrednictwem nerwu błędnego do ośrodka oddechowego. Zadaniem tego systemu jest optymalizacja pracy mięśni oddechowych (automatyczna regulacja wdechu i wydechu), a nie pierwotna regulacja gospodarki CO_2 i O_2 .

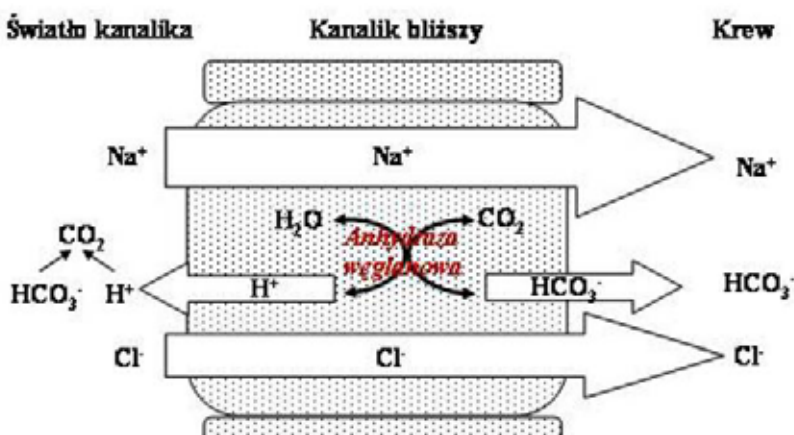
5.3.2. Regulacja gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju przez nerki

Regulacja gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju przez nerki podporządkowana jest podstawowym fizjologicznym funkcjom nerek: filtracji kłębkowej oraz transportowi kanalikowemu. Filtracja kłębkowa wynosi około 100 ml/min. Dlatego też jej następstwem jest pojawienie się w płynie kanalika bliższego (przesącz pierwotny) ogromnych ilości elektrolitów, w tym wodorowęglanów i innych związków drobnocząsteczkowych w stężeniach odpowiadających ich poziomowi w osoczu. Dlatego związki te muszą ulec reabsorpcji zwrotnej. Tą

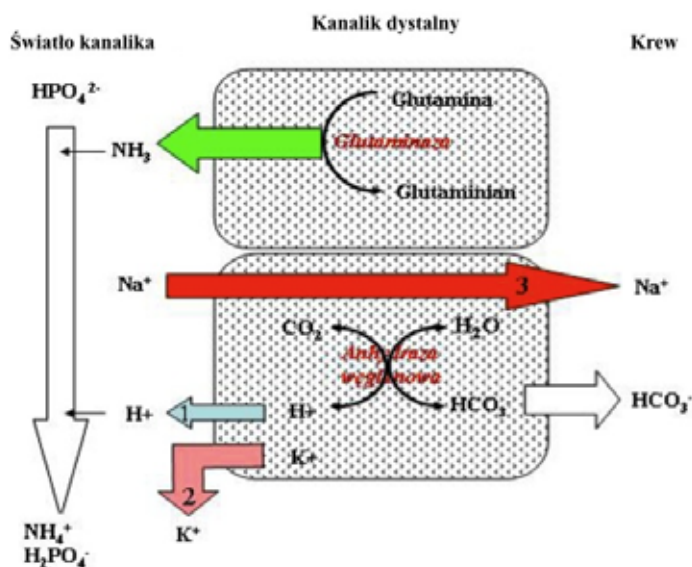
zachowawczą funkcję spełnia głównie część proksymalna nefronu. Polega ona na aktywnej reabsorpcji kationu sodowego, której towarzyszy transport zwrotny anionów: aktywny - wodorowęglanów i bierny – chlorków (ryc.5.10). Oznacza to, że przy względnie stabilnej resorpcji sodu, zmiany reabsorpcji wodorowęglanów pociągają za sobą przeciwstawne zmiany reabsorpcji chlorków (ryc.5.10).

Natomiast jedną z podstawowych funkcji części dystalnej nefronu jest wyprodukowanie i transport do krwi wodorowęglanów w ilości zbliżonej do wytworzonych (netto) w ustroju nietlotnych kwasów. Jest to możliwe dzięki zdolności tej części nefronu do sekrecji jonu wodorowego do światła kanalika (ryc. 5.11). Proces ten jest częściowo związany z aktywną, zależną od aldosteronu, reabsorpcją jonów sodowych i sekrecją jonów potasowych. Reabsorpcja 3 kationów Na^+ jest związana z sekrecją 1 jonu H^+ i 2 jonów K^+ .

Drugim istotnym warunkiem wydalania jonów H^+ jest obecność w moczu odpowiadających im ilości zasad - akceptorów jonu wodorowego. Są to amoniak oraz fosforany dwuzasadowe (ryc.5.11). Oznacza to, że suma wydalaných jonów amonowych oraz fosforanów jednozasadowych (kwaśność miareczkowa) odzwierciedla netto produkcję nietlotnych kwasów przez ustrój. W moczu o pH ok. 6 dwie trzecie jonów wodorowych wydalone jest w postaci NH_4^+ , a 1/3 jako kwaśność miareczkowa.



Ryc. 5.10 Reabsorpcja zwrotna HCO_3^- w kanalik bliższym (proksymalnym)



Ryc. 5.11. Wydalanie jonów wodorowych nietlotnych w kanalik dalszym (dystalnym)

W moczu o pH obojętnym całość jonów H^+ jest wydalana w postaci NH_4^+ (ryc. 5.11) przy jednoczesnej utracie około 20 mmol HCO_3^- w litrze. Opisane funkcje części dystalnej nefronu podlegają regulacji i są w znacznej mierze uzależnione od stanu gospodarki kwasowo-zasadowej i wodno-elektrolitowej (patrz rozdz. 6).

5.4. Laboratoryjna ocena zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej

Laboratoryjną ocenę stanu gospodarki (równowagi) kwasowo-zasadowej (RKZ) ustroju dokonuje się w oparciu o wyniki oznaczeń we krwi pH, zasad buforowych ZB, wyrażonych jako NZ, oraz prężności dwutlenku węgla (pCO_2), zgodnie z opisaną wcześniej proporcją:

$$pH_{\text{krwi}} \approx \frac{ZB \text{ (NZ)}}{\alpha \times pCO_2} \quad (9)$$

Istotnym uzupełnieniem badania jest każdorazowe oznaczanie zawartości tlenu we krwi (pO_2) i wysycenia hemoglobiny tlenem (HbO_2).

5.4.1. *Ogólne zasady pobierania krwi do badania RKZ*

Oceny stanu gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju dokonuje się w oparciu o analizę krwi pełnej. Jednak przeniesienie warunków *in vivo* do pomiarów w warunkach *in vitro* niesie za sobą szereg problemów, z których najważniejsze to:

- pobrana krew powinna odzwierciedlać warunki panujące we krwi wypływającej z płuc (**krew tętnicza**);
- ze względu na niską zawartość CO₂ w powietrzu atmosferycznym wynaczyniona krew nie może mieć z nim kontaktu (**anaerobowe warunki pobierania**);
- z powodu glikolizy zachodzącej w komórkach krwi pobrana próbka powinna być **natychmiast schłodzona i szybko dostarczona do laboratorium**;
- ponieważ temperatura ma istotny wpływ na pomiar pH i pCO₂ krwi, samo oznaczenie powinno być wykonane w temperaturze ciała pacjenta.

Metody pobierania krwi do oceny równowagi kwasowo – zasadowej:

Zalecaną metodą pobierania krwi jest:

- pobranie krwi z dużego nieuciśniętego **naczynia tętniczego** np. tętnicy promieniowej, udowej, szyjnej igłą atraumatyczną do **firmowej gazoszczelnej strzykawki**, zawierającej **heparynę** (5-10 U/ml);
- dostarczenie szczelnie zamkniętej strzykawki w łaźni lodowej w ciągu jednej godziny.

Dopuszczalnym sposobem pobrania krwi jest:

- pobranie z rozszerzonych naczyń włosowatych – ciepła opuszka palca, płatek uszny, pięta (niemowlęta) do heparynizowanej kapilary o pojemności 50-200 µl;
- dostarczenie szczelnie zamkniętej kapilary w temperaturze pokojowej w ciągu 30 minut.

5.4.2. *Błędy przy oznaczaniu parametrów RKZ*

Okolo 60% błędów stanowią błędy przedanalizyczne, do których należą: pęcherzyki powietrza w kapilarze do pobierania krwi, nieszczelne zamknięcie kapilar, skrzep, rozcieńczenie antykoagulantem, zbyt mała objętość próbki, zbyt długi czas między pobraniem a pomiarem, przechowywanie próbki nie schłodzonej. Przyczyny błędów analitycznych (wewnątrz laboratoryjnych) to: błędy kalibracji, niestabilność temperatury w komorze pomiarowej, zanieczyszczenie elektrody pomiarowej (osady białek), nieprawidłowy materiał biologiczny, zaburzenie przepływu w torze pomiarowym (skrzepy).

5.4.3. Wartości referencyjne dla parametrów RKZ krwi

Tabela 5.2. Wartości referencyjne parametrów RKZ krwi

Parametr - krew tętnicza	Zakres wartości referencyjnych
pH	7.37 - 7.43
pCO₂ (mmHg)	35 - 45
NZ (mmol/L)	0 ± 2.5
HCO₃⁻ (mmol/L)	21 - 26
pO₂ (mmHg)	71 - 104
HbO₂sat. (%)	92 - 96

Istotnym wzbogaceniem możliwości diagnostycznych w różnicowaniu zaburzeń RKZ są badania pomocnicze, z których najważniejsze to: elektrolity we krwi, pH moczu oraz wydalenie jonu wodorowego z moczem, testy czynnościowe (respirometria, test zakwaszenia moczu itp.), badania dodatkowe np. stężenie glukozy, mocznika, kwasu mlekowego itp. (tab. 5.3).

Tabela 5.3. Wartości referencyjne parametrów pomocniczych w ocenie zaburzeń RKZ.

Materiał biologiczny	Parametr	Zakres wartości referencyjnych
Surowica	Potas	3.5 - 5.0 mmol/L
	Chlorki	97 - 108 mmol/L
	Luka Anionowa	8 - 16 mmol/L
Mocz	pH	4.5 - 8.0
	Wydalenie H⁺	30 - 80 mmol/L
	NH₄⁺	30 - 50 mmol/L
	Kwaśność miareczkowa	10 - 30 mmol/L
	HCO₃⁻	< 1 mmol/L

5.4.4. Zasady interpretacji wyników badania RKZ

Interpretacja wyniku powinna być przeprowadzana w trzech etapach:

- Ocena wartości pH – kwasica czy zasadowica;
- Określenie przyczyny prowadzącej do obserwowanej zmiany pH – metaboliczna czy oddechowa;
- Czy zostały uruchomione mechanizmy kompensacyjne? – zaburzenie nieskompensowane (niewyrównane), częściowo skompensowane (częściowo wyrównane), skompensowane (wyrównane).

Ocena stanu gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju jest bardzo utrudniona w przypadku:

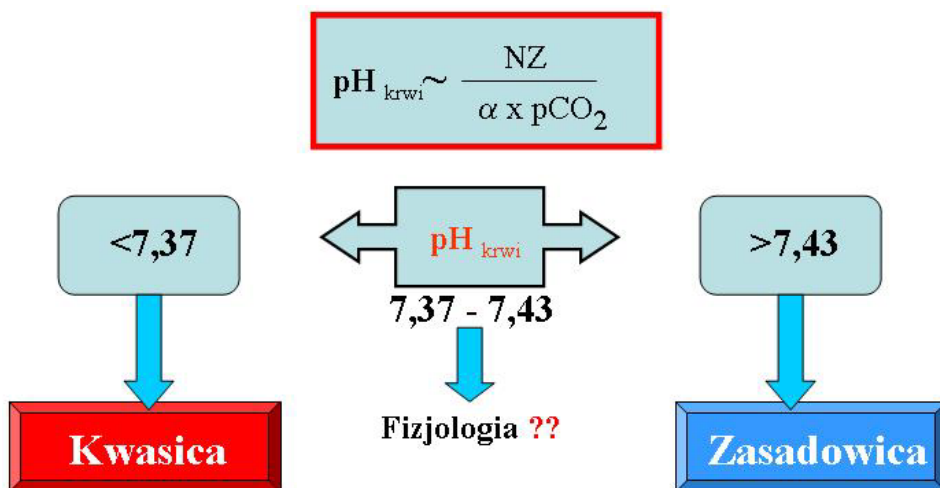
- mieszanych zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej ustroju,
- zaburzeń w pełni skompensowanych, w których pH znajduje się w zakresie wartości referencyjnych.

Analiza laboratoryjna jest badaniem pomocniczym. Pełną diagnostykę zaburzeń kwasowo- zasadowych można przeprowadzić tylko w oparciu o stan kliniczny pacjenta.

5.5. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej

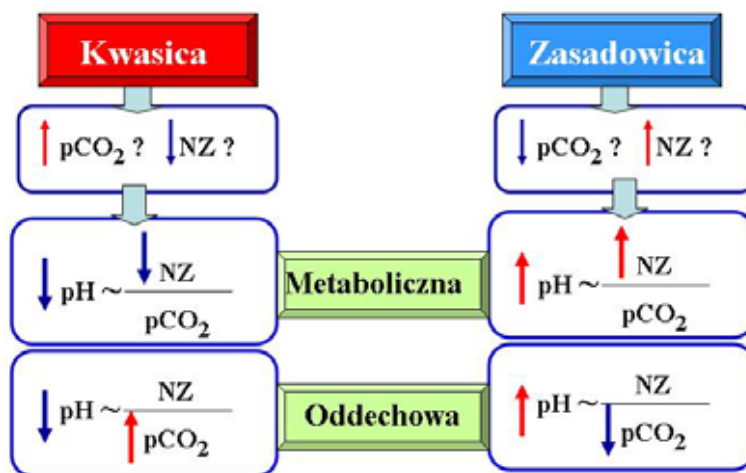
5.5.1. Etap I: ocena pH krwi

Pierwszym etapem w określeniu rodzaju zaburzenia RKZ jest ocena pH względem wartości referencyjnych. Wartość pH poniżej 7.37 świadczy o kwasicy, a wartość pH powyżej 7.43 o zasadowicy (ryc.5.12).



Ryc. 5.12. Ocena pH krwi

5.5.2. Etap II: określenie pierwotnej przyczyny zaburzenia



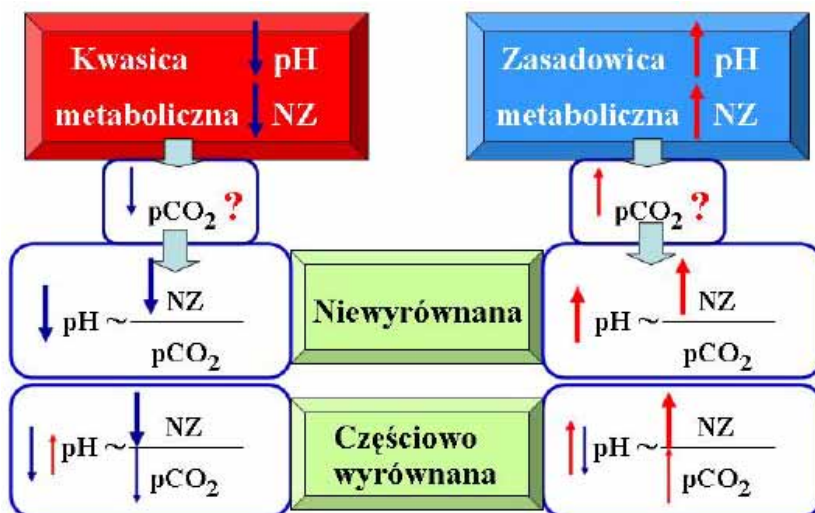
Ryc. 5.13. Ocena pierwotnej przyczyny zaburzenia

Przyczyną kwasicy może być spadek NZ (kwasica metaboliczna) lub wzrost pCO_2 (kwasica oddechowa), a przyczyną zasadowicy może być wzrost NZ (zasadowica metaboliczna, lub spadek pCO_2 (zasadowica oddechowa).

5.5.3. Etap III : ocena kompensacji zaburzeń metabolicznych

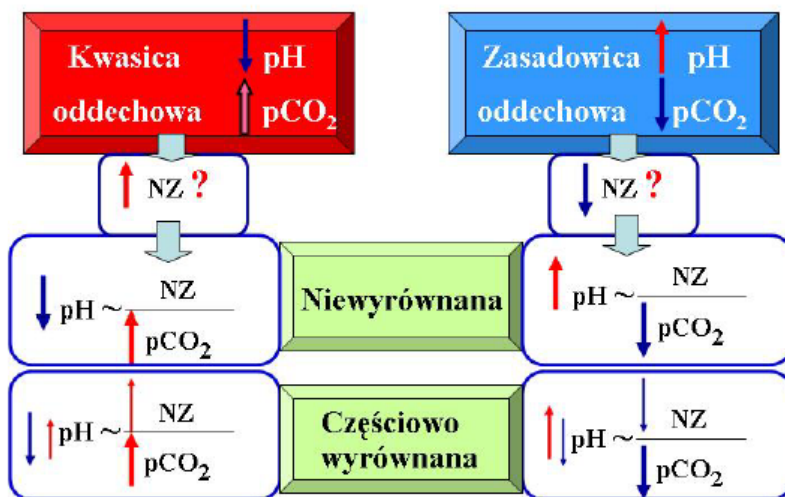
Przejawem wyrównywania zaburzeń metabolicznych jest kompensacja oddechowa. Jej laboratoryjnym wskaźnikiem są zmiany pCO_2 zgodne z kierunkiem zmian NZ (ryc. 5.14).

Tak więc, w kwasicy metabolicznej przejawem kompensacji będzie spadek pCO_2 , a w zasadowicy metabolicznej – wzrost pCO_2 . Zaburzenia metaboliczne, w których nie dochodzi do kompensacyjnych zmian pCO_2 określa się jako niewyrównane (ryc. 5.14). Kompensacja oddechowa następuje równocześnie z rozwojem zaburzeń metabolicznych. Niewystępowanie kompensacji, szczególnie kwasicy metabolicznych wskazuje na współistnienie zaburzeń funkcjonowania układu oddechowego. Pierwotnymi przyczynami kwasicy metabolicznych są: nadmierna podaż bądź upośledzenie wydalania jonów wodorowych, a zasadowicy metabolicznych: nadmierna produkcja wodorowęglanów lub zwiększona utrata jonów wodorowych. Najczęstsze przyczyny kliniczne tych zaburzeń są wymienione w tabelach 5.4. i 5.5.



Ryc. 5.14. Ocena kompensacji zaburzeń metabolicznych gospodarki kwasowo – zasadowej

5.5.4. Etap III: ocena kompensacji zaburzeń oddechowych



Ryc. 5.15. Ocena kompensacji zaburzeń oddechowych gospodarki kwasowo – zasadowej

Przejawem wyrównywania (kompensacji) zaburzeń oddechowych jest kompensacja metaboliczna poprzez zmianę wydalania jonów wodorowych przez nerki. Laboratoryjnym wskaźnikiem są zmiany NZ, zgodnie z pierwotnymi zmianami $p\text{CO}_2$. Tak więc w kwasicy oddechowej, przejawem kompensacji jest przyrost NZ, w zasadowicy oddechowej – spadek stężenia NZ. Zaburzenia, w których nie dochodzi do kompensacyjnych zmian NZ określamy jako niewyrównane (ryc. 5.15). Kompensacja metaboliczna zaburzeń oddechowych rozwija się w przypadku kwasicy w okresie 3-5 dni, a zasadowicy 1 – 3 dni. Jest to czas potrzebny dla adaptacji kanalików nerkowych do wydalania odpowiednio większych lub mniejszych ilości jonów wodorowych. Najczęstsze przyczyny kliniczne oddechowych zaburzeń RKZ przedstawiono w tabelach 5.6 i 5.7.

Tabela 5.4. Niektóre przyczyny kwasicy metabolicznych (nie-oddechowych)

Dominująca nadmierna synteza kwasów	
Kwasica	Patologia
Kwasica ketonowa β -hydroksymasłowy acetoctowy	Cukrzyca z ketonemią Zatrucie alkoholem etylowym Głodzenie
Kwasica mleczanowa	Hipoksja (Typ A)- wstrząs, ciężkie niedotlenienie, nadmierny wysiłek fizyczny. Inne przyczyny (Typ B) – leki (biguanidy, sorbitol, etanol, aspiryna, zejście cukrzycowej kwasicy ketonowej, cukrzycowa kwasica nieketonowa, wrodzone bloki metaboliczne, miopatie metaboliczne, ciężkie choroby wątroby, niedobory tiaminy)
Dominujące upośledzenie wydalania kwasów	
Kwasica nieorganiczna HPO_4^{2-} , H_2SO_4 , kwas moczowy	Kwasica mocznicowa Kwasica kanalikowa Typ 1 (dystalny) Kwasica kanalikowa Typ 4 (hipoaldosteronizm)
Nadmierna podaż kwasów	
Różne	Przypadkowe lub zamierzone spożycie kwasów Alkohol metylowy, glikol etylenowy itp. Spożycie lub infuzja NH_4Cl Leczenie pozajelitowe aminokwasami kationowymi
Dominująca utrata zasad	
Utrata przez układ pokarmowy	Biegunki Przetoki trzustkowe
Utrata przez nerki	Kwasica kanalikowa Typ 2 (proksymalny) Leczenie inhibitorami anhidrazy węglanowej Zespołenia moczowodowo-jelitowe

Tabela 5.5. Niektóre przyczyny zasadowic metabolicznych (nieoddechowych)

Odpowiadające na chlorek sodu	
Żołądkowo-jelitowe	Wymioty Drenaż żołądka Wrodzona biegunka z utratą chlorków
Nadmierna podaż zasad	Wodorowęglan sodu Mleczan sodu, octan szczególnie przy obniżonej filtracji kłębkowej
Przyczyny nerkowe	Leczenie słabo reabsorbującymi się anionami (np. karbenicylina) Diuretyki po hiperkarnii, szczególnie w zastoinowej niedomodze serca, zespole nerczycowym, marskości wątroby
Nie odpowiadające na chlorek sodu	
Związane z nadciśnieniem	Pierwotny hiperaldosteronizm Zespół Cushinga Hiperaldosteronizm wtórny Karbenoksolon, preparaty lukrecji
Zwykle nie związane z nadciśnieniem	Zespół Barter i Gitelman Odżywianie po głodzeniu Utrata potasu Utrata magnezu

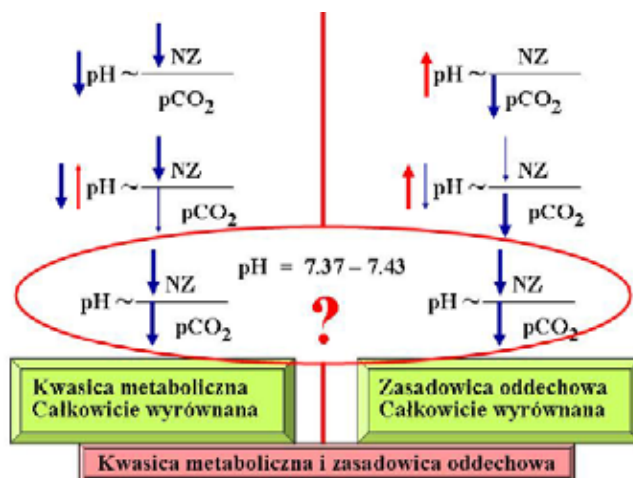
Tabela 5.6. Niektóre przyczyny zasadowic oddechowych

Zamierzona hiperwentylacja Nadmierna wentylacja mechaniczna Hiperwentylacja odruchowa: - Obniżona podatność tkanki płucnej - Choroby ściany klatki piersiowej - Początkowe utrudnienia pasażu powietrza w drogach oddechowych Różne pobudzenia ośrodka oddechowego: - Korowe (ból, gorączka, emocje-histeria, strach) - Zmiany miejscowe (urazy, nowotwory) - Leki i toksyny (zatrucie salicylanami, niewydolność wątroby, CO) - Hipoksemia (choroba wysokościowa, przecieki międzyprzedsionkowe i międzykomorowe) Faza wychodzenia ze kwasicy metabolicznej
--

Tabela 5.7. Niektóre przyczyny kwasic oddechowych

Uszkodzenia funkcji ośrodka oddechowego	
Zahamowanie ośrodka oddechowego	Znieczulenie ogólne Narkotyki Ciężka hipoksja
Choroby ośrodkowego układu nerwowego	Uraz Udar
Choroby neurologiczne	Uszkodzenia rdzenia kręgowego Zapalenie przednich rogów rdzenia (polyomyelitis) Zespół Gillain-Barre Choroby neuronów ruchowych Neurotoksyny
Uszkodzenia funkcji oddechowych	
Mechaniczne	Miastenia gravis (nużliwość mięśniowa pseudoporażna) Miopatie Urazy i deformacje klatki piersiowej Odma opłucnowa Wysięki do jamy opłucnej
Choroby płuc	Ograniczenie ruchomości tkanki płucnej (zwłóknienie, obrzęk, nacieki nowotworowe) Niedrożność oskrzeli (przewlekłe zapalenia oskrzeli, rozedma, ciężka astma) Upośledzona perfuzja (rozległa zatorowość płucna)

5.5.5. Całkowita kompensacja zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej



Ryc. 5.16. Ocena całkowicie skompensowanych zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej

Wynik badania RKZ jest prawidłowy tylko wtedy, gdy wszystkie jego składowe są w granicach wartości prawidłowych. W przypadku wyrównania różnego typu zaburzeń pH jest, co prawda, prawidłowe jednak wartości pozostałych parametrów NZ (ZB), HCO_3^- i pCO_2 znajdują się poza zakresem wartości referencyjnych. Natomiast stosunek stężeń $\text{HCO}_3^- : \alpha \times \text{CO}_2$ jest równy około 20. Ustalenie pierwotnej przyczyny zaburzenia RKZ na podstawie samego badania parametrów laboratoryjnych nie jest możliwe (ryc. 5.16.)

5.6. Przykłady zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej

Przykład 1

pH 7.30	pCO₂ 60 mmHg	NZ (+) 1 mmol/l
Etap I	↓ pH	→ KWASICA
Etap II	↑ pCO ₂	→ ODDECHOWA
Etap III	NZ bez zmian	→ NIEWYRÓWNANA

Spadek zawartości pH krwi określa kwasicę (Etap I), której przyczyną jest wzrost pCO₂ (kwasica oddechowa) (Etap II). Jednocześnie brak wzrostu stężenia NZ wskazuje, że zaburzenie jest nie wyrównane (kwasica oddechowa nie wyrównana) (Etap III).

Przykład 2.

pH 7.46	pCO₂ 51mmHg	NZ (+) 10mmol/L
Etap I	↑pH	→ ZASADOWICA
Etap II	↑ NZ	→ METABOLICZNA
Etap III	↑ pCO ₂	→ CZĘŚCIOWO WYRÓWNANA

Wzrost wartości pH określa zasadowicę (Etap I), której pierwotną przyczyną jest wzrost stężenia NZ (zasadowica metaboliczna) (Etap II). Towarzyszy temu kompensacyjny wzrost pCO₂ (zasadowica metaboliczna częściowo wyrównana) (Etap III).

5.6.1. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń mieszanych

Badania laboratoryjne pozwalają jedynie na określenie, które zaburzenie jest procesem przeważającym. O rozpoznaniu zaburzeń mieszanych RKZ decyduje badanie przedmiotowe i podmiotowe pacjenta, co wymaga między innymi przeprowadzenia szeregu dodatkowych testów i badań laboratoryjnych. Jedynie w mieszanej kwasicy metaboliczno - oddechowej i w zasadowicy metaboliczno - oddechowej wynik badań laboratoryjnych jednoznacznie określa charakter zaburzenia.

pH 7.23		pCO₂ 47 mmHg	NZ (-) 8 mmol/l
Etap I	↓ pH	→	KWASICA
Etap II	↑ pCO ₂ ⇌ ↓ pH	→	ODDECHOWA
Etap III	oraz ↓ NZ ⇌ ↓ pH	→	METABOLICZNA

Spadek pH wskazuje na kwasicę, której przyczyną jest zarówno wzrost pCO₂, jak i ubytek NZ. Jest to więc kwasica metaboliczno - oddechowa.

Przykład 4.

pH 7.41;	pCO₂ 30 mmHg	NZ (-) 4 mmol/l
-----------------	--------------------------------	------------------------

Rozpoznanie:

Równoległe obniżenie pCO₂ oraz NZ przy zachowanej prawidłowej wartości pH krwi wskazuje, że mogą to być:

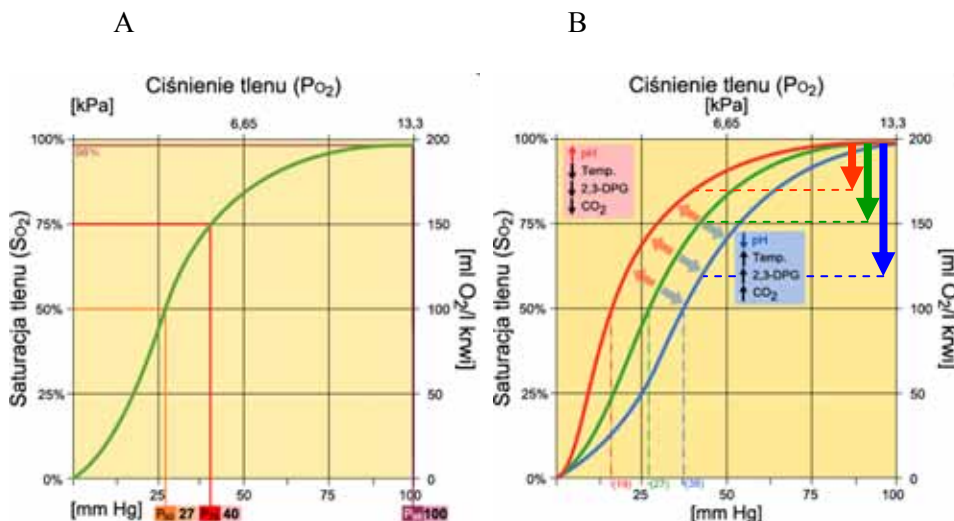
- dwa wzajemnie kompensujące się zaburzenia tj. kwasica metaboliczna z zasadowicą oddechową;
- kwasica metaboliczna, czego przejawem jest spadek NZ, całkowicie skompensowana spadkiem pCO₂;
- zasadowica oddechowa, czego przejawem jest spadek pCO₂ całkowicie skompensowany obniżeniem stężenia NZ.

5.7. Regulacja prężności tlenu we krwi

Tlen dyfunduje przez ścianę pęcherzyków płucnych 20 razy wolniej niż CO₂. Jednocześnie hipoksja jest najsilniejszym bodźcem stymulującym ośrodek oddechowy i wentylację płuc poprzez pobudzenie specyficznych receptorów obwodowych w obrębie zatok tętnic szyjnych i łuku aorty. W związku z tym hipoksja może powodować hiperwentylację, a tym samym obniżenie pCO₂ i zasadowicę oddechową. Choroby prowadzące do hipowentylacji zawsze prowadzą do hipoksji i hiperkapni. Z kolei choroby upośledzające dyfuzję prowadzą do hipoksji z hipokapnią.

W warunkach fizjologicznych tj. przy prawidłowym pH i normalnej przepuszczalności ścian pęcherzyków płucnych dla O₂, 50% wysycenie Hb tlenem następuje przy pO₂ 27 mm Hg, a całkowite przy 75-80 mm Hg (ryc. 5.16A). Przy zmianach pH krwi mamy do czynienia z tzw. efektem Bohra. Zjawisko to polega na obniżeniu powinowactwa Hb do tlenu w kwasicach (spadek pH) i jego wzroście w zasadowicach (wzrost pH) (ryc. 5.16B). W efekcie w ostrych kwasicach dochodzi z jednej strony do utrudnienia wiązania O₂ z Hb w płucach (krew

tętnicza ciemna, słabo utlenowana), z drugiej zaś z ułatwioną jego dysocjacją w tkankach.



Ryc. 5.16. **A.** Krzywa wysycenia Hb tlenem przy prawidłowym pH. **B.** Efekt Bohra: wpływ pH na przebieg krzywej wysycenia Hb tlenem. Modulujący wpływ 2,3-difosfoglicerynianu na powinowactwo Hb do tlenu

W ostrych kwasowicach O_2 wiąże się dobrze z Hb w płucach, natomiast słabo dyfunduje do tkanek (krew żylna jest jasna, nadmiernie utlenowana). W efekcie tkanki mogą być niedotlenione pomimo dobrego utlenowania hemoglobiny (ryc. 5.16B). Te niekorzystne efekty zmian pH krwi są z pewnym opóźnieniem kompensowane przez zmiany stężenia 2,3-difosfoglicerynianu (2,3-DPG) w erytrocytach. Związek ten zmniejsza powinowactwo Hb do O_2 . Jego prawidłowe stężenie w erytrocytach wynosi około 4 mmol/L. W przewlekłych kwasowicach stężenie 2,3-DPG w erytrocytach obniża się, a w przewlekłych kwasowicach wzrasta, przywracając prawidłowe wiązanie Hb z O_2 . (ryc. 5.16B). Podstawowe rodzaje i mechanizmy niedotlenienia są przedstawione w tabeli 5.8.

5.7.1. Przyczyny hipoksji i zahamowania dostarczania tlenu do tkanek

Tabela 5.8. Czynniki powodujące hipoksję układową i tkankową

Mechanizm	Przyczyna	Rodzaj hipoksji
Wdychany O ₂	Niskie ciśnienie powietrza	Hipoksemiczna
Pęcherzykowy O ₂	Hipowentylacja	Hipoksemiczna z hiperkapnią
Dyfuzja	Bloki dyfuzyjne w pęcherzykach płucnych	Hipoksemiczna z hipokapnią
O ₂ we krwi tętniczej	Przecieki tętniczo-żylne	Hipoksemiczna ze zmiennym pCO ₂
Zdolność krwi do transportu O ₂	Niski poziom hemoglobiny	Związana z anemią
Dostarczanie krwi do tkanek	Obniżenie pojemności wyrzutowej serca, zwężenia naczyń	Zastoinowa
Upośledzenie zużycia tlenu przez tkanki	Trucizny metaboliczne	Cytotoksyczna

6. GOSPODARKA WODNO-ELEKTROLITOWA

Andrzej Szutowicz

Woda stanowi podstawowy pod względem ilościowym składnik ciała ludzkiego. Jest ona rozmieszczona w dwóch głównych przestrzeniach wodnych – wewnątrz i zewnątrzkomórkowej. Posiadane przez organizm mechanizmy homeostazy wodno-elektrolitowej umożliwiają utrzymanie stałych stężeń jonów oraz stałej objętości płynów ustrojowych. Objętość wody w poszczególnych przestrzeniach jest regulowana przez różne mechanizmy fizjologiczne.

W stanach patologicznych (krwotok, obrzęki) zawartość wody w ustroju pacjenta ulega zmniejszeniu lub zwiększeniu – dochodzi do odwodnień lub przewodnień. W różnych patologiach względne zmiany objętości wody w poszczególnych przestrzeniach wodnych mogą być różne. Dlatego z punktu widzenia lekarza istotna jest odpowiedź na dwa podstawowe pytania:

- Czy zmieniła się zawartość wody u ustroju pacjenta – czy jest on przewodniony czy odwodniony?
- Czy zmieniła się dystrybucja wody pomiędzy przestrzenią zewnątrz i wewnątrzkomórkową?

Odpowiedzi na pierwsze z tych pytań dostarcza dobrze zebrany wywiad i prawidłowo przeprowadzone badanie przedmiotowe. O przewodnieniu mogą świadczyć między innymi obrzęki, wzrost ciśnienia, przyrost wagi itd. Natomiast na odwodnienie wskazują: wyschnięte śluzówki, spadek wagi, utrata elastyczności skóry, spadek ciśnienia, zaburzenie świadomości itp. Badania laboratoryjne nie są bezwzględnie potrzebne do stwierdzenia tych faktów.

Badania laboratoryjne pozwalają natomiast na ocenę dystrybucji wody pomiędzy przestrzenią wewnątrz i zewnątrzkomórkową. Do tego celu niezbędne są wyniki pomiaru poziomu elektrolitów, glukozy, mocznika, osmolalności, hematokrytu.

6.1. Zawartość i dystrybucja wody w ustroju

Względna zawartość wody ustrojowej zależy od wieku, płci i posiadanej tkanki tłuszczowej. Woda stanowi odpowiednio około 60% masy ciała (m.c.) nieotyłego mężczyzny i 55% u kobiety. U noworodków zawartość wody wynosi 75% i zmniejsza się do 65% w wieku 12 miesięcy. U osób powyżej 60 roku życia zawartość wody ulega stopniowemu zmniejszeniu. Zależne od wieku zmniejszenie zawartości wody w organizmie dotyczy wyłącznie przestrzeni międzykomórkowej. Mała zawartość wody w tkance tłuszczowej powoduje, że ludzie otyli mają względną zawartość wody mniejszą niż ludzie szczupli. Krańcowe wartości całkowitej zawartości wody wahają się odpowiednio od 55 do 70% masy ciała (tab. 6.1).

Tabela 6.1. Zawartość wody w przestrzeniach wodnych – zależność od płci i wieku.

Przestrzeń wodne	Noworodki	Kobiety	Mężczyźni
1. Całkowita woda ustroju	75 %	55 %	60 %
2. Woda pozakomórkowa	35 %	20 %	20 %
3. Woda wewnątrzkomórkowa	40 %	35 %	40 %

W skład tych przestrzeni wliczone są przestrzenie wodne różniące się zawartością wody i jonów:

- wewnątrzkomórkowej (**PWK**) - 40% m. c. - w tym: eryocyty 2%
- zewnątrzkomórkowej (**PPK**) - 20% m. c. - w tym:

osocze	5%	}
płyn śródmiąższowy, limfa		
płyn kości	15 %	
przestrzeń trzecia		

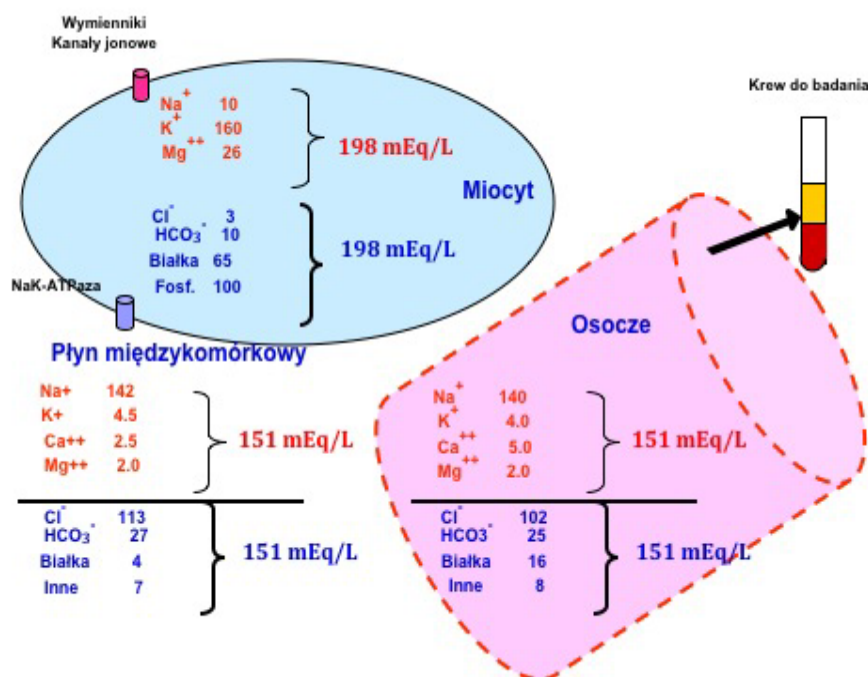
W skład **przestrzeni trzeciej** wchodzi: płyn mózgowo rdzeniowy, płyny jamy otrzewnej, jamy opłucnej, worka osierdziowego, stawów, przewodu pokarmowego i mocz w pęcherzu moczowym.

6.1.1. Zawartość elektrolitów w przestrzeniach wodnych

Rozmieszczenie i stężenie elektrolitów w poszczególnych przestrzeniach wodnych determinują dwie podstawowe zasady: elektroodporności i izoosmolalności. Różnice w rozmieszczeniu jonów wynikają z przepuszczalności i specyficznych właściwości transportowych i metabolicznych rozdzielających je błon biologicznych (ryc. 6.1).

Głównymi jonami PPK są kationy Na^+ oraz aniony Cl^- i HCO_3^- . Ich stężenia w osoczu wynoszą odpowiednio: 135-145, 90-102 i 22-26 mEq/L. Rozmieszczenie tych jonów w osoczu i płynie międzykomórkowym nie jest równomierne. Słaba przepuszczalność śródbłonna naczyń włosowatych dla cząsteczek o masie powyżej 40kD powoduje, że stężenie białek w osoczu (około $70 \pm 10 \text{ g/L}$ $\approx 16 \text{ mEq/L}$) jest 3-4 razy wyższe niż w płynie międzykomórkowym (około 15-20g/L) (ryc. 6.1). Wskutek wyższego poziomu anionów białczanowych stężenia anionów Cl^- i HCO_3^- w osoczu są nieco niższe niż w płynie międzykomórkowym (równowaga Donnana) (ryc. 6.1). Ten sam mechanizm powoduje, że stężenie chlorków w płynie mózgowo-rdzeniowym jest wyższe niż w osoczu.

W PWK głównymi jonami są kationy K^+ ($\approx 160 \text{ mEq/kg H}_2\text{O}$) oraz aniony białczanowe ($\approx 65 \text{ mEq/kg H}_2\text{O}$) fosforanowe i kwasów organicznych ($\approx 100 \text{ mEq/kg H}_2\text{O}$). W każdej przestrzeni płynowej sumy stężeń kationów i anionów, wyrażone w mEq/L są sobie równe – zasada elektroodporności (ryc. 6.1). Również stężenie wolnej wody po obu stronach błon komórkowych jest identyczne – zasada izoosmolalności. Tak więc w organizmie nie ma różnic między ciśnieniem osmotycznym w PPK i PWK.



Ryc. 6.1 Stężenia elektrolitów w przestrzeniach wodnych organizmu człowieka dorosłego

6.2. Luka anionowa

Zgodnie z zasadą elektroobojętności sumy stężeń ładunków dodatnich i ujemnych w każdej przestrzeni wodnej są sobie równe. Różnica między sumą stężeń kationów i anionów Cl⁻ i HCO₃⁻ w osoczu odpowiada łącznemu stężeniu anionów zaliczanych do tzw. luki anionowej (LA). W skład LA osocza wchodzi aniony białczanowe (≈16 mEq/L), kwasów organicznych (≈6 mEq/L), fosforanowe (≈2 mEq/L) oraz siarczanowe (≈1 mEq/L) (ryc. 6.2).

Stężenie LA w osoczu oblicza się z wzoru:

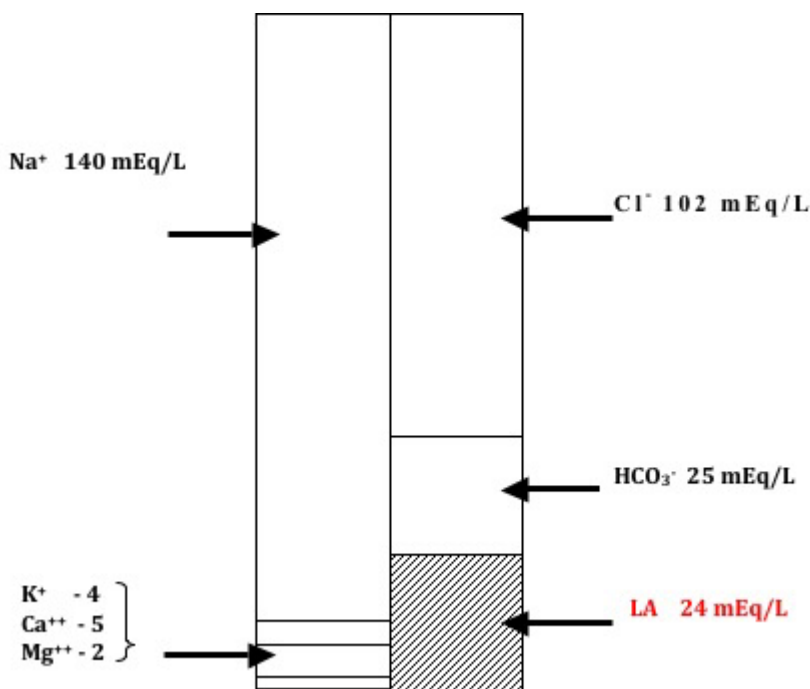
$$[LA] = \{ [Na^+] + [K^+] + [Ca^{2+}] + [Mg^{2+}] \} - \{ [Cl^-] + [HCO_3^-] \} \quad (1)$$

Wartości prawidłowe wynoszą 20 - 28 mEq/L. LA jest wartością wyliczaną.

Ze względów technicznych można dokonać oceny tego wieloanionowego parametru w sposób uproszczony:

$$[LA] = [Na^+] - \{ [Cl^-] + [HCO_3^-] \} \quad (2)$$

Wartości prawidłowe przy tej metodzie wynoszą 8 -16 mEq/L. Nie odzwierciedlają one rzeczywistego stężenia LA, niemniej umożliwiają ocenę zmian tej wartości w różnych stanach patologicznych. Łącznie z pomiarem $[\text{Cl}^-]$ pozwala ona na różnicowanie kwasic metabolicznych z utraty wodorowęglanów i akumulacji nietlotnych kwasów (rozdział 5). Wartości bezwzględne tych zmian pozostają identyczne w obu metodach obliczeniowych.



Ryc.6.2. Diagram Gamble'a

Zwiększenie $[\text{LA}]$ obserwuje się w:

- kwasicach ketonowych (aniony β -hydroksymaślanowe i acetoctanowe),
- kwasicach mleczanowych (aniony mleczanowe),
- kwasicy mocznicowej (aniony fosforanowe, siarczanowe, moczanowe),
- zatruciu salicylanami (salicylany),
- zatruciu metanolem (aniony mrówczanowe, mleczanowe),
- zatruciu glikolem etylenowym (aniony glioksalanowe, glikolanowe, szczawianowe, mrówczanowe).

Należy pamiętać, że obliczenie to jest obarczone dość dużym błędem, ponieważ oznaczenie każdego z parametrów użytych w równaniu posiada błąd przypadkowy lub/i systematyczny, które mogą się znosić lub dodawać. Dlatego za istotny diagnostycznie uznaje się wzrost $[\text{LA}]$ minimum o 6 - 8mEq/L.

Zmniejszenie [LA] nie ma większego znaczenia w rozpoznawaniu zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej. Wskazuje natomiast na istnienie błędu analitycznego lub przedanalizycznego. Jedynie stany głębokich niedoborów białek osocza mogą prowadzić do obniżenia [LA].

6.2.1. *Osmolalność*

Molalność (osmolalność) jest to liczba moli związków osmotycznie czynnych rozpuszczonych w 1 kg rozpuszczalnika. Powodują one obniżenie potencjału chemicznego wody. Ciśnienie osmotyczne powstaje w wyniku przechodzenia wody przez błonę półprzepuszczalną wtedy, gdy po jednej jej stronie znajduje się w roztworze substancja osmotycznie czynna, tj. taka, dla której błona jest nieprzepuszczalna po drugiej zaś czysta woda. Wyższy potencjał chemiczny czystej wody powoduje jej ruch na drugą stronę błony aż do momentu wyrównania energii cząsteczek wody po obu stronach błony. Jeden milimol cząsteczek związków osmotycznie czynnych w 1 kg wody po oddzieleniu błoną półprzepuszczalną od czystej wody powoduje powstanie ciśnienia równego 17 mm Hg (2.26 kPa). Taką liczbę cząsteczek nazywamy miliosmolem.

Osmolalność całkowita roztworu zależy od:

- Stężenia wolnych cząsteczek rozpuszczonych w wodzie
- Aktywności cząsteczek substancji rozpuszczonych
- Stężenia i aktywności cząsteczek wody

Nie zależy od:

- Ładunku cząsteczek
- Masy cząsteczek

6.2.2. *Metody oceny osmolalności płynów ustrojowych*

- **Osmolalność całkowita płynów ustrojowych – mierzona.**

Osmolalność całkowitą roztworów oznacza się przez pomiar punktu ich zamarzania (metoda krioskopowa). Jeden osmol cząsteczek rozpuszczony w 1 kg wody powoduje obniżenie temperatury zamarzania do -1.86°C .

Prawidłowa osmolalność osocza oznaczona metodą krioskopową wynosi 289 ± 5 mosm/kg wody.

- Osmolalność całkowita – obliczona.

Osmolalność całkowitą osocza można również obliczyć ze wzoru:

Osmolalność całkowita obliczona = $2 \times [\text{Na}^+] + [\text{glukoza}] + [\text{mocznik}]$ (3)

Wartość prawidłowa obliczonej osmolalności całkowitej wynosi:

$$2 \times 140 \text{ mmol/L} + 5 \text{ mmol/L} + 4 \text{ mmol/L} = 289 \text{ mmol/L}.$$

Przy uwzględnieniu zakresów wartości prawidłowych tych substancji zakres wartości prawidłowych dla osmolalności obliczanej wynosi ± 8 mmol/L.

Różnica między osmolalnością obliczoną i zmierzoną jest nazywana **luka osmotyczną** i wynosi 0 - 10 mmol/L. Wzrost luki osmotycznej występuje w przypadku obecności w osoczu różnych związków osmotycznie czynnych podawanych w celach leczniczych (mannitol) lub w przypadku zatruc (etanol, glikole, metanol i jego metabolity itd.). Dlatego parametr ten może być wskaźnikiem użytecznym w diagnostyce zatruc lub przedawkowania leków. Na przykład: przy poziomie etanolu we krwi 2‰, często spotykanym u pacjentów oddziałów ratunkowych, luka osmotyczna wzrasta do 43 mmol/L.

Osmolalność efektywna

Efektywne ciśnienie osmotyczne w PPK wywiera jon Na^+ , dla którego błony komórkowe są nieprzepuszczalne, oraz towarzyszące mu aniony. Osmolalność efektywną można obliczyć ze wzoru:

$$\text{Osmolalność efektywna} = 2 \times [\text{Na}^+] + [\text{glukoza}] \quad (4)$$

Glukozę uwzględnia się ze względu na jej potencjalnie duży udział w osmolalności PPK w cukrzycy, kiedy dochodzi do zahamowania jej transportu do tkanek zależnych od insuliny.

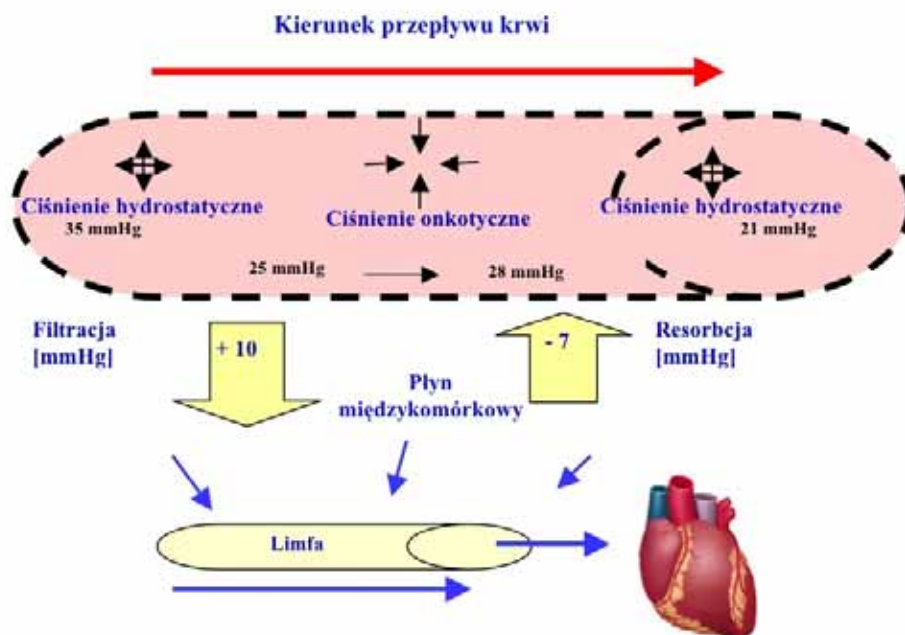
Woda i mocznik swobodnie przechodzą przez błony komórkowe. Stężenia wolnej wody w PPK i PWK są sobie równe ze względu na identyczne stężenia Na^+ i towarzyszących anionów na zewnątrz oraz K^+ i towarzyszących anionów wewnątrz komórki. Nie ma, więc różnic w ciśnieniu osmotycznym pomiędzy PPK i PWK. Różnica ta powstaje, gdy w PPK stężenie Na^+ i/lub innych związków słabo przechodzących przez błony komórkowe ulegnie zmianie. Gdy $[\text{Na}^+]$ w PPK ulegnie zwiększeniu (hiperosmia) to energia wody w PPK obniży się. Woda z komórek będzie przemieszczać się do PPK, aż do wyrównania jej stężenia w obu przestrzeniach płynowych. Dojdzie do zmniejszenia objętości – odwodnienia komórek. Przy obniżeniu Na^+ w PPK (hipoosmia) woda z PPK przejdzie do PWK – wystąpi obrzęk komórek.

Stężenie Na^+ w PPK jest więc laboratoryjnym wskaźnikiem objętości PWK.

6.2.3. Ciśnienie onkotyczne

Ściana naczyń włosowatych jest względnie nieprzepuszczalna dla cząsteczek o masie cząsteczkowej większej od 40 kDa. Powoduje to, że stężenie białek w osoczu jest około 4 razy (o ponad 1 mosm/L) wyższe niż w przestrzeni międzykomórkowej. Różnica ta powoduje powstanie ciśnienia onkotycznego. Wynosi ono w części tętniczej włosniczek około 25 mm Hg (3.33 kPa) i częściowo równoważy istniejące tam ciśnienie hydrostatyczne równe 35 mm Hg (4.66 kPa) (ryc.6.3.). Różnica między ciśnieniem hydrostatycznym a onkotycznym wynosząca +10 mm Hg (+1.3 kPa) powoduje wychodzenie wody poza naczynia włosowate. W części żyłnej włosniczek ciśnienie hydrostatyczne obniża się o 14

mmHg, a onkotyczne rośnie o około 3 mmHg. W efekcie różnica obu ciśnień spada do wartości -7 mmHg (-1.0 kPa) powodując powrót około 90% wody z powrotem do przestrzeni naczyniowej. Pozostałe 10% tworzy limfę (ryc.6.3), która przez przewód piersiowy wraca do krążenia.



Ryc. 6.3 Znaczenie równowagi między ciśnieniem hydrostatycznym i onkotycznym w utrzymaniu prawidłowej objętości krwi krążącej

Równowaga między ciśnieniem hydrostatycznym w naczyniach włosowatych, a ciśnieniem onkotycznym białek osocza utrzymuje właściwą objętość osocza w układzie naczyniowym.

6.3. Bilans wody i elektrolitów

Organizm traci wodę przez nerki, płuca, skórę i przewód pokarmowy. Straty wody uzupełniane są w postaci wypijanych płynów ($0,5 - 2,5$ L/dobę), wody zawartej w tzw. pokarmach stałych (ok. $0,8$ L/dobę) oraz wody powstającej w procesach metabolicznych ($0,3$ L/dobę). Utrata wody przez płuca i skórę nie podlega regulacji, zależy od warunków zewnętrznych – temperatury, wilgotności powietrza oraz intensywności wysiłku fizycznego, wentylacji płuc i tempera-

tury ciała. Natomiast w przypadku ograniczenia czy też zwiększenia podaży wody narządem zapewniającym utrzymanie stałej zawartości wody w ustroju jest nerka. (tab. 6.2, ryc. 6.4).

Tabela 6.2 Bilans wody

Podaż wody (L /dobę)		Straty wody (L /dobę)	
Płyny	0,5 - 2,5	Mocz	0,6 –2,6
Woda w pokarmach	0,8	Pocenie	0,5
Woda metaboliczna	0,3	Parowanie z dróg oddechowych	0,4
		Kał	0,1
Ogółem	1,6 - 3,6	Ogółem	1,6 - 3,6

Ograniczeniu podaży wody towarzyszy wzrost osmolalności i ciężaru właściwego oraz spadek objętości wydalanego moczu. Do wydalania 1g produktów przemiany materii (mocznik, kreatynina) potrzeba minimum 10 mL wody. Stąd przy dobowej produkcji około 40g produktów przemiany azotowej minimalna objętość moczu będzie wynosić około 400 mL. Wzrost ciężaru właściwego moczu o 0,001 g/mL odpowiada wzrostowi osmolalności moczu o około 40 mmol/kg wody (z wyjątkiem glukozurii, proteinurii i wydalania ksenobiotyków).

Homeostazę wody i elektrolitów utrzymują trzy mechanizmy:

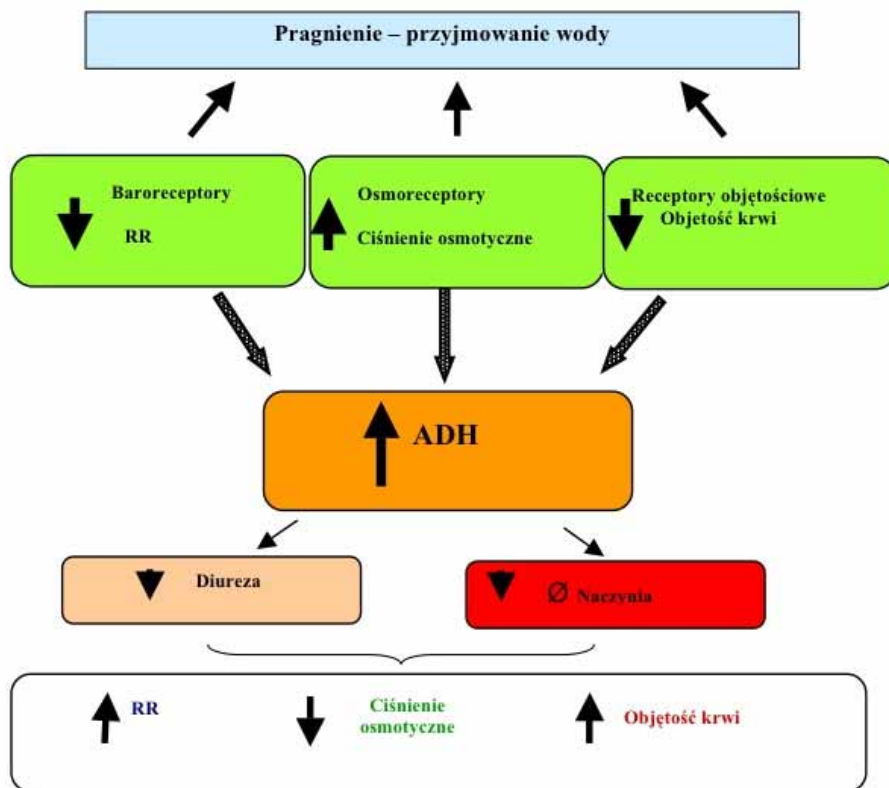
- Pragnienie i hormon antydiuretyczny
- Układ renina-angiotensyna-aldosteron
- Peptydy natriuretyczne

6.3.1. *Pragnienie i hormon antydiuretyczny*

Wzrost osmolalności lub hipowolemia poprzez osmoreceptory jądra nadwzrokowego podwzgórza aktywuje neurony dróg podwzgórzowo-korowych powodując powstanie uczucia pragnienia, na które człowiek reaguje przyjmowaniem płynów. Natomiast wydalanie wody przez nerki jest hamowane przez hormon antydiuretyczny (ADH) (ryc.6.4). Hiperosmia PPK aktywuje osmoreceptory neuronów jądra nadwzrokowego podwzgórza, które zwiększają wydzielanie ADH ze swych zakończeń znajdujących się w tylnym płacie przysadki mózgowej. Zwykle wzrost wydzielania ADH wyprzedza pojawienie się uczucia pragnienia.

ADH pobudza swoiste receptory na błonie antyluminalnej kanalików zbiorczych nerki. Powoduje to wzrost poziomu cAMP i aktywację kinazy białkowej A fosforylującej białko akwaporynę 2, które po fuzji z błoną luminalną zwiększa reabsorpcję wody powodując zmniejszenie objętości i wzrost osmolalności wydalanego moczu (ryc. 6.4). Osmolalność rdzenia nerki wynosi około 1400 mosm/L. Przy ciągłym przepływie moczu w nefronie może być on maksymalnie

zagęszczony do osmolalności 1200 mosm/L (c.wł. 1.030 g/mL). Spadek osmolalności PPK np. spowodowany podażą dużej ilości płynów może z kolei całkowicie zahamować wydzielanie ADH zwiększając diurezę do wielkości odpowiadającej spożyciu wody. Nerki reagują na zmiany poziomu ADH we krwi w ciągu kilku minut. Ciężar właściwy moczu jest miarą jego zagęszczenia. Wzrost c.wł. o 0.001 g/mL, odpowiada wzrostowi osmolalności moczu o 40 mosm/L, jeżeli nie zawiera on glukozy lub białka.



Ryc. 6.4. Regulacja objętości płynów ustrojowych przez hormon antydiuretyczny

Wzrost osmolalności jest najsilniejszym bodźcem regulującym, poprzez wydzielanie ADH, objętość płynów ustrojowych, prowadzące do retencji wody przy jednoczesnym spadku osmolalności.

Drugim bodźcem, który reguluje wydzielanie ADH są zmiany objętości krwi (PPK). Odbyna się to za pośrednictwem receptorów objętościowych znajdujących się w łuku aorty, przedsionkach serca i aparacie przykłębkowym nerek. Spadek ciśnienia krwi zwiększa, a wzrost zmniejsza wydzielanie ADH. Bodźce te są słabszymi regulatorami wydzielania ADH od bodźców osmotycznych.

Receptory objętościowe regulują objętość płynów ustrojowych kosztem osmolalności. Efektem ich działania jest przywracanie prawidłowej objętości krwi krążącej przy powstającej przy tym hipotonii.

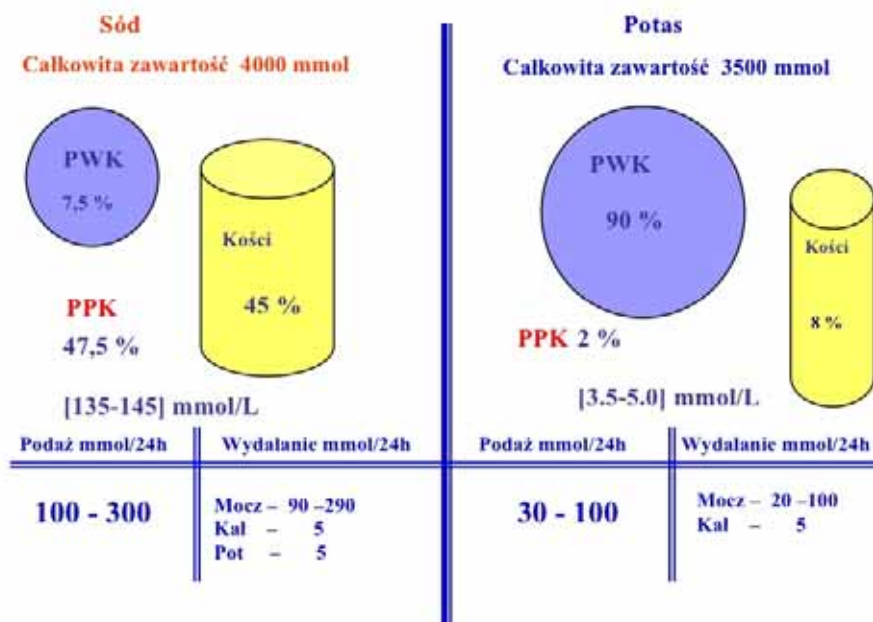
Wymioty, hipoglikemia i bodźce bólowe również zwiększają wydzielanie ADH.

6.3.2. Regulacja gospodarki sodowej. Układ renina-angiotensyna-aldosteron

Sód w organizmie tworzy trzy pule: wewnątrzkomórkową około 300 mmoli, zewnątrzkomórkową około 1900 mmoli i kostną około 1800 mmoli. Ta ostatnia jest względnie mało aktywna metabolicznie (ryc.6.5). Głównym narządem dostosowującym organizm do poziomu podaży Na^+ jest nerka. Przy stałej zawartości Na^+ w diecie jego wydalanie z moczem jest równe podaży. W ciągu doby do przesączu pierwotnego jest w kłębkach nerkowych filtrowane około 22500 mmoli Na^+ . W kanalikach bliższych jest reabsorbowane 90%, a w kanalikach dystalnych jest 9% filtrowanego kationu. Około 1% jest wydalone z moczem. W kanalikach proksymalnych transport jest izoosmotyczny, a jego wielkość zależy od filtracji kłębkowej (równowaga kłębkowo-kanalikowa). Natomiast w kanalikach dystalnych reabsorpcja Na^+ odbywa się poprzez wymianę na jony K^+ i H^+ w proporcji 3:2:1 (patrz rozdz. 6). Proces ten jest aktywowany przez aldosteron. Synteza i wydzielanie aldosteronu są regulowane przez układ renina-angiotensyna. Spadek objętości krwi (ciśnienia) powoduje zmniejszenie przepływu krwi przez kłębki nerkowe i zmniejszenie filtracji przesączu pierwotnego. Prowadzi to do zmniejszenia ładunku Na^+ dopływającego do plamki gęstej. Powoduje to wzrost wydzielania reniny (enzym proteolityczny) z komórek aparatu przykłębkowego lokalizowanego w rozwidleniu między naczyniami doprowadzającymi i odprowadzającymi krew z kłębków nerkowych (sprężenie kłębkowo-kanalikowe). Również wzrost napięcia nerwów sympatycznych (pobudzenie receptorów β -adrenergicznych) wywołany hipowolemią zwiększa niezależnie wydzielanie reniny. W osoczu renina odszczepia z angiotensynogenu deka-peptyd angiotensynę I. Głównym miejscem syntezy angiotensynogenu jest wątroba. Pod wpływem konwertazy angiotensyny (angiotensin converting enzyme, ACE, *ang.*), wytwarzanej głównie w naczyniach włosowatych płuc, od angiotensyny I zostają odszczepione 2 aminokwasy. Powstaje oktapeptyd - angiotensyna II, która zwiększa syntezę aldosteronu w korze nadnerczy. Aldosteron zwiększając reabsorpcję Na^+ w kanaliku dalszym powoduje zatrzymanie w organizmie ekwiwalentnych ilości wody. Proces ten związany ze zmianą poziomu enzymów, syntetyzujących ten steroid, trwa od 2 – 3 dni. Jest więc stosunkowo wolny. Hiperwoleミア w łóżysku naczyniowym uruchamia proces odwrotny.

Osoby spożywające małe ilości sodu w diecie mają stosunkowo wysoki poziom aldosteronu, co umożliwia im efektywniejszą reabsorpcję zwrotną sodu. Jeżeli osoba taka zacznie spożywać większe ilości sodu, to w ciągu 2-3 dni do-

chodzi o stopniowe obniżenie syntezy aldosteronu do poziomu adekwatnego do podaży sodu. W tym czasie bilans Na staje się przejściowo dodatni. Zatrzymaniu sodu w organizmie towarzyszy retencja odpowiedniej ilości wody w PPK. Jest to mechanizm hipertensyjnego działania diety wysokosodowej.



Ryc.6.5 Dystrybucja i bilans sodu i potasu w organizmie

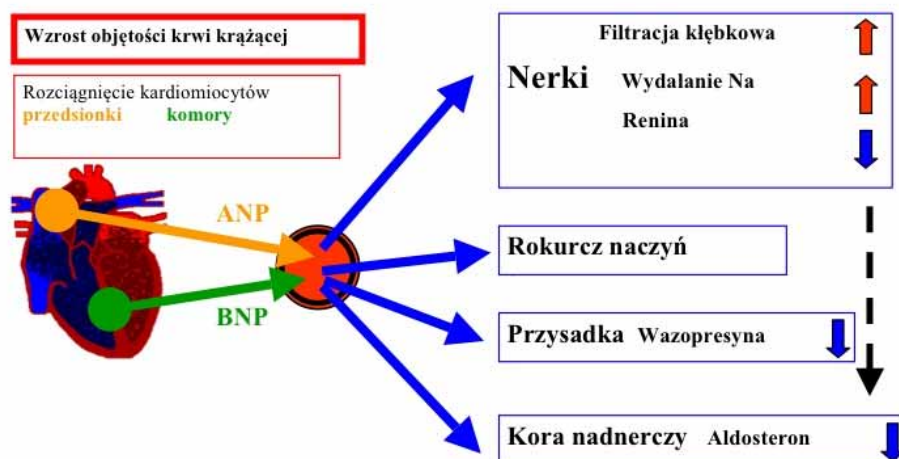
Retencja 1 litra wody zwiększa objętość PPK o około 7%. Z kolei przy przejściu na dietę nisko sodową następuje, w czasie 2-3 dniowej adaptacji, utrata Na i odpowiedniej ilości wody z PPK. W ten sposób **objętość PPK (krwi krążącej) przez regulację wchłaniania zwrotnego w nerce utrzymuje homeostazę Na^+ w organizmie.**

Dodatkowymi czynnikami modyfikującymi działanie sprzężenia objętość krwi-aldosteron są równowaga między ciśnieniem hydrostatycznym i onkotycznym (ryc. 6.3), zmiany miejscowego ukrwienia poszczególnych warstw nerek oraz niezależnie zmiany stanu czynnościowego układu sympatycznego.

6.3.3. Peptydy natriuretyczne

Znaczne zwiększenie objętości krwi krążącej (PPK) pobudza receptory objętościowe przedsionków serca, co powoduje wydzielanie **przedsionkowego peptydu natriuretycznego** (ANP, cykliczny peptyd, 28 aminokwasów) przez miocyty przedsionków. Z kolei kardiomiocyty komór serca wydzielają w podobnej

sytuacji mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP, cykliczny peptyd, 32 aminokwasy). W stanach znacznej hiperwolemii peptydy natriuretyczne mogą działać wazodylatacyjnie.



Ryc. 6.6 Hipowolemiczne działanie peptydów natriuretycznych

Przez to zwiększają one filtrację kłębkową, hamują wydzielanie reniny przez aparat przykłębkowy nerek, a tym samym syntezę aldosteronu (ryc. 6.6). Zwiększają w ten sposób wydalanie Na^+ i wody z moczem. Peptydy te hamują również bezpośrednio reabsorpcję zwrotną Na^+ i wody w kanalikach. Wskutek tego zwiększa się wydalanie sodu i wody przez nerki (natriureza). Powoduje to zmniejszenie objętości PPK i spadek ciśnienia tętniczego krwi (ryc. 6.6). Oznaczanie poziomu BNP w osoczu ma istotne znaczenie w ocenie stopnia zastoinowej niewydolności serca (tab. 6.3). Jego poziom wzrasta wraz ze zwiększeniem się stopnia rozciągnięcia niewydolnych komórek serca, osiągając wartości kilkadziesiąt razy wyższe od punktu odcięcia, w najwyższym stopniu dekomensacji serca (IV stopień NYHA – New York Heart Association).

6.3.4. Regulacja gospodarki potasowej

Organizm człowieka zawiera około 3500 mmoli K^+ , z których 90% znajduje się w PWK, 8% w kościach a tylko 2% w PPK (ryc. 6.6.). Prawidłowe stężenie K^+ w PPK wynosi 3.5 – 5.0 mmol/L. Gradienty stężeń Na^+ i K^+ między PPK i PWK utrzymuje pompa sodowo-potasowa. Część potasu w PWK jest skompleksowana z glikogenem (do 0.3 mmola/g) lub z białkami (do 0.5 mmola/g). Zawar-

tość K^+ w diecie zapewnia odpowiednią do potrzeb podaż kationu rzędu 30-100 mmoli/dobę. Ponad 90% K^+ wydala się z moczem, a reszta z kałem. Ilość K^+ wydalanego z moczem zależy w pierwszym rzędzie od jego poziomu w osoczu i filtracji kłębkowej. Aldosteron zwiększa wydalanie K^+ w kanalikule dalszym. Jest to jednak mechanizm pierwotnie związany z regulacją bilansu Na^+ . Głód nie zmniejsza strat potasu przez nerki. Tym samym może prowadzić do znacznych jego niedoborów. Płyny wydzielane do przewodu pokarmowego zawierają kilku - kilkudziesięciomilimolowe stężenia K^+ , który ulega niemal całkowitej reabsorpcji w jelicie cienkim. Dlatego długotrwale wymioty lub biegunki i inne patologie przewodu pokarmowego mogą powodować znaczną utratę potasu (tab.6.4).

Tabela 6.4. Stężenie elektrolitów w płynach ustrojowych (w mEq/L)

	Na^+	K^+	HCO_3^-	Cl^-
Osocze	140	4	25	102
Sok żołądkowy	50	15	0-15	140
Sok jelitowy	140	10	zmienny	70
Kał biegunkowy	50-140	30-70	20-80	zmienny
Żółć	140	5	40	100
Pot	12	10	-	12

Stężenie K^+ w PPK ma istotne znaczenie dla przewodnictwa, kurczliwości i napięcia mięśnia sercowego, przewodnictwa nerwowego, czynności mięśni szkieletowych i gładkich oraz dla czynności nerek.

6.4. Zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej

6.4.1. Drogi utraty wody i elektrolitów

W warunkach prawidłowych regulacja wydalania wody i jonów przez nerki stanowi podstawowy mechanizm ich homeostazy. W wielu stanach chorobowych znacznie wzrasta ich utrata innymi drogami. W zależności od składu elektrolitowego nadmierna utrata płynów ustrojowych usposabia do wystąpienia różnych zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej i kwasowo-zasadowej. Do płynów, w których stężenie Na^+ zbliżone jest do jego stężenia w osoczu należą: sok trzustkowy, żółć, zawartość jelita cienkiego, płynne stolce, płyn z ran po oparzeniach, przesięki i wysięki do jam ciała. Do płynów zawierających niskie stężenia Na^+ zalicza się sok żołądkowy, pot, zawartość kątnicy, mocz w hiperaldosteronizmie i niedoborze ADH (tab.6.2). Stężenie Na^+ w moczu prawidłowym zależy od podaży wody i sodu w diecie. Oddychanie i parowanie przez skórę powoduje utratę wody. Zaburzenia równowagi między podażą płynów i elektrolitów, a mechanizmami regulującymi ich utratę doprowadza do zaburzeń gospodarki wodno – elektrolitowej.

Stany chorobowe i/lub warunki zewnętrzne powodujące nadmierną utratę wody i/lub nieodpowiednią do strat podaż wody powodują ujemny bilans wody, zmniejszenie całkowitej objętości wody – odwodnienie. Stany dodatniego bilansu wody prowadzą do zwiększenia zawartości wody w ustroju – przewodnień. Poza przypadkami błędów terapeutycznych są one zawsze wynikiem zaburzeń wydzielania ADH lub/i aldosteronu.

6.4.2. Odwodnienia i przewodnienia

Odwodnienia i przewodnienia ze względu na zachowanie stężenia Na^+ i osmolalności efektywnej dzielimy na:

Hipotoniczne – $[\text{Na}^+] < 135 \text{ mmol/L}$ lub/i osmolalność efektywna $< 275 \text{ mosm/L}$. Spowodowane dominującą utratą Na^+ lub retencją wody;

Izotoniczne – $[\text{Na}^+] 135\text{-}145 \text{ mmol/L}$ lub/i osmolalność efektywna $275\text{-}295 \text{ mosm/L}$. Spowodowane równomierną utratą bądź retencją wody i Na^+

Hipertoniczne – $[\text{Na}^+] > 145 \text{ mmol/L}$ lub/i osmolalność efektywna $> 295 \text{ mosm/L}$. Spowodowane dominującą utratą wody lub zatrzymaniem Na^+ (ryc. 6.7, ryc. 6.8). Równocześnie przy prawidłowym bilansie wody mogą istnieć stany hiper- i hipoosmotyczne (ryc. 6.9).

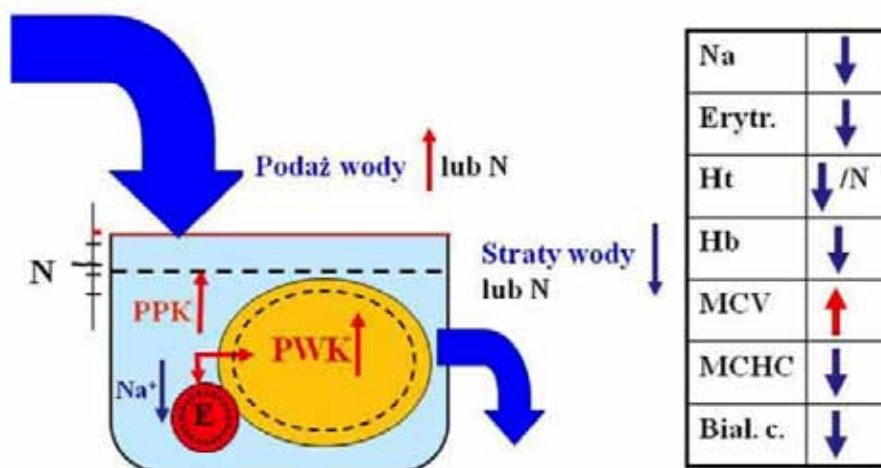
6.4.3. Przewodnienie hipotoniczne

Przewodnienia hipotoniczne i izotoniczne są najczęstszymi zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej spotykanymi w klinice. Powodują one wzrost objętości PPK i PWK (obrzęk komórek) (ryc. 6.7). Wiąże się ono z zaburzeniami wydzielania ADH lub/i aldosteronu. Przyczyną rozwoju i utrzymywania tego zaburzenia jest nadmierna podaż wody przy współistniejącym nieodpowiednio zwiększonym wydzielaniu ADH (Syndrome of Inappropriate ADH Excretion – SIADH, *ang.*).

Sytuacje takie mogą mieć miejsce przy urazach głowy, brzucha, zabiegach operacyjnych, silnych bólach i innych bodźcach stresowych. Przyczyną mogą być również stany zapalne opon mózgowych i mózgu, guzy i ropnie mózgu, jak również zapalenia płuc. Bardzo rzadko przyczyną jest ektopowe wydzielanie ADH przez nowotwory płuc, trzustki, dwunastnicy lub gruczołu krokowego. Niektóre leki takie jak sulfonamidy przeciwcukrzycowe, fibraty, morfina lub indometacyna również stymulują wydzielanie tego hormonu.

Stany chorobowe powodujące nadmierne wydzielanie aldosteronu lub aldosteronu i ADH takie jak niewydolność krążenia, czy też hipoalbuminemia w zespole nerczycowym lub marskości wątroby sprzyjają retencji sodu i wody. W schorzeniach tych pierwotnym sygnałem jest spadek efektywnej objętości krwi krążącej. Również znaczny spadek filtracji w zniszczonych kłębkach w niedomodze nerek prowadzi do przewodnienia hipotonicznego. Pacjenci z SIADH nie mają zwykle obrzęków i nie wykazują retencji sodu. Pacjenci z hiperaldostero-

nizmen wtórnym z reguły mają obrzęki przy nadmiernym zatrzymaniu Na^+ . Ze spadkiem Na^+ poniżej 130 mmol/l nasila się niebezpieczeństwo obrzęku mózgu. Jego objawami są nudności, wymioty, splątanie, drgawki i śpiączka.



Ryc. 6.7 Przewodnienie hipotoniczne

Skróty: Ht, hematokryt; Hb, hemoglobina, MCV (mean cell volume, *ang.*) średnia objętość erythrocyta; MCHC (mean cell hemoglobin content, *ang.*) średnia zawartość hemoglobiny w erythrocycie (rozdział 8); Biał.c., białko całkowite w surowicy; E, erythrocyty; PPK, przestrzeń pozakomórkowa; PWK przestrzeń wewnątrzkomórkowa

Badania laboratoryjne – niskie stężenie Na^+ i białka w surowicy spadek liczby erythrocytów, hematokrytu, stężenia hemoglobiny we krwi oraz średniej zawartości hemoglobiny w krwince (MCHC, Mean Cell Hemoglobin Content, *ang.*). Wartość hematokrytu może być prawidłowa obniżona mniej niż by to wynikało ze stopnia przewodnienia, ze względu na wzrost objętości erythrocytów (ryc. 6.7.). Obserwacje tych parametrów w czasie są wskaźnikiem ustępowania lub nasilania się zaburzenia.

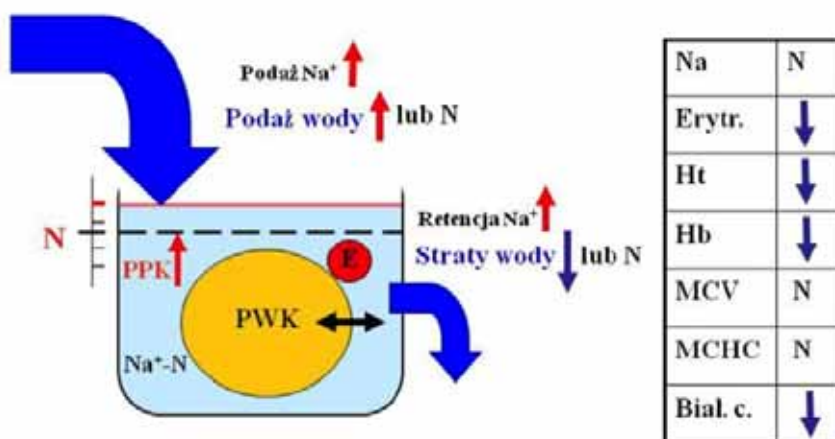
Uwaga! Hipoosmia powoduje wzrost objętości erythrocytów i spadek średniej zawartości hemoglobiny w erythrocytach. Zmiany te można zaobserwować przy wykonywaniu pomiaru hematokrytu metodą manualną (wirówka). We współczesnych analizatorach hematologicznych zastosowanie izotonicznego rozcieńczalnika przed pomiarem niweluje zmiany objętości krwinek wywołane zmianami osmolalności efektywnej.

Leczenie – oprócz leczenia przyczynowego, ograniczenie podaży wody i soli wymuszenie diurezy (mannitol, sorbitol), diuretyki (antagoniści aldosteronu). W ciężkich przypadkach dializoterapia. W przypadku współistnienia zasadowicy

i hipokaliemii (hiperaldosteronizm) konieczne jest równoczesne uzupełnienie niedoborów potasu.

6.4.4. Przewodnienie izotoniczne

Jest to stan retencji równoważnych nadmiernych ilości Na i wody. Wzrost objętości dotyczy tylko PPK; objętość PWK nie ulega zmianie (ryc. 6.8). Najczęstszą przyczyną są stany hiperaldosteronizmu wtórnego (wysoki poziom reniny i aldosteronu) lub pierwotnego (zespół Conna, wysokie stężenie aldosteronu przy niskim poziomie reniny). Retencja sodu pobudza wydzielanie ADH prowadząc do zatrzymania odpowiednich objętości wody w celu utrzymania izoosmii. Są to więc podobne przyczyny, które prowadzą do przewodnienia hipotonicznego. Rodzaj przewodnienia zależy od tego, który z mechanizmów, zależny od ADH czy aldosteronu, przeważa w danej patologii. Rodzaj przewodnienia może również zmieniać się w zależności od stadium choroby, leczenia, objętości i rodzaju przyjmowanych płynów itp.



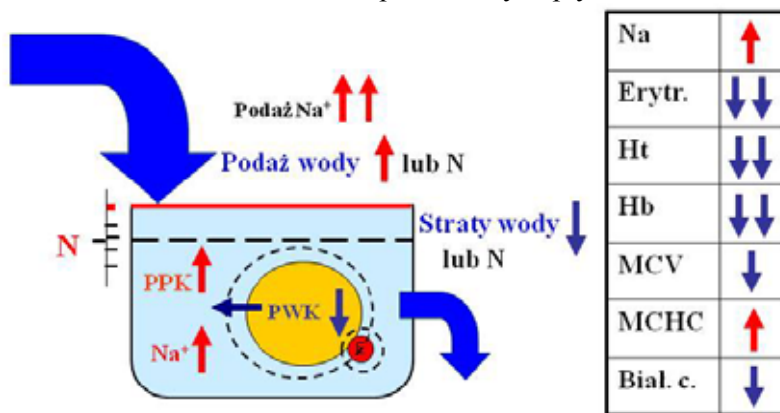
Ryc. 6.8. Przewodnienie izotoniczne. Skróty: jak w ryc. 6.7.

Badania laboratoryjne – przy prawidłowym Na^+ w surowicy, obserwuje się spadek liczby erytrocytów, hematokrytu i stężenia hemoglobiny oraz białka w surowicy proporcjonalny do stopnia przewodnienia. Objętość erytrocytów i MCHC nie ulegają zmianie. W przypadku hiperaldosteronizmu pierwotnego nie występują obrzęki, występuje natomiast nadciśnienie i zasadowica metaboliczna. W hiperaldosteronizmie wtórnym typowym zjawiskiem są obrzęki i hipokaliemia.

Leczenie – oprócz leczenia przyczynowego, ograniczenie podaży wody i soli, a w cięższych stanach wymuszenie diurezy (saluretyki antykaliuretyczne, antagoniści aldosteronu). W przypadku przesieków wykonuje się drenaż płynu z jam ciała.

6.4.5. Przewodnienie hipertoniczne

Jest to stan zwiększonej zawartości wody z relatywnie większą retencją Na^+ i hiperosmią. Objętość PWK jest zmniejszona, a względny wzrost objętości PPK jest większy niż przyrost całkowitej zawartości wody. Wynika to z wyjścia części wody PWK do PPK (ryc. 6.9.). Stan ten powstaje najczęściej wskutek nadmiernej podaży doustnej lub dożylniej płynów izo- lub hipertonicznych u chorych z upośledzoną funkcją nerek lub nadprodukcją aldosteronu. Zaburzenie to występuje u rozbitków pijących wodę morską, dzieci karmionych silnie solonymi pokarmami, u pacjentów z uszkodzoną funkcją nerek, którym podawano pozajelitowo nadmierne ilości izo- lub hipertonicznych płynów elektrolitowych.



Ryc. 6.9. Przewodnienie hipertoniczne. Skróty jak w ryc. 6.7.

Objawy hiperwolemii silnie zaznaczone (napięcie żył, niewydolność lewo komorowa, zastój w płucach, duszność, przyspieszenie oddechu, wzrost ciepłoty ciała, pobudzenie). Jednocześnie pacjenci mają silne uczucie pragnienia.

Badania laboratoryjne - przy wysokim $[\text{Na}^+]$, znacznie obniżony hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów we krwi i stężenie białka całkowitego w surowicy. Objętość wody wewnątrzkomórkowej zmniejszona, czego wskaźnikiem jest spadek wartości MCV i wzrost MCHC (ryc. 6.9).

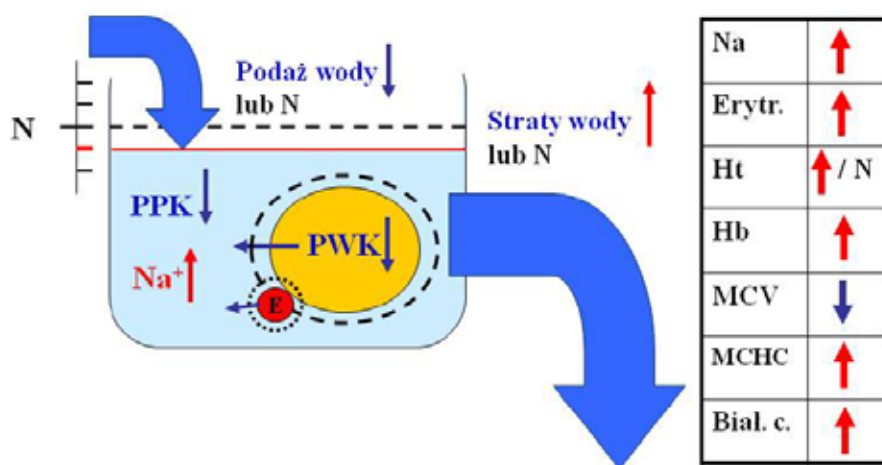
Leczenie – dieta bezsolna, zaprzestanie podawania płynów zawierających Na, podanie diuretyków (furosemid), w późniejszym okresie wlew 5% glukozy, przy upośledzonej funkcji nerek dializoterapia.

6.4.6. Odwodnienie hipertoniczne

Jest to stan dominującej utraty wody w stosunku do utraty sodu. Wskutek tego wzrasta $[\text{Na}^+]$ i osmolalność efektywna. Zmniejsza się objętość zarówno PPK jak i PWK (odwodnienie komórek) (ryc. 6.10). Odwodnienie to powstaje wskutek niedostatecznej podaży wody przy prawidłowej lub nadmiernej podaży sodu. Jest to najczęściej występująca w klinice postać odwodnienia. Do zaburzenia

tego usposabiają: obfite poty, wysoka temperatura zewnętrzna, stany gorączkowe, hiperwentylacja (niewymuszona lub wymuszona) moczówka prosta, diureza osmotyczna (cukrzyca), osłabienie lub brak odruchu pragnienia (nieprzytomni, małe dzieci, osoby w podeszłym wieku, zmiany organiczne w mózgu), brak dostępu do wody.

U osób bez zaburzeń świadomości występuje silne uczucie pragnienia, brak koncentracji, suchość błon śluzowych, gorączka pochodzenia mózgowego, oliguria z wysokim ciężarem właściwym moczu. Objawy hipowolemii występują późno dopiero przy dużej utracie wody. Wynika to z faktu, że objętość PPK jest „uzupełniana” wodą wychodzącą z komórek.



Ryc. 6.10. Odwodnienie hipertoniczne. Skróty jak w ryc. 6.7.

Badania laboratoryjne - przy podwyższonym stężeniu Na^+ wykazują wzrost hematokrytu i stężenia hemoglobiny oraz białka całkowitego. O odwodnieniu komórek świadczy spadek MCV i wzrost MCHC (ryc. 6.10). U dzieci może występować ketonemia („gorączka letnia”).

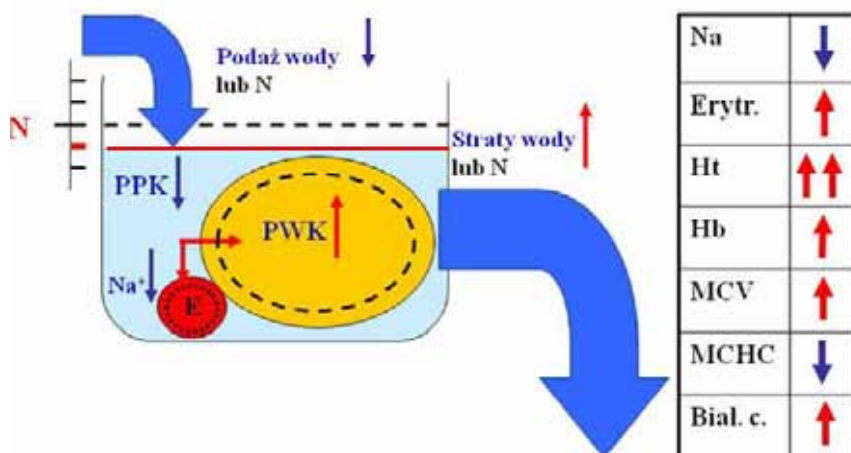
Leczenie – 5% glukoza (z wyjątkiem cukrzycy) dożylnie lub płyny bezelektrolitowe doustnie. Po wyrównaniu osmolalności należy uzupełnić niedobory Na^+ . Zaniedbanie takiego postępowania może spowodować obrzęk mózgu wskutek gwałtownej zmiany osmolalności PPK z hiper- do hipoosmii.

6.4.7. Odwodnienie hipotoniczne

Występuje stosunkowo rzadko. Utrata Na jest większa niż wody. Spadek objętości dotyczy wyłącznie PPK, natomiast objętość PWK jest zwiększona (ryc. 6.11). Odwodnienie to może być spowodowane utratą płynów przez przewód pokarmowy wskutek biegunk, drenaży lub przetok jelitowych, czy też długotrwałych wymiotów przy niedostatecznym uzupełnieniu niedoborów objętości

wodą lub płynami nie zawierającymi elektrolitów. Przyczyny nerkowe to utrata sodu przez nerki przy stosowaniu diuretyków (antagoniści aldosteronu) lub w hipoaldosteronizmie. Sprzyja temu stymulowany przez hipowolemię wzrost wydzielania ADH. Stan ten wymaga intensywnego leczenia wskutek głębokiej hipowolemii powodującej spadek objętości osocza (PPK) nie tylko z powodu odwodnienia, lecz również przemieszczenia wody do komórek. Wzrost objętości erytrocytów zwiększa opory w układzie włośniczkowym, co przy hipowolemii prowadzi szybko do wstrząsu (niskie ciśnienie krwi, tachykardia, spadek diurezy, zaburzenia świadomości). Hipoosmia może również powodować obrzęk mózgu i uciskową depresję ośrodka oddechowego i krążeniowego w rdzeniu przedłużonym.

Badania laboratoryjne – niskie stężenie Na^+ i wzrost białka całkowitego w surowicy, wzrost liczby erytrocytów, i stężenia hemoglobiny oraz bardzo znaczny wzrost hematokrytu krwi. Wartość MCV wzrasta, a MCHC maleje (ryc. 6.11). W przypadku hipowolemicznej przednerkowej niedomogi nerek wzrastają stężenia mocznika i kreatyniny w surowicy.



Ryc. 6.11. Odwodnienie hipotoniczne. Skróty jak w Ryc. 6.7.

Leczenie – doustne uzupełnianie niedoborów sodu i wody (glukoza 5%). Często ze względu na ciężki stan pacjentów i konieczność zapobieżenia pogłębianiu hipoosmii podczas nawadniania konieczne jest dożylne podawanie hipertonicznego roztworu NaCl.

6.4.8. Pseudohiponatremia/hipoosmia rzekoma

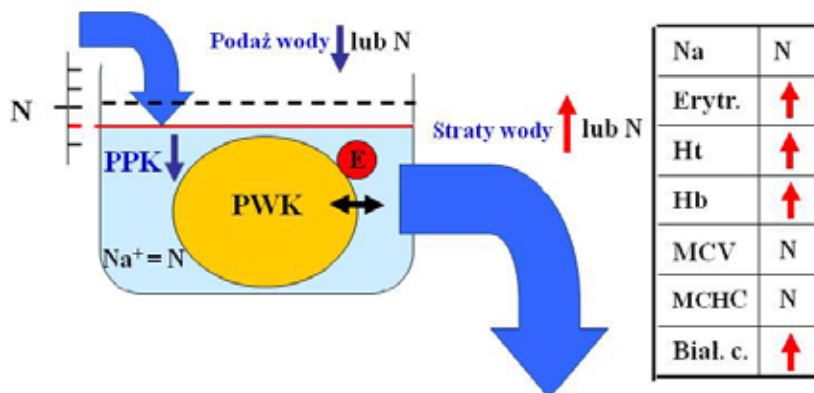
Hiponatremia nie zawsze związana jest ze spadkiem osmolalności efektywnej PPK. Znaczna hiperlipemia lub hiperproteinemia zmniejszają zawartość

wody w surowicy powodując niskie wartości pomiarów Na^+ , którego stężenie w wodzie osocza może być prawidłowe. Sytuacja taka ma miejsce w przypadku oznaczania sodu za pomocą fotometru płomieniowego. Analizatory jonoselektywne eliminują te rozbieżności. Niskie stężenie Na^+ przy wysokim stężeniu glukozy w surowicy w cukrzycy, lub wysokiej wartości luki osmotycznej (mannotol, trucizny) nie wskazuje na istnienie hiposmii. Należy jednak pamiętać, że leczenie tych stanów bez uwzględnienia bilansu Na może prowadzić do stanów hiponatremii.

6.4.9. Odwodnienie izotoniczne

Jest to stan utraty równoważnych ilości Na i wody, a więc bez zmian osmolalności efektywnej PPK (ryc.6.12).

Zmniejszenie objętości dotyczy wyłącznie PPK. Przyczynami zaburzenia mogą być różne rodzaje utraty płynów przewodu pokarmowego, zespół utraty sodu przez nerki (diuretyki, poliuria po ostrej niewydolności nerek), krwotoki, zwiększenie przestrzeni trzeciej, oparzenia. Jest to przeważnie stan przejściowy, przechodzący przy braku leczenia w odwodnienie hipo lub hipertoniczne.



Ryc. 8.12. Odwodnienie izotoniczne. Skróty jak w ryc. 6.7.

Klinicznie dominują objawy hipowolemii, spadek ciśnienia tętniczego, przyspieszenie pracy serca, zapadnięcie żył szyjnych, zmniejszenie elastyczności tkanek, osłabienie, apatia, skąpomocz (z wyjątkiem przypadków z poliuryczną nefropatią, lub po leczeniu odwadniającym), zmniejszenie masy ciała (z wyjątkiem ucieczki płynów do przestrzeni trzeciej).

Badania laboratoryjne - przy prawidłowym stężeniu Na^+ wykazują wzrost hematorytu, liczby erytrocytów, białka całkowitego (z wyjątkiem krwotoków). Wartości MCV i MCHC pozostają niezmienione (ryc. 6.12.).

Leczenie – w zależności od przyczyny podaje się 0.9% NaCl, płyn wieloelektrolitowy, glukozę, oraz płyny zwiększające ciśnienie onkotyczne i krew (przy krwotokach).

6.5. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej

Tabela 6.4. Wpływ zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej na niektóre parametry laboratoryjne

Rodzaj zaburzenia	Na	Erytr	Hb	Ht	MCV	MCHC	Białko całkow.*
Odwodnienie izotoniczne	N	↑	↑	↑	N	N	↑
Odwodnienie hipotoniczne	↓	↑	↑	↑ ↑	↑	↓	↑
Odwodnienie hipertoniczne	↑	↑	↑	N lub	↑ ↓	↑	↑
Przewodnienie izotoniczne	N	↓	↓	↓	N	N	↓
Przewodnienie hipotoniczne	↓	↓	↓	N lub	↓ ↑	↓	↓
Przewodnienie hipertoniczne	↑	↓	↓	↓ ↓	↓	↑	↓

Skróty jak w ryc. 6.7.

Uwaga: Istotne znaczenie mają kolejne obserwacje dynamiki zmian mierzonych parametrów w czasie. Należy również uwzględnić istniejące patologie, które mogą wpływać na w/w/ parametry niezależnie od zaburzeń gospodarki wodno elektrolitowej. *Wzrost stężenia albuminy powyżej wartości prawidłowych jest dobrym wskaźnikiem odwodnienia. Wynika to z faktu, że z wyjątkiem przypadków jatrogennych, nie występuje ani fizjologiczna ani patologiczna hiperalbuminemia.

Podstawą rozpoznania odwodnienia lub przewodnienia jest badanie kliniczne pacjenta. Badania laboratoryjne pomagają w uściśleniu rozpoznania i racjonalizacji terapii wodno-elektrolitowej.

Kolejne pomiary takich parametrów jak hemoglobina, hematokryt, białko całkowite pozwalają na śledzenie kierunku zmian zawartości wody w ustroju. Użyteczność tych badań jest jednak w praktyce ograniczana przez ewentualnie współistniejące patologie powodujące zmiany tych parametrów niezależne od stanu nawodnienia takie jak:

- zespoły utraty białka (nefropatie, enteropatie),

- hiperproteinemie (szpiczak mnogi),
- hipoalbumienia z hipergammaglobulinemia (marskość wątroby),
- anemie (z niedoboru żelaza lub hemolityczne),
- policytemie (czerwienica prawdziwa, hipoksje) itp.

Z kolei oznaczenie stężenia Na ma decydujące znaczenie w ocenie objętości PWK. Jednak i w tym przypadku należy uwzględnić stężenie glukozy i ewentualnie innych związków osmotycznie czynnych (6.4).

Wyniki badań laboratoryjnych mogą być w niektórych sytuacjach użyteczne w obliczaniu wielkości niedoborów wody i elektrolitów. Przy stwierdzonych klinicznie objawach odwodnienia i hipernatremii można obliczyć deficyt wody u pacjenta:

$$\text{Deficyt wody (L)} = 0.6 \times \text{CWC(kg)} \times \left[\frac{[\text{Na}^+]_{\text{akt}} - 145}{145} \right] \quad (5)$$

Można również ocenić wielkość niedoboru Na^+ u pacjenta z hipowolemią i hiponatremią:

$$\text{Deficyt } \text{Na}^+ \text{ (mmole)} = 0.6 \times \text{CWC(kg)} \times (135 - [\text{Na}^+]_{\text{akt}}) \quad (6)$$

W przypadku, gdy utrata objętości PPK powstała w wyniku krwotoku, stopień jej zmniejszenia można obliczyć ze wzoru:

$$\text{Deficyt objętości PPK (L)} = 0.2 \times \text{CWC(kg)} \times \left[\frac{\text{Ht}_{\text{akt}} - \text{Ht}_n}{\text{Ht}_n} \right]$$

U pacjenta z ostrym przewodnieniem hipotonicznym (zatrucie wodne) można obliczyć liczbę milimoli Na^+ potrzebnych do podwyższenia jego stężenia do względnie bezpiecznego poziomu 125 mmol/L:

$$\text{Wymagany } \text{Na}^+ \text{ (mmole)} = 0.6 \times \text{CWC(kg)} \times (125 - [\text{Na}^+]_{\text{akt}}) \quad (8)$$

W zależności od rodzaju odwodnienia stosuje się odpowiednie płyny infuzyjne. Spośród trzech podstawowych płynów infuzyjnych:

- roztwór 5% glukozy służy do uzupełnienia objętości wszystkich przedziałów wodnych organizmu: PWK, płynu śródmiąższowego i osocza krwi. Uzupełnia również straty wody związane z oddychaniem i parowaniem przez skórę;
- roztwór 0,9% NaCl uzupełnia niedobory wody w PPK (płynu śródmiąższowego i osocze krwi);
- osocze krwi, zwiększa objętość krwi krążącej.

Uwaga. U pacjentów nie przyjmujących płynów samodzielnie nie wolno podawać 0,9% NaCl jako jedyne go płynu infuzyjnego. Prowadzi to zaburzeń hiperosmotycznych, ze względu na utratę czystej wody z oddechem i przez skórę.

Zastosowanie wymienionych wzorów nie zwalnia od ścisłego monitorowania przebiegu leczenia zaburzeń wodno-elektrolitowych.

6.6. Zaburzenia gospodarki potasowej

6.6.1. Hiperkalemia

Jest to stan, w którym stężenie K^+ w osoczu wzrasta powyżej 5 mmol/L. Trwała i wysoka hiperkalemia spowodowana niedomogą nerek zawsze wskazuje na retencję nadmiernych ilości K^+ w organizmie. Hiperkalemia może również występować przy sprawnych nerkach w kwasicach metabolicznych w cukrzycy i innych chorobach metabolicznych (odwodnienie, katabolizm białek i glikogenu, wyjście z komórek). Powoduje to wyjście K^+ z komórek wskutek buforowania jonów wodorowych (patrz rozdz. 5). Bilans K^+ jest ujemny z powodu jego utraty przez nerki. W takich przypadkach stężenie K^+ w osoczu nie przekracza 6 mmol/l. Natomiast współistnienie kwasicy i normo lub hipokalemii świadczy o głębokim niedoborze K^+ . Hiperkalemia z dodatnim bilansem K^+ może występować w: mocznicowej niedomodze nerek (zmniejszone wydalanie przy normalnej podaży, zwiększone wyjście z komórek), zespole zmiążdżenia, urazach wielonarządowych (zmniejszone wydalanie, wypływ z komórek), niewydolności kory nadnerczy (niedobór aldosteronu, ograniczenie wymiany z Na w nerkach), hemolizie wewnątrznaczyniowej, oparzeniach (wyjście z komórek), przewlekłym leczeniu antagonistami aldosteronu oraz dysfunkcjach kanalików nerkowych (zahamowanie sekrecji K^+ przez kanaliki, kwasice kanalikowe). Współistnienie zasadowicy metabolicznej i normokalemii świadczy o nadmiernej akumulacji potasu w organizmie.

Objawy kliniczne zależą od wielkości i szybkości narastania hiperkalemii. Stężenia powyżej 8.0 mmol/L powodują zwolnienie akcji serca, dodatkowe skurcze w końcu zatrzymanie serca w rozkurczu. W EKG skrócenie odcinka ST, wysokie spiczaste T, szerokie QRS oraz zanik załamka P. Występują parestezje (zaburzenie przewodnictwa nerwowego) i porażenia mięśni szkieletowych. Nie ma przy tym korelacji między wielkością hiperkalemii, a występującymi u pacjenta objawami kardi toksycznymi. Przy wolno narastającej hiperkalemii chorzy mogą dobrze tolerować nawet wysokie jej wartości.

Leczenie - W przypadkach niedomogi nerek przy poziomach do 6.5 mmol/L – maksymalne ograniczenie podaży K^+ w diecie, żywice jonowymienne, ewentualne wymuszenie diurezy, podanie glukozy i insuliny; przy stężeniach powyżej 6.5 mmol/L - dializoterapia. Wyrównywanie kwasic z prawidłową diurezą po-

winno obejmować jednocześnie uzupełnianie niedoborów K^+ . Nieodłącznym elementem leczenia jest ściśle monitorowanie zmian stężenia K^+ w surowicy.

6.6.2. Hipokalemia

Hipokalemia to stan z $[K^+]$ w osoczu poniżej 3.5 mmol/L. Wskazuje on z reguły na niedobór tego kationu w organizmie, szczególnie, gdy wywiad wskazuje na zaburzenia usposabiające do jego utraty (biegunki, wymioty, stosowanie diuretyków, nadużywanie leków przeczyszczających). Poza tym hipokalemię wywołuje niedostateczna podaż K^+ w diecie i głodzenie lub nadmierna utrata z moczem (hiperaldosteronizm pierwotny i wtórny, zespół Cushinga, zapalenie nerek z utratą potasu, kwasice cewkowe, leczenie ketonowej kwasicy cukrzycowej bez podawania K^+ , leki nefrotoksyczne, niedobór magnezu).

Klinicznym objawem niedoboru potasu jest częstoskurcz, migotanie komór, w EKG spłaszczenie fali T, obniżenie odcinka ST. Upośledzenie funkcji mięśni gładkich – *ileus paralyticus.*, porażenie pęcherza, osłabienie napięcia mięśni szkieletowych, rozpad mięśni (*rhabdomyolysis*), utrata zdolności zągęszczania moczu, apatia, parestezje w końcowych przypadkach śpiączka.

Orientacyjna ocena niedoboru K^+ . Na podstawie doświadczeń klinicznych wiadomo, że spadek $[K^+]$ z 4 do 3 mmol/L odpowiada niedoborowi 150 mmoli K^+ , z 3 do 2 mmol/L niedobór dalszych 300 mmoli, a z 2 do 1.5 mmol/L niedobór dalszych 150 mmoli.

Leczenie - uzupełnianie niedoborów drogą doustną lub/i dożylną. Szybkość infuzji K^+ nie powinna przekraczać 20 mmoli/godz przy stężeniu w płynie infuzyjnym nie przekraczającym 70 mmol/L w 5% roztworze glukozy. W przypadku, gdy przyczyną hipokalemii jest hiperaldosteronizm podawać aldacton. Przy występowaniu hipochloremii w alkalozach metabolicznych – uzupełnić Cl^- infuzją 0.9% roztworu NaCl (jeżeli nie występuje przewodnienie). W kwasicach kanalikowych korekta niedoboru zasad za pomocą $NaHCO_3$. Natomiast podawanie dodatkowych ilości K^+ poza zawartymi diecie zwykle nie jest konieczne.

6.6.3. Hiperkalemia rzekoma

Należy pamiętać o błędzie (artefakcie) przelaboratoryjnym występującym przy zbyt długim przechowywaniu pełnej krwi, szczególnie w temperaturze lodówki, spowodowanym wyjściem K^+ z erytrocytów do osocza lub surowicy zgodnie z gradientem stężeń. Może ona również występować we krwi chorych z przewlekłą białaczką szpikową lub nadpłytkowością wskutek rozpadu tych komórek w warunkach *in vitro*.

6.7. Hormonalne podłoże zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej

6.7.1. Wartości referencyjne hormonów regulujących gospodarkę wodno-elektrolitową

Poziomy aldosteronu i reniny u ludzi zdrowych uzależnione są od pozycji ciała. Pionizacja zwiększa, a utrzymanie pozycji leżącej powoduje obniżenie poziomu tych hormonów. Dieta wysokosodowa obniża, a niskosodowa podwyższa poziom aldosteronu w osoczu. Dlatego badanie podstawowego poziomu aldosteronu powinno być wykonywane u ludzi pozostających w pozycji leżącej, spożywających 100-200 mmoli Na na dobę (tab. 6.3). Wartości referencyjne dla pozycji spionizowanej są wyższe i w połączeniu z wynikiem badania w pozycji leżącej mogą być traktowane jako test czynnościowy (tab. 6.3).

Wartość poziom referencyjnego ADH zależy od aktualnej osmolalności PPK. Zwiększa się ona wraz ze wzrostem osmolalności osocza (tab. 6.3).

Tabela 6.3. Wartości referencyjne dla biologicznie czynnych białek regulujących gospodarkę wodno-elektrolitową

Parametr	Wartości referencyjne
Renina (O) masa	3 – 19 ng/L
pozycja leżąca	
pozycja stojąca	5 – 40 ng/L
aktywność	
pozycja leżąca	0.5 – 1.6 µg/godz/L
pozycja stojąca	2 – 5 krotny wzrost
Konwertaza angiotensyny (ACE) (S)*	1.9 – 7.0 µmol/min/L
Aldosteron (S) pozycja leżąca	30 - 440 pmol/L (10 - 160 ng/L)
pozycja stojąca	110 - 860 pmol/L (40-310 ng/L)
Aldosteron (M) wydalanie dobowe	9 - 34 nmol/24godz. (5–19 µg/24 godz.)
Hormon antydiuretyczny (ADH) (O)	
Osmolalność osocza	270-280
(mosm/kgH ₂ O)	281-285
	286-290
	291-295
	296-300
	<1.4 pmol/L (<1.5 ng/L)
	<2.3 pmol/L (<2.5 ng/L)
	0.9 - 4.6 pmol/L (1 – 5 ng/L)
	1.9 - 6.5 pmol/L (2 - 7 ng/L)
	3.7 - 11.1 pmol/L (4 – 12 ng/L)
Mózgowy czynnik natriuretyczny (BNP) (O)	<135 ng/L

*Aktywność konwertazy angiotensyny wzrasta znacznie w sarkoidozie układowej, szczególnie w postaci płucnej (95% przypadków). Skróty: (O) osocze, (S) surowica, (M) moczu.

6.7.2. Hiperaldosteronizm

Mianem tym określamy zespół chorobowy spowodowany nadmiarem aldosteronu. Jeżeli przyczyną jego są pierwotne zmiany patologiczne nadnerczy, mówimy o hiperaldosteronizmie pierwotnym, jeśli natomiast nadmiar aldosterono-

nu wywołany jest przyczynami pozanadnerczowymi, określamy go jako hiperaldosteronizm wtórny.

A. Hiperaldosteronizm pierwotny (zespół Conn'a), jest spowodowany pojedynczym lub mnogim gruczolakiem, rzadko rakiem kory nadnerczy wydzielającym aldosteron lub obustronnym przerostem kory nadnerczy (hiperaldosteronizm samoistny). Objawami klinicznymi są: wysokie nadciśnienie tętnicze (charakterystyczne jest wysokie ciśnienie rozkurczowe), bóle głowy, osłabienie siły mięśni, wzmożone pragnienie, wielomocz, pojawiają się parestezje i objawy tężyzkowe.

W badaniach laboratoryjnych obserwuje się hipokaliemię (występuje zawsze) i zasadowicę metaboliczną, hiperkaliurię, wzrost stężenia aldosteronu w surowicy, niski poziom reniny (niska aktywność reninowa osocza), hipernatremię (50% przypadków)

B. Hiperaldosteronizm wtórny z nadciśnieniem jest stanem często występującym w klinice, w którym wzrost stężenia aldosteronu jest spowodowany nadmiernym pobudzeniem kory nadnerczy przez układ renina-angiotensyna. Ma to miejsce w nadciśnieniu złośliwym, guzach produkujących reninę, *periarteritis nodosa*, chorobach mięszu nerek oraz obrzękach spowodowanych redystrybucją wody poza naczynia w niedomodze serca, marskości wątroby (hipoalbuminemia) i zespole nerczycowym (hipoalbuminemia). W ciąży hiperaldosteronizm ma na celu zwiększenie objętości PPK. W 20 tygodniu ciąży jego poziom jest 4-krotnie wyższy od wartości wyjściowych.

Hiperaldosteronizm wtórny bez nadciśnienia występuje z nerkowych zespołach utraty sodu, nerkowej kwasicy kanalikowej i zespole Bartter'a.

Nieco inne zmiany w wynikach badań laboratoryjnych spotyka się również w tzw. **pseudohiperaldosteronizmie**. Pojawia się on w zespole Cushinga jako wynik mineralokortykoidowego działania kortyzolu, zespole nadnerczowo-płciowym (wrodzony niedobór 21-hydroksylazy lub 11-hydroksylazy) zespole rzekomego nadmiaru mineralokortykoidów (wrodzony defekt dehydrogenazy 11 beta-hydroksykortykosteroidów itp. Cechuje się niską aktywnością reninową, niskim poziomem aldosteronu przy obecności hipokalemii i zasadowicy metabolicznej.

6.7.3. Hipoaldosteronizm

Jest to zespół chorobowy cechujący się niskim stężeniem aldosteronu w surowicy. Hipoaldosteronizm **pierwotny** towarzyszy hipokortyzolemii w chorobie Addison'a spowodowanej uszkodzeniami kory nadnerczy o różnej etiologii (rozdz. 10). Izolowany niedobór aldosteronu jest spowodowany genetycznie uwarunkowanymi defektami jego syntezy, w tym niedoborem 18-hydroksylazy. Poziom reniny jest w tych przypadkach podwyższony. Hipoaldosteronizm **wtórny** ma podłoże nerkowe w postaci nefropatii cukrzycowej, neuropatii polekowej (leki przeciwbólowe) upośledzających syntezę reniny.

6.7.4. Zespół nieodpowiedniego wydzielania ADH (SIADH)

SIADH może być kliniczną manifestacją różnych nowotworów: raka drobno komórkowego płuc (o 40% przypadków), raków dwunastnicy, trzustki, macicy, pęcherza moczowego i gruczołu krokowego jak również grasiczaków i złośliwych chłoniaków (50% przypadków SIADH). Występuje on również w przebiegu wirusowych i bakteryjnych zapaleń płuc, ropni płuc, gruźlicy, aspergilozy, dychawicy oskrzelowej, zwyrodnienia włóknisto-torbielowatego. Również szereg patologii ośrodkowego układu nerwowego: zapalenie mózgu i opon mózgowych, guzy mózgu, urazy czaszkowe, krwotoki podpajęczynówkowe, zakrzepica zatok jamistych, hipoksja u noworodków, zespół Guillain-Barre i stwardnienie rozsiane mogą nadmiernie stymulować wydzielanie ADH. Cechą charakterystyczną jest hiperwoleミア z hiponatremią spowodowana nadmierną retencją wody w kanalikach zbiorczych. Przy poziomach $\text{Na} < 125 \text{ mmol/L}$ pojawia się zagrożenie obrzękiem mózgu. Mimo tego wydalanie sodu z moczem $> 20 \text{ mmol/L}$, jest nieodpowiednio wysokie w stosunku do hiponatremii wskutek istniejącej hiperwoleмии. Niskie są stężenia kwasu moczowego i mocznika. Pacjenci stają się apatyczni, pojawia się ból głowy, nudności, drgawki i zaburzenia świadomości.

6.7.5. Moczówka prosta (*diabetes insipidus*)

Zespół moczówki prostej **pochodzenia podwzgórzowego** pojawia się przy niedostatecznym wydzielaniu ADH przez uszkodzone fizycznie lub farmakologicznie podwzgórze i/lub tylny płat przysadki mózgowej. Uszkodzenie to mogą powodować urazy czaszki, zabiegi neurochirurgiczne tych okolic mózgu, nowotwory przysadki a także infekcje, zmiany ziarniniakowe i autoimmunizacyjne. Istnieją postaci wrodzone; jedna z nich pojawia się w okresie pokwitania. Wydzielanie ADH hamują: alkohol etylowy, winblastyna, i klonidyna. W zależności od stopnia niedoboru diureza waha się od 3 do 15 L/dobę, a osmolalność moczu jest $< 100 \text{ mosm/kg H}_2\text{O}$. Stężenie Na w surowicy utrzymuje się w granicach normy poprzez zwiększoną podaż wody stymulowaną pragnieniem przy nieodpowiednio niskim poziomie ADH w osoczu. Podczas testu pozbawienia płynów osmolalność moczu nie wzrasta powyżej $300 \text{ mosm/kg H}_2\text{O}$. Natomiast po podaniu preparatu ADH osmolalność moczu przekracza wartości $750 \text{ mosm/kg H}_2\text{O}$.

Moczówka prosta nefrogenna - oporna na ADH, może być spowodowana rzadką wrodzoną bądź znacznie częstszą nabytą niezdolnością nerek do wytworzenia środowiska hiperosmotycznego ($\sim 1400 \text{ mosm/kg H}_2\text{O}$) w rdzeniu nerki. Poliurii i brakowi zdolności do zagęszczania moczu towarzyszy prawidłowy poziom ADH w osoczu. Ta druga postać może być wywołana chorobą nerek (wielotorbielowatość, zmiany zapalne) jak również przez hipokalemię, hipokalcemię oraz leki (lit, metoksyfluran, amfoterycyna B, metycylina, gentamycyna itp.). Wrodzone postacie moczówki mają cięższy przebieg (diureza 10-12 L/dobę) niż postacie nabyte (diureza 3-4 L/dobę).

7. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZABURZEŃ GOSPODARKI WAPNIOWO-FOSFORANOWO-MAGNEZOWEJ

Małgorzata Wróblewska

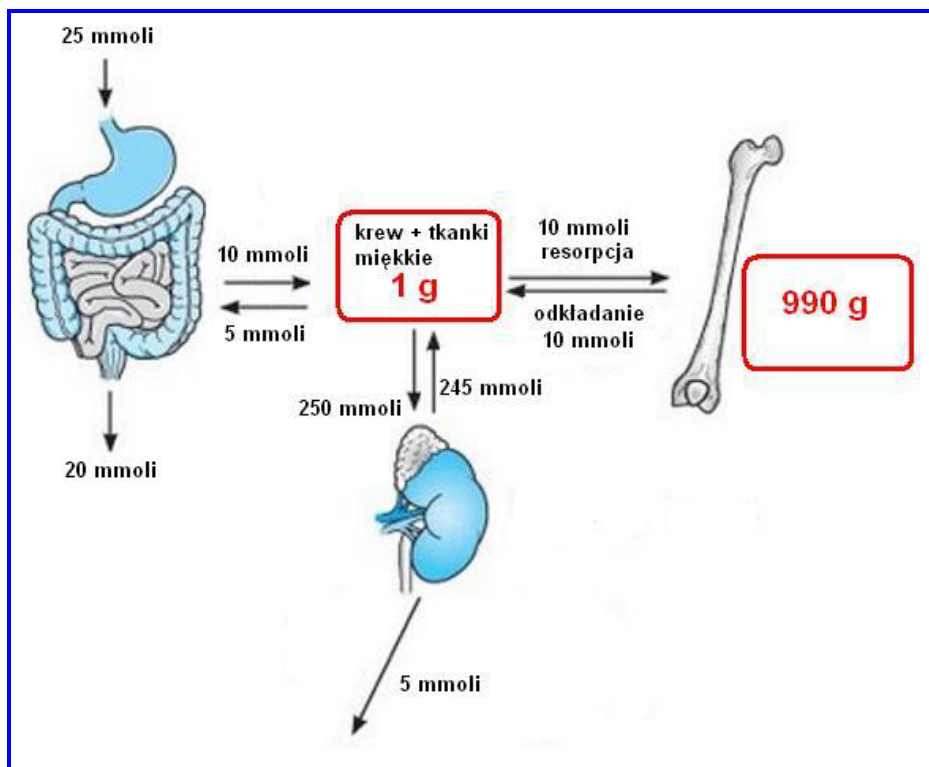
7.1. Wapń w organizmie. Bilans wapnia

W organizmie dorosłego człowieka znajduje się około 25 moli wapnia (ok. 1 kg), z czego 99% zgromadzone jest w kościach, w postaci hydroksyapatytów. Wapń pełni w nich przede wszystkim rolę budulca masy kostnej, ale kości to także rezerwuar wapnia potrzebny do utrzymania homeostazy jonu wapniowego w płynie pozakomórkowym i wewnątrzkomórkowym. Ocenia się, że około 1% wapnia zawartego w kościach ulega swobodnej wymianie z jonami wapniowymi w płynie pozakomórkowym.

Jony wapnia znajdujące się w osoczu tworzą trzy pule: około 46% stanowi wolny jon wapniowy, około 44% jonu wapniowego jest związane z białkami osocza, głównie z albuminą i 10% to jon wapniowy występujący w postaci kompleksów z anionami organicznymi (cytrynianowym, fosforanowym). Fizjologicznie aktywny jest wolny jon wapniowy, w badaniach laboratoryjnych zwany powszechnie „wapniem zjonizowanym”. Stężenie wolnego jonu wapniowego jest ściśle regulowane, a jego zmiany wpływają na ważne procesy fizjologiczne, takie jak np. przewodnictwo nerwowo-mięśniowe, przepuszczalność błon plazmatycznych, sekrecja hormonów.

Dobową podaż wapnia u przeciętnego dorosłego człowieka ocenia się na ok. 25 mmoli (ok. 1 g), z czego w jelitach wchłania się w optymalnych warunkach 20-40%. Znaczna ilość wapnia znajduje się też w płynach wydzielanych do światła przewodu pokarmowego, tak więc w sumie netto wchłanianie wapnia kształtuje się średnio na poziomie około 5 mmol/dobę. Wynika z tego, że w warunkach obniżonej podaży wapnia ilość wydzielana przez przewód pokarmowy może przewyższać ilość wchłanianą i stosunkowo szybko może wówczas dojść do bezwzględnego niedoboru wapnia w organizmie (ryc. 1).

Wolne i skompleksowane jony wapniowe ulegają filtracji w kłębkach nerkowych (jest to około 250 mmol/24h). 98% jonów wapnia ulega zwrotnej resorpcji w nerce. Odbywa się ona głównie w kanalikach proksymalnych (ok. 65%), gdzie jest ściśle związana z resorpcją jonów sodowych. W dalszych częściach kanalików nerkowych resorpcja wapnia jest regulowana przez hormony, głównie przez parathormon i prawdopodobnie przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. U zdrowego człowieka dobowe wydalenie wapnia z moczem odpowiada ilości wchłanianej w jelicie (bilans ≈ 0) i wynosi od 2,5 do 7,5 mmol/24h (ryc. 7.1).



Ryc. 7.1. Bilans wapnia

7.2. Hormonalna regulacja stężenia wapnia

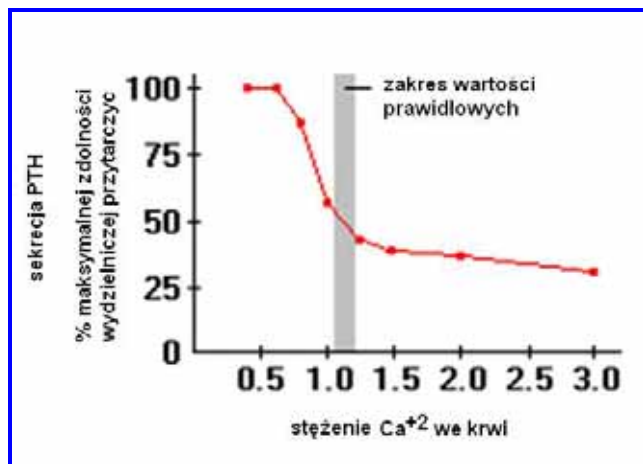
Główne znaczenie w utrzymaniu homeostazy wapnia w płynie pozakomórkowym odgrywają dwa hormony - parathormon (PTH) i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, których działanie podwyższa poziom jonów wapniowych. Jedynym hormonem o działaniu hipokalcemizującym jest kalcytonina, ale jej rola fizjologiczna pozostaje niejasna.

7.2.1. Regulacja sekrecji PTH.

Parathormon jest wytwarzany w gruczołach przytarczycznych. Postać wydzielana do krwi zbudowana jest z 84 aminokwasów (1-84 PTH), z czego 34 pierwsze aminokwasy odcinka N-terminalnego odpowiadają za właściwą aktywność biologiczną PTH. Okres półtrwania PTH we krwi ($t_{1/2}$) wynosi <5 minut.

Najważniejszym czynnikiem regulującym wydzielanie PTH jest stężenie wolnych jonów wapniowych w płynie pozakomórkowym. Pośredniczą w tym receptory wapniowe (Ca-R) znajdujące się w błonach komórkowych komórek

przytarczyc. Niski poziom wapnia stymuluje wydzielanie cząsteczek 1-84 PTH. Pobudzenie receptora przez wysokie stężenie jonów wapniowych indukuje kaskadę sygnałów prowadzących do zahamowania nie tylko produkcji i sekrecji PTH, ale do degradacji wewnątrzkomórkowej już wytworzonego PTH. Krzywa zależności pomiędzy stężeniem wolnego jonu wapniowego, a ilością wydzielanego PTH ma charakter sigmoidalny (ryc. 7.2).



Ryc. 7.2. Zależność pomiędzy wydzielaniem PTH przez przytarczycę i stężeniem wolnego jonu wapniowego we krwi.

Mutacje zmieniające wrażliwość Ca-R na jony wapniowe mogą być przyczyną wrodzonych hiper- lub hipokalcemii, zazwyczaj asymptomatycznych. Częściej występują mutacje inaktywujące (obniżona wrażliwość Ca-R), które powodują **rodzinną hipokalcjuriyczną hiperkalcemię** (FHH). Poziom PTH może być w tym wypadku prawidłowy lub nieco podwyższony. Wydalanie wapnia z moczem jest niższe, niż należałoby tego oczekiwać, biorąc pod uwagę stężenie wapnia we krwi. Zaburzenie wymaga różnicowania z pierwotną nadczynnością przytarczyc. W tym celu zaleca się wykonanie pomiarów stężenia wapnia u krewnych pierwszego stopnia oraz wyliczenie frakcyjnego wydalania wapnia z moczem (FE_{Ca}). Wynik $<1\%$ sugeruje FHH (uwaga! wszystkie parametry muszą być wyrażone w tych samych jednostkach).

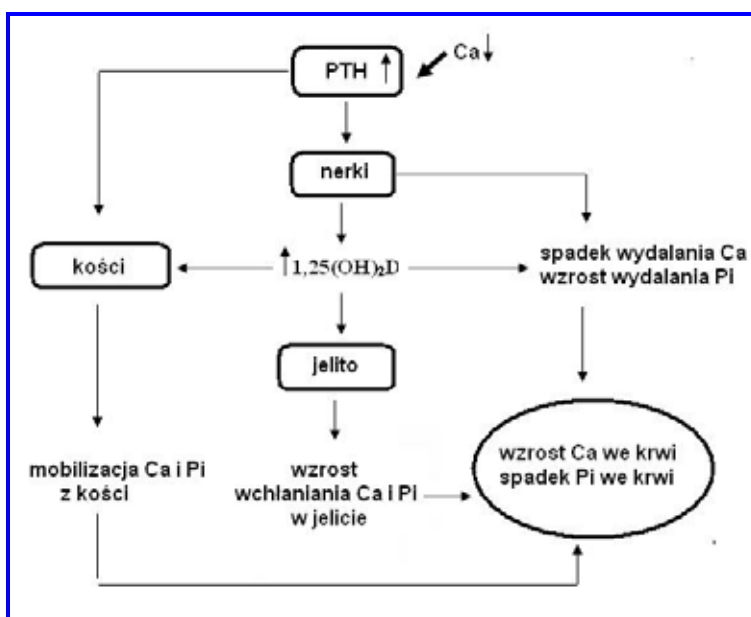
$$\text{FE}_{\text{Ca}} = \frac{\text{stężenie Ca w moczu} \times \text{stężenie kreatyniny w surowicy}}{\text{stężenie Ca w surowicy} \times \text{stężenie kreatyniny w moczu}} \times 100\%$$

7.2.2. Efekty biologiczne działania PTH

PTH, poprzez specyficzny receptor (PTH-R), wpływa na homeostazę zarówno wapnia jak i fosforu. Narządami docelowymi dla PTH są kości, nerki i pośrednio przewód pokarmowy (tab. 7.1, ryc. 7.3).

Tabela 7.1. Wpływ PTH na kości i nerki

Kości	przewlekła ekspozycja na podwyższony poziom PTH powoduje mobilizację Ca^{+2} z kości
Nerki	- wzrost resorpcji zwrotnej Ca^{+2} w kanaliku dystalnym i części wstępującej pętli Henlego - stymulacja aktywności 1-α hydrolazy w kanaliku proksymalnym. Enzym ten katalizuje przekształcenie 25(OH)D_3 (zapasowa formy witaminy D_3) w 1,25(OH)$_2\text{D}_3$ (najbardziej aktywna postać witaminy D_3, stymulująca wchłanianie wapnia i fosforu z przewodu pokarmowego) - hamowanie resorpcji zwrotnej fosforanów w kanaliku proksymalnym (efekt fosfaturyczny)



Ryc. 7.3. Mechanizm podwyższania poziomu wapnia we krwi przez PTH

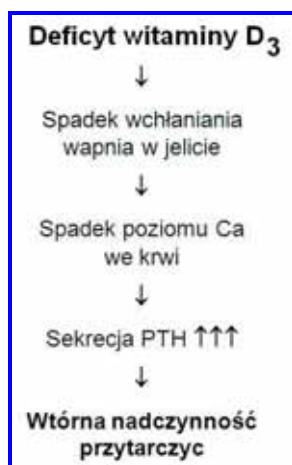
7.2.3. Rola witaminy D_3 w homeostazie wapnia

Głównym miejscem syntezy najbardziej aktywnej formy witaminy D_3 - 1,25-dwuhydroksycholekalcyferolu ($1,25(OH)_2D_3$, kalcytriol) są kanaliki proksymalne nerek, gdzie występuje specyficzny enzym 1- α hydrolaza, katalizujący dołączanie grupy hydroksylowej do cząsteczki $25(OH)D_3$ w pozycji 1. Wytwarzanie $1,25(OH)_2D_3$ jest ściśle kontrolowane, a głównymi czynnikami stymulującymi 1- α hydrolazę są: podwyższony poziom PTH, hipofosfatemia i hipokalcemia.

$1,25(OH)_2D_3$ bierze udział w utrzymywaniu odpowiedniego stężenia jonu wapniowego w płynie pozakomórkowym przede wszystkim przez stymulowanie absorpcji wapnia (i fosforanów) w przewodzie pokarmowym. W stanach deficytu $1,25(OH)_2D_3$ wchłanianiu ulega tylko 10-15% wapnia zawartego w pokarmach. Stymulacja wchłaniania wapnia przez $1,25(OH)_2D_3$ odbywa się przez pobudzanie syntezy białka wiążącego wapń w jelicie cienkim – kalbindyny. $1,25(OH)_2D_3$ działa także na kości (synergistycznie z parathormonem), stymulując mobilizację wapnia i fosforanów. Ponadto $1,25(OH)_2D_3$ jest czynnikiem hamującym proliferację przytarczyc.

Podstawowym badaniem służącym do oceny niedoborów witaminy D_3 jest jednak pomiar stężenia we krwi nie $1,25(OH)_2D_3$, lecz $25(OH)D_3$. Postać ta, syntetyzowana w wątrobie z cholekalcyferolu, jest główną formą witaminy D_3 w krwiobiegu. Wytwarzanie $25(OH)D_3$ nie podlega regulacji – im więcej witaminy D_3 pojawia się w organizmie, tym więcej powstaje $25(OH)D_3$. Stężenie $25(OH)D_3$ wskazuje zatem na stan „zapasu” witaminy D w organizmie.

Hipokalcemia spowodowana niedoborem witaminy D_3 może prowadzić do wtórnej nadczynności przytarczyc (ryc. 7.4).



Ryc. 7.4 Mechanizm rozwoju wtórnej nadczynności przytarczyc w stanie deficytu witaminy D_3

7.2.4. *Kalcytonina*

Kalcytonina (37-aminokwasowy peptyd) jest wydzielana przez komórki parafolikularne tarczycy (komórki C) w odpowiedzi na hipokalcemię. Jej $t_{1/2}$ wynosi około 5 minut. Działanie farmakologiczne kalcytoniny polega na hamowaniu aktywności osteoklastów, a przez to również uwalniania wapnia z kości. Fizjologiczna rola kalcytoniny pozostaje niejasna. Brak kalcytoniny (po usunięciu tarczycy) lub jej nadmierna produkcja (u chorych z rakiem rdzeniastym tarczycy) nie powodują odpowiednio hiperkalcemii lub hipokalcemii, ani innych zaburzeń gospodarki mineralnej. Być może odgrywa ona ważne znaczenie w okresie ciąży i laktacji, ponieważ wówczas wzrasta jej stężenie we krwi. Pomiar stężenia kalcytoniny we krwi są wykorzystywane głównie w rozpoznawaniu i monitorowaniu przerostu komórek C i raka rdzeniastego tarczycy.

7.3. Podstawowe badania laboratoryjne stosowane w diagnostyce zaburzeń gospodarki wapniowej.

Tabela 7.2 Podstawowe badania laboratoryjne stosowane w diagnostyce zaburzeń gospodarki wapniowej

Badanie	Przedziały wartości referencyjnych*
Stężenie wapnia całkowitego	8,5 - 10,0 mg/dL (2,12 - 2,62 mmol/L)
Stężenie wapnia zjonizowanego	1,16 - 1,32 mmol/L
Stężenie PTH	10,65 pg/mL
Stężenie albuminy	35 - 50 g/L
Stężenie białka całkowitego	60 - 80 g/L
Stężenie fosforanu nieorganicznego:	
noworodki	4,0 - 8,5 mg/dL (1,29 - 2,75 mmol/L)
dzieci	3,5 - 4,5 mg/dL (1,13 - 1,45 mmol/L)
dorośli	3,0 - 4,5 mg/dL (0,97 - 1,45 mmol/L)
Stężenie magnezu	1,9 - 2,5 mg/dL (0,8 - 1 mmol/L)
Wydalanie wapnia z moczem	100 - 250 mg/dobę (2,5-6,2 mmol/dobę)
Wydalanie fosforanów z moczem	0,42 - 2,2 g/dobę (13,5-70 mmol/dobę)
Klirens kreatyniny	K <40 lat: 88 - 128 mL/min/1,73m ² M <40 lat: 97 - 137 mL/min/1,73m ²
Stężenie 25(OH) ₂ D ₃	10 - 50 ng/mL (25 - 125 nmol/L)

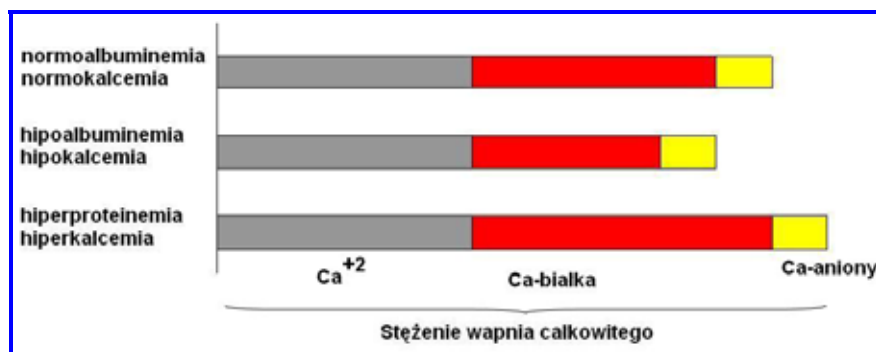
* Przedziały wartości referencyjnych mogą różnić się w zależności od stosowanych metod analitycznych i populacji, dlatego zawsze należy odnosić wyniki badań do zakresów podawanych przez laboratorium wykonujące badania.

7.3.1. Wapń całkowity

Podstawowym badaniem laboratoryjnym w diagnozowaniu zaburzeń gospodarki wapniowej jest pomiar stężenia wapnia całkowitego. Wykonuje się go za pomocą metod chemicznych. Materiałami jakie mogą być użyte do tego badania są surowica lub osocze heparynizowane. Należy pamiętać, że powszechnie stosowane antykoagulanty (EDTA, cytrynian sodowy, szczawian sodowy) chelatuja jony wapniowe!

W wielu laboratoriach ustala się tak zwane poziomy krytyczne, czyli stężenia wapnia, które mogą stanowić zagrożenie życia dla pacjenta, i które są natychmiast przekazywane właściwemu lekarzowi. Eksperci *College of American Pathologist* zalecają, aby za krytyczne uznać poziom wapnia całkowitego >13 mg/dL oraz <6 mg/dL ($>3,25$ mmol/L i $<1,5$ mmol/L).

Interpretując wynik należy wziąć pod uwagę, że zmiany stężenia białka (przede wszystkim albuminy) wpływają na zmiany stężenia wapnia całkowitego, nie zmieniając przy tym stężenia fizjologicznie istotnego wolnego jonu wapniowego (ryc. 7.5). Hipoalbuminemia jest jedną z najczęstszych przyczyn stwierdzania obniżonego poziomu wapnia we krwi (tzw. pozornej hipokalcemii).



Ryc. 7.5. Wpływ zmian stężenia białek we krwi na stężenie wapnia całkowitego.

Prostym sposobem pomagającym w ocenie kalcemii w stanach hipoalbuminemii jest wyliczenie tzw. stężenia wapnia skorygowanego (Ca-kor) (ryc. 7.6). Prawidłowy wynik wapnia skorygowanego wskazuje na pozorną hipokalcemię.

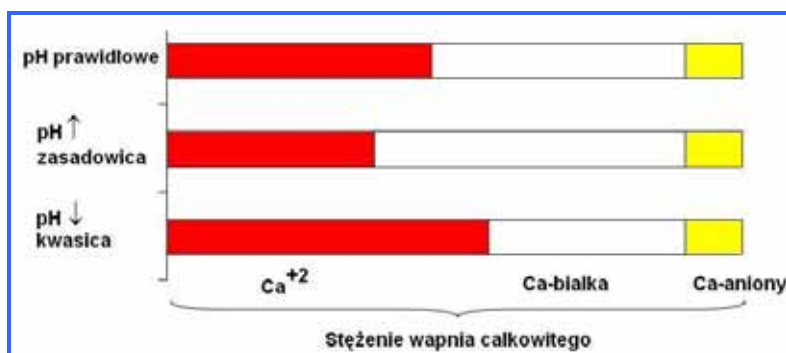
$$[\text{Ca-kor}] = [\text{Ca-całkowity}] + 0,02 \times (40 - \text{stężenie albuminy})$$

mmol/l mmol/l g/l

Ryc. 7.6. Wzór na obliczenie wapnia skorygowanego. Przy wyliczaniu należy zachować podane we wzorze jednostki

7.3.2. Wapń zjonizowany

Obecnie powszechnie dostępne stały się pomiary stężenia wolnego jonu wapniowego – tzw. wapnia zjonizowanego. Pomiary te przeprowadza się przy użyciu elektrod jonoselektywnych. Stężenie wapnia zjonizowanego jest uważane za najlepszy sposób oceny kalcemii, pod warunkiem, że w badanym materiale nie dojdzie do zmian pH. Spadek stężenia jonu wodorowego ($\text{pH}\uparrow$) lub wzrost stężenia jonu wodorowego ($\text{pH}\downarrow$) powodują odpowiednio wzrost lub spadek wiązania jonu wapniowego przez białka (ryc. 7.7). Dlatego krew do badania stężenia wapnia zjonizowanego powinna być pobierana w warunkach anaerobowych i próbki powinny być maksymalnie wypełnione krwią. Wapń zjonizowany może być oznaczany w pełnej krwi heparynizowanej, w heparynizowanym osoczu lub w surowicy. W przypadku pełnej krwi heparynizowanej badanie powinno być wykonane najlepiej w ciągu 15 - 30 minut od pobrania krwi, najpóźniej w ciągu godziny. Jeżeli nie jest to możliwe, wówczas optymalnym materiałem jest surowica (osocze).



Ryc. 7.7 Wpływ zmian pH krwi na stężenie wapnia zjonizowanego

W warunkach fizjologicznych hiperwentylacja (np. w stanach zdenerwowania) może prowadzić do szybkiego wzrostu pH krwi i gwałtownego spadku stężenia jonów wapniowych. Wzrasta wówczas pobudliwość nerwowa, co może manifestować się wystąpieniem parestezji, napadami padaczki, omdleniami.

7.3.3. PTH

Wskazaniem do oznaczenia stężenia PTH jest wykrycie nieprawidłowej kalcemii, kalciiurii lub fosfatemii. Wyniki należy interpretować zawsze w odniesieniu do współwystępującej kalcemii, która powinna zostać zmierzona (koniecznie wraz z albuminą) w tej samej próbce. Pomiary PTH wykonywane są za pomocą metod immunochemicznych. Zasadniczym problemem, związanym z oznaczaniem PTH, jest obecność we krwi C-terminalnych fragmentów PTH, powstających w wyniku

degradacji tego hormonu w wątrobie i usuwanych przez nerkę. Ich $t_{1/2}$ wynosi około 2-3 h i stanowią one od 75 do 95% immunoreaktywnego PTH we krwi. Pierwsze generacje zestawów do oznaczeń PTH zawierały przeciwciała reagujące nie tylko z 1-84 PTH, ale też z fragmentami jego degradacji. Obecnie w powszechnym użyciu są już zestawy diagnostyczne do oznaczeń PTH drugiej generacji, pozwalające na oznaczanie stężeń całych, niezdegradowanych cząsteczek PTH, tzw. „intact PTH”.

Krótki okres półtrwania jest podstawą wykonywania tzw. śródoperacyjnych pomiarów PTH podczas resekcji przytarczyc przy zastosowaniu technik o minimalnym stopniu inwazyjności. Spadek stężenia „intact PTH” we krwi obwodowej o ponad 50% w odniesieniu do wartości wyjściowej, po 10 minutach od przeprowadzenia czynności usunięcia gruczołu, potwierdza skuteczność postępowania chirurgicznego.

7.4. Hiperkalcemia

Niewielka hiperkalcemia przebiega zazwyczaj asymptomatycznie; przy stężeniach wapnia $>12-13$ mg/dL ($>3 - 3,25$ mmol/L) pojawiają się objawy kliniczne ze strony układu nerwowego, pokarmowego, wydalniczego i układu krążenia (tab.7.3). Należy jednak podkreślić, że objawy te są niespecyficzne.

Tabela 7.3 Kliniczne objawy hiperkalcemii

Układ nerwowy	uczucie ciągłego zmęczenia, depresja, splątanie, obniżona zdolność do koncentracji uwagi, senność, obniżenie siły mięśniowej
Układ pokarmowy	zaparcia, anoreksja, mdłości, wymioty
Układ wydalniczy	zwiększenie ilości oddawanego moczu (poliuria), wzmożone pragnienie (polidypsja), odwodnienie, kamica nerkowa, wapnica nerek
Układ krążenia	skrócenie odstępu QT w EKG, bradykardia lub arytmia

Przy poziomie wapnia powyżej 14 - 15 mg/dL ($3,5 - 3,75$ mmol/L) może wystąpić tzw. przełom hiperkalcemiczny. Dochodzi wtedy do silnego odwodnienia na skutek nerkopochodnej moczówki (hiperkalcemia zaburza działanie wazopresyny), pojawiają się zaburzenia świadomości (śpiączka) i zaburzenia rytmu serca (nagłe zatrzymanie krążenia). U około 20% przypadków stwierdza się ostre zapalenie trzustki.

7.4.1. *Hiperkalcemia nowotworowa*

Ocenia się, że od 50 do 70% wszystkich stwierdzanych hiperkalcemii stanowią hiperkalcemie nowotworowe. Podwyższony poziom wapnia występuje u około 20% pacjentów z chorobą nowotworową, najczęściej w raku piersi, szpikaczku mnogim, raku nerki, raku płaskonabłonkowym płuc). Około połowa hiperkalcemii nowotworowych spowodowana jest wydzielaniem przez komórki nowotworowe czynników powodujących mobilizację wapnia z kości (złośliwa hiperkalcemia humoralna). Głównie jest to tzw. białko spokrewnione z PTH (ang. *PTH-related protein*, PTH-rp), którego sekwencja aminokwasów na odcinku N-terminalnym jest homologiczna do sekwencji PTH i rozpoznawana przez receptory PTH. Rzadziej dochodzi do ekotopowego wydzielania PTH. Ponadto komórki nowotworowe mogą wydzielać $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Drugą główną przyczyną hiperkalcemii nowotworowej są przerzuty do kości. Hiperkalcemia nowotworowa może rozwijać się bardzo szybko (zagrożenie przełomem hiperkalcemicznym).

W hiperkalcemii nowotworowej wydzielanie PTH przez przytarczycę jest zahamowane; poziom PTH może być obniżony lub bliski dolnej granicy przedziału wartości prawidłowych.

7.4.2. *Pierwotna nadczynność przytarczyc (PNP)*

Pierwotna nadczynność przytarczyc (około 20% stwierdzanych hiperkalcemii) polega na nadmiernym i rozkojarzonym (nieadekwatnym do poziomu wapnia) wydzielaniu PTH przez przytarczycę. Konsekwencją tego jest hiperkalcemia, spowodowana nadmierną mobilizacją wapnia z kości. PNP jest obecnie postrzegana jako trzecia, po cukrzycy i chorobach tarczycy, najpowszechniej występująca endokrynopatia. Dotyka ona najczęściej kobiet w wieku >50 lat (u kobiet częstość ocenia się od 1/700 do 1/1000), u mężczyzn występuje około 4-ro krotnie rzadziej. Najczęstszą przyczyną PNP są gruczolaki przytarczyc (80-85% - pojedyncze, 5% - mnogie). Około 15% PNP rozwija się na skutek przerostu gruczołów przytarczycznych. Rak przytarczyc jest przyczyną ok. 0,5% przypadków PNP. Coraz częstsze włączanie pomiarów stężenia wapnia do podstawowego panelu badań laboratoryjnych spowodowało, że obecnie większość chorych z PNP ($>80\%$) w momencie diagnozy nie ma jeszcze objawów klinicznych hiperkalcemii. W badaniach laboratoryjnych obok wysokiego poziomu wapnia występuje wysoki poziom PTH, natomiast poziom fosforanów jest często bliski dolnej granicy przedziału wartości prawidłowych lub nieco obniżony. Wydalanie zarówno wapnia* jak i fosforanów z moczem jest wysokie (*ilość jonów wapniowych ulegających filtracji przeważa nad zdolnością stymulacji resorpcji zwrotnej wapnia w nerce przez PTH). Zaawansowana pierwotna nadczynność przytarczyc wywołuje podokostnową resorpcję kości (ból kostny, trudności w chodzeniu), kamicę nerkową, wapnicę nerek, chorobę wrzodową,

zaburzenia koncentracji, depresję. U około 40% chorych występuje nietolerancja glukozy.

Stosowanym obecnie sposobem leczenia PNP jest postępowanie operacyjne (paratyreoidektomia). Kryteria kwalifikacji pacjenta do zabiegu paratyreoidektomii oparte są na ocenie biochemicznej [stężenie wapnia $>11,4$ mg/dL ($2,85$ mmol/L), lub wydalanie wapnia z moczem >400 mg/dobę (10 mmol/dobę), lub filtracja kłębkowa <60 mL/min)] lub na podstawie obrazu klinicznego (wczesna kamica nerkowa lub wapnica nerek, wiek poniżej 50 lat, lub osteoporoza, zarówno przebiegająca ze złamaniami jaki i stwierdzona tylko badaniem densytometrycznym).

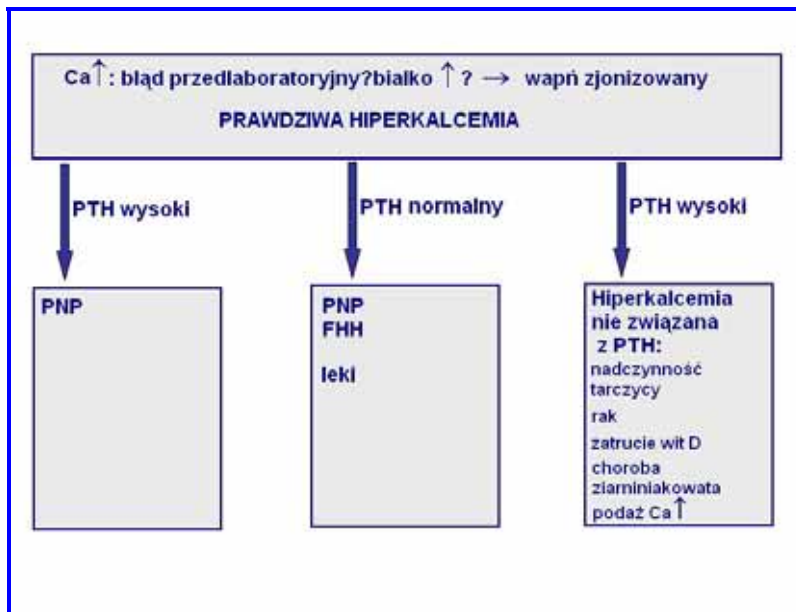
Chorzy nie leczeni operacyjnie wymagają okresowego monitorowania (co 6-12 miesięcy) obejmującego oznaczenie wapnia i PTH w surowicy oraz badanie densytometryczne kości promieniowej umożliwiające ocenę postępu choroby.

7.4.3. Diagnostyka różnicowa hiperkalcemii

W diagnostyce różnicowej należy wziąć pod uwagę jeszcze inne możliwe przyczyny hiperkalcemii (tab. 7.4, ryc. 7.8).

Tabela 7.4. Rzadziej spotykane przyczyny hiperkalcemii.

Przyczyna	Mechanizm rozwoju hiperkalcemii
Choroby ziarniniakowate (sarkoidoza, gruźlica)	wzrost syntezy $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ w ziarniniakach zwiększa wchłanianie wapnia w jelitach
Tyreotoksykoza	wzrost resorpcji kości pod wpływem wysokiego poziomu hormonów tarczycy
Zatrucie witaminą D	wzrost wchłaniania wapnia w jelitach
Nadmierna podaż wapnia	wzrost wchłaniania wapnia - niekontrolowane stosowanie preparatów wapnia (np. środków alkaliczujących)
Leczenie solami litu	wzrost wydzielania PTH
Choroba Pageta	wzmoczone uwalnianie wapnia z kości
FHH	inaktywująca mutacja receptora wapniowego



Ryc. 7.8 Jeden z możliwych schematów diagnostyki różnicowej hiperkalcemii.

PNP – pierwotna nadczynność przytarczyc

FHH – rodzinna hipokalcjyczna hiperkalcemia

7.5. Hipokalcemia

Generalnie, hipokalcemia jest rzadziej spotykana niż hiperkalcemia. Najczęstszą przyczyną niskiego poziomu wapnia całkowitego we krwi jest hipoalbuminemia (np. w marskości wątroby, zespole nerczycowym, niedożywieniu). W przypadku, kiedy stężenie wapnia zjonizowanego jest prawidłowe, hipokalcemia nie wymaga leczenia. Objawy kliniczne rzeczywistej hipokalcemii są charakterystyczne i związane ze wzrostem pobudliwości nerwowej. Należą do nich tężyczka, skurcze dłoni i stóp, drgawki, splątanie, ośpienie, halucynacje, obniżona kurczliwość mięśnia sercowego, spadek ciśnienia krwi.

U chorych poddanych zabiegom operacyjnym w celu leczenia nadczynności tarczycy lub przytarczyc może dochodzić do gwałtownej remineralizacji kości, co powoduje nagły spadek poziomu wapnia („zespół głodnych kości”) i pojawienie się klinicznych objawów hipokalcemii.

Przewlekła hipokalcemia najczęściej jest spowodowana przez zaburzenia syntezy, sekrecji lub działania PTH albo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, lub obu tych hormonów (tab. 7.5).

Tabela 7.5. Przyczyny i mechanizmy rozwoju hipokalcemii

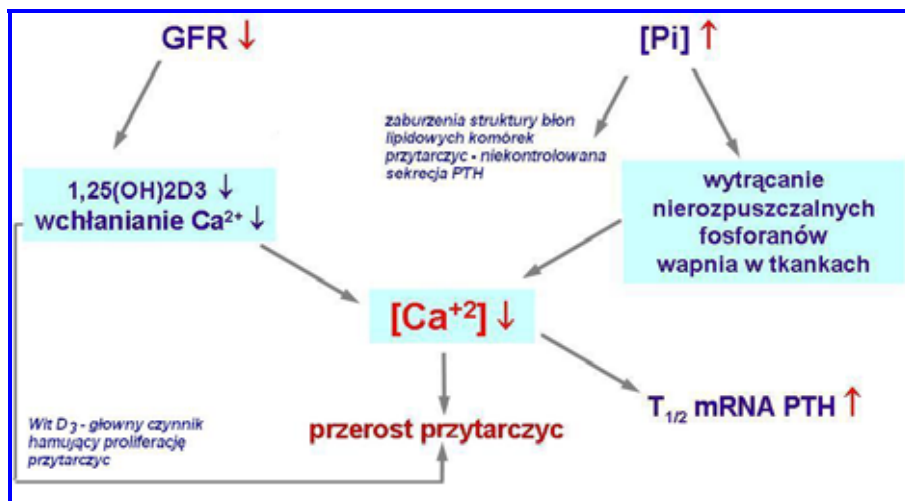
Przyczyna	Mechanizm rozwoju hipokalcemii
Niedoczynność przytarczyc (destrukcja przytarczyc)	często pooperacyjna (po tyreoidektomii, paratyreoidektomii, po operacjach z powodu nowotworów szyi i głowy), po napromienianiu, w przebiegu infekcji, w wyniku chorób autoimmunologicznych
Rzekoma niedoczynność przytarczyc	obwodowa oporność na PTH – przy podwyższonym poziomie krążącego PTH profil biochemiczny jest typowy dla niedoczynności przytarczyc – występuje hipokalcemia i hiperfosfatemia
Obniżone wchłanianie wapnia	choroby upośledzające funkcje jelita cienkiego i dwunastnicy – celiakia, choroba wrzodowa, choroba Leśniewskiego-Crohna, długotrwałe żywienie pozajelitowe, zabiegi resekcji jelit
Niedobór magnezu	upośledzona sekrecja PTH i zahamowany wpływ PTH na kości
Niedobór witaminy D ₃	obniżone wchłanianie wapnia
Leki	barbiturany hamują syntezę 25(OH)D ₃ w wątrobie
Hiperfosfatemia	wiązanie wapnia przez fosforany
Ostre zapalenie trzustki	wiązanie wapnia przez wolne kwasy tłuszczowe

W niedoczynności przytarczyc wydalanie wapnia z moczem jest zazwyczaj prawidłowe (z wyjątkiem bardzo niskich stężeń wapnia) na skutek braku regulacji resorpcji zwrotnej wapnia przez PTH w kanalikach nerkowych.

7.5.1. Wtórna nadczynność przytarczyc

Wtórna nadczynność przytarczyc rozwija się w odpowiedzi na przewlekłą hipokalcemię. Zaawansowana wtórna nadczynność przytarczyc może być powiązana z hipertrofią i hiperplazją przytarczyc. Najczęstszymi przyczynami wtórnej nadczynności przytarczyc są: przewlekła niewydolność nerek (PNN) (ryc. 7.9), niedobór witaminy D₃ (ryc. 7.4), zespoły złego wchłaniania.

W PNN poziomy PTH mogą przekraczać 1000 pg/mL. W związku z zaburzeniami wydzielania PTH u chorych z PNN rozwija się osteodystrofia nerkowa, która może być związana z podwyższonym (włóknisto-torbielowate zwłóknienie kości) lub obniżonym (adynamiczna choroba kości) obrotem kostnym. Zapobieganie osteodystrofii nerkowej wymaga utrzymywania u chorych z PNN poziomów PTH w określonych zakresach stężeń, odpowiednich do stadium niewydolności nerek (tab. 7.6).



Ryc. 7.9. Mechanizm rozwoju wtórnej nadczynności przytarczyc w PNN.

Należy podkreślić, że w przypadku oznaczeń PTH u pacjentów z PNN diagności laboratoryjni powinni zweryfikować, czy metoda oznaczania PTH stosowana w ich laboratorium spełnia zalecenia KDOQI. Należy też mieć świadomość, że przedstawione powyżej zalecenia mogą ulec zmianie.

Tabela 7.6. Docelowe zakresy stężeń „intact PTH” we krwi u chorych z PNN w zależności od etapu niewydolności nerek, zalecane przez *The National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NFK-KDOQI)

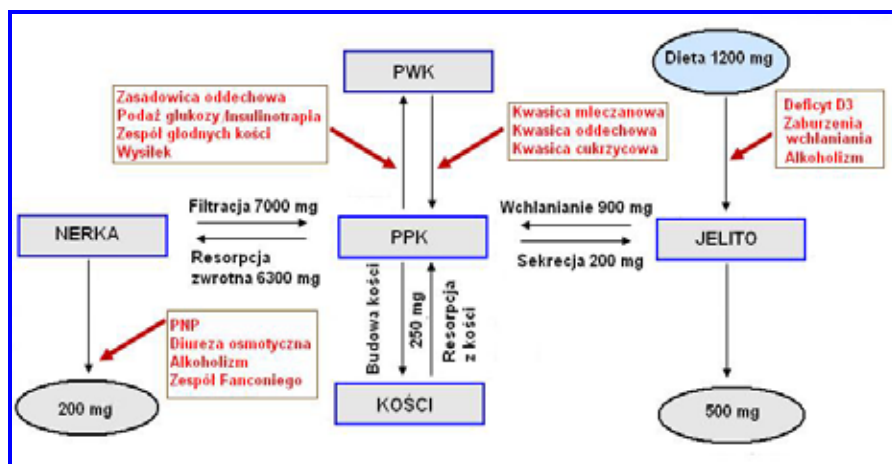
GFR (mL/min/m ²)	Docelowy „intact PTH” (pg/mL)
30–59	35–70
15–29	70–110
<15 lub dializy	150–300

7.6. Fosfor w organizmie

W ciele dorosłego człowieka znajduje się około 600 g (19,4 mola) fosforu, będącego składnikiem fosforanów organicznych i nieorganicznych. Z tego 85% zgromadzone jest w kościach, 15 % w tkankach miękkich i 1% w płynie pozakomórkowym. W komórkach fosfor jest kluczowym składnikiem m. in. związków przenoszących energię (ATP, fosfokreatyny), fosfolipidów, nukleotydów, dlatego jego niedobór upośledza wiele procesów fizjologicznych takich jak np. kurczliwość mięśni, transport przez błony, działanie układu nerwowego, przebieg reakcji enzymatycznych.

Około 70% fosforu znajdującego się we krwi wchodzi w skład związków organicznych (fosfolipidów), reszta stanowi tak zwany fosforan nieorganiczny. Składają się na niego jony H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} . Są one źródłem fosforanów dla układu kostnego i innych tkanek. W badaniach rutynowych, we krwi mierzy się właśnie poziom fosforanu nieorganicznego.

Przeciętna podaż fosforanów z dietą wynosi ok. 1200 mg/dobę (ryc.7.10). Większość fosforanów (70%) wchłania się poprzez pasywną dyfuzję, zatem w tym wypadku ilość wchłaniana rośnie wraz ze wzrostem zawartości fosforanów w diecie. Część fosforanów wchłania się też na drodze zależnej od $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. W sytuacji niedoboru fosforanów wzrasta synteza $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i zwiększa się wchłanianie fosforanów z przewodu pokarmowego. Wydalanie fosforanów z moczem stanowi główny mechanizm regulacji stężenia fosforanów we krwi. Filtracji ulegają jony fosforanowe niezwiązane z białkami (około 80% fosforanów we krwi). Około 75% przefiltrowanych fosforanów ulega resorpcji zwrotnej w kanalikach proksymalnych, 5-25% jest resorbowane w dalszych odcinkach nefronu. W stanie równowagi ilość fosforanów wydalanych z moczem jest równa ilości fosforanów wchłoniętych z przewodu pokarmowego. PTH odgrywa kluczową rolę w regulacji stężenia fosforanów we krwi, wpływając na wartość transportu maksymalnego (maksymalna ilość fosforanów, jaka może być zwrotnie wchłonięta przez kanaliki nerkowe).



Ryc. 7.10 Dobowy bilans fosforu w organizmie

Czerwonym kolorem opisano przyczyny zaburzeń homeostazy fosforanowej. PWK – płyn wewnątrzkomórkowy, PPK – płyn pozakomórkowy, PNP – nadczynność przytarczyc

7.7. Pomiary stężenia fosforanów

Metody stosowane do pomiarów stężeń fosforanu nieorganicznego we krwi oparte są na zdolności reakcji jonów fosforanowych z molibdenianem amonu i tworzenia kolorowych kompleksów fosfomolibdenianu. Antykoagulanty interferują w ten proces, dlatego, podobnie jak w przypadku pomiarów wapnia, materiałem do badań może być surowica lub heparynizowane osocze. Trzeba jednak pamiętać, że poziomy fosforanów w osoczu są niższe niż w surowicy, dlatego wyniki należy odnosić do odpowiednich zakresów wartości referencyjnych. Jednym z najczęstszych błędów przedlaboratoryjnych występujących podczas mierzenia stężenia fosforanów jest niewłaściwe/zbyt długie przechowywanie próbki. Dlatego, jeżeli badanie nie może być wykonane w ciągu kilku godzin od pobrania krwi, najwłaściwszym sposobem przechowywania materiału jest oddzielenie surowicy i umieszczenie jej w temperaturze lodówki (ewentualnie zamrożenie). Niedopuszczalne jest wykonywanie badań w próbce zhemolizowanej (z erytrocytów uwalnia się bardzo duża ilość fosforanów). Stężenie fosforanu nieorganicznego we krwi istotnie zmienia się wraz z wiekiem (tab. 7.2).

Poziom fosforanów we krwi rośnie w okresie laktacji. Kobieta traci wówczas około 1,4 mmola fosforanów na dobę – stężenie fosforanów w mleku wynosi 1,8 mmol/L.

7.8. Hipofosfatemia

Stosunkowo wydajne wchłanianie fosforanów w jelicie i ich duża zawartość w pokarmach sprawiają, że w normalnych warunkach rzadko dochodzi do niedoboru fosforanów. Może on jednak wystąpić w stanie niedożywienia lub zaburzeń wchłaniania (alkoholizm, zespoły złego wchłaniania, żywienie pozajelitowe, przewlekłe biegunki, wymioty, deficyt witaminy D₃) lub w sytuacji wzmożonej utraty fosforanów z moczem (ryc. 7.10). U pacjentów hospitalizowanych hipofosfatemia występuje dość często (ok. 2%).

Stężenie fosforanu nieorganicznego we krwi nie zawsze odzwierciedla stan zasobów fosforanów w komórkach, dlatego interpretacja wyników stężenia fosforanu wymaga uwzględnienia stanu klinicznego pacjenta.

Poważne skutki może wywołać hipofosfatemia spowodowana nagłym wzrostem wychwytu fosforanów przez komórki, w odpowiedzi na zwiększony metabolizm glukozy (ryc. 7.10). Może to nastąpić po podaniu glukozy osobie chronicznie niedożywionej, w stanie zasadowicy oddechowej (spadek stężenia jonów wodorowych aktywuje enzym fosfofruktokinazę i przyspiesza procesy fosforylacji glukozy) lub na skutek intensywnego wysiłku fizycznego (np. u maratończyków).

Do wzmożonego wydalania fosforanów z moczem dochodzi w nadczynności przytarczyc (z wyjątkiem wtórnej nadczynności przytarczyc u chorych z PNN) oraz na skutek diurezy osmotycznej u chorych na cukrzycę.

Hipofostatemia może być spowodowana zaburzeniami czynności kanalików proksymalnych, określanych jako zespół Fanconiego (glikozuria, uogólniona aminoacyduria, kwasica kanalikowa proksymalna) (ryc. 7.10). Może być to zaburzenie wrodzone lub wywołane zatruciami związkami neurotoksycznymi.

Kliniczne objawy hipofosfatemii są wypadkową czasu trwania i bezwzględ- nego deficytu fosforanu. Spadek stężenia fosforanu $<1,5$ mg/dL (0,48 mmola/L) może wywołać poważne zaburzenia funkcji wielu narządów (tab. 7.7).

Tabela 7.7 Kliniczne objawy hipofosfatemii

Układ mięśniowy	zaburzenia szlaku glikolizy, ATP ↓	osłabienie siły mięśniowej, niewydolność oddechowa, zmniejszenie pojemności minutowej serca
Układ krwionośny	2,3 difosfoglicerol ↓	wzrost powinowactwa hemoglobiny do tlenu – niedotlenienie tkanek
Układ nerwowy	ATP ↓ niedotlenienie	hiperwentylacja, drgawki, śpiączka
Układ kostny	zaburzenia mineralizacji kości	krzywica (dzieci) i osteomalacja (dorośli)

Przy spadku stężenia fosforanów <1 mg/dL ($<0,32$ mmol/L) może dojść do rabdomiolizy, a przy stężeniu fosforanów $<0,5$ mg/dL ($<0,16$ mmol/L) możliwa jest hemoliza erytrocytów.

7.9. Hiperfosfatemia

Hiperfosfatemia najczęściej jest spowodowana niewydolnością nerek (tab. 7.8). Może być też efektem przesunięcia fosforanów z wnętrza komórek do płynu pozakomórkowego (tab. 7.8, ryc. 7.10), nadmierną podażą fosforanów i innymi rzadziej występującymi przyczynami.

Objawy kliniczne hiperfosfatemii związane są z tworzeniem przez fosforany nierozpuszczalnych kompleksów z jonami wapniowymi (fosforan wapnia $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). W stanach przewlekłej hiperfosfatemii – np. u chorych z PNN, dochodzi do odkładania się soli wapnia (wapnienia ekotopowe) w skórze, naczyniach krwionośnych, spojówkach, mięśniu sercowym. Nagły wzrost stężenia fosforanów – np. u niemowląt karmionych krowim mlekiem, powoduje szybki spadek stężenia jonów wapniowych i może skutkować wystąpieniem tężyczki.

Tabela 7.8 Przyczyny i mechanizmy rozwoju hiperfosfatemii

Przyczyna	Mechanizm rozwoju hiperfosfatemii
Niewydolność nerek (ostra, przewlekła)	niezdolność nerek do wydalenia takiej ilości fosforanów, jaka jest wchłaniana w jelicie
Niedoczynność przytarczyc/ rzekoma niedoczynność przytarczyc	brak fosfaturycznego efektu działania PTH
Kwasica (mleczanowa, cukrzycowa, oddechowa)	wzrost hydrolizy fosforanów organicznych wewnątrz komórek – przesunięcie jonów fosforanowych do płynu pozakomórkowego (ryc. 7.10)
Akromegalia	zwiększenie transportu maksymalnego fosforanów przez insulino-podobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1)
Rabdomioliza, hemoliza wewnątrznaczyniowa, leczenie cytostatykami (zespół lizy guza), białaczki, chłoniaki.	uwalnianie fosforanów z rozpadających się komórek
Zatrucie witaminą D ₃	wzmoczone wchłanianie fosforanów z przewodu pokarmowego

U chorych na cukrzycę, w stanie kwasicy ketonowej przesunięcie fosforanów z komórek do płynu pozakomórkowego może maskować niedobór fosforanów. Podanie insuliny uruchamia metabolizm glukozy i zwiększa zużycie fosforanu w komórkach, przez co może dojść do poważnej hipofosfatemii.

7.10. Magnez w organizmie

Magnez, pod względem ilościowym, jest czwartym kationem w organizmie człowieka i drugim (po potasie) kationem wewnątrzkomórkowym. W ciele dorosłego człowieka znajduje się ok. 25 g (1,03 mola). 55% magnezu zgromadzone jest w kościach, 45% wewnątrz komórek i 1% w płynie pozakomórkowym. Wewnątrz komórek magnez jest kofaktorem ponad 300 enzymów, między innymi cyklazy adenylowej, kinazy kreatynowej, fosfofruktokinazy. Bierze udział w transporcie przez błony, fosforylacji oksydatywnej, biosyntezie białek, podziale komórek. Wszystkie reakcje z udziałem ATP przebiegają w obecności jonów magnezu (80% Mg w cytozolu jest związane z ATP). Magnez w płynie pozakomórkowym, poza tym, że zapewnia odpowiednią podaż magnezu dla komórek, bierze udział w przewodnictwie nerwowym. Około 55% magnezu znajdującego się w płynie pozakomórkowym występuje w postaci biologicznie aktywnych wolnych jonów magnezowych, 30% magnezu jest związane z białkami, głównie z albuminą, a około 15% występuje w postaci kompleksów z anionami nieorganicznymi.

Dobowe zapotrzebowanie na magnez u dorosłych to około 300 – 350 mg, u młodzieży i kobiet w ciąży około 400 – 700 mg. Magnez jest wchłaniany głównie w dalszych odcinkach jelita cienkiego. W warunkach niedoboru magnez u dzieci wchłanianie magnezu wzrasta, natomiast przy dużej podaży magnez wchłanianie spada, odpowiednio do 75% i 25% zawartości w pokarmach. Homeostaza magnez jest wypadkową pomiędzy wchłanianiem jelitowym i wydalaniem z moczem (filtracji ulegają wolne jony magnezowe i magnez skomplexowany). Średnio około 90–95% przesączonego magnez ulega resorpcji zwrotnej, głównie w częściach wstępujących pętli Henlego (60-70%) i w kanalikach proksymalnych (15-20%). W stanach niedoboru magnez resorpcja zwrotna magnez wzrasta. Przy nadmiarze magnez nerki mogą wydalać nawet 70% przesączonego magnez. Stosunkowo duże ilości magnez mogą być tracone z potem.

7.11. Pomiary stężenia magnez

Podstawowym badaniem laboratoryjnym w diagnozowaniu zaburzeń gospodarki magnezem jest pomiar stężenia magnez całkowitego, dokonywany głównie za pomocą różnych metod chemicznych. Dostępne są też pomiary magnez zjonizowanego, wykonywane za pomocą elektrod jonoselektywnych. Materiałem preferowanym do oznaczeń jest surowica lub ewentualnie heparynizowane osocze. Podobnie jak w przypadku pomiarów wapnia, niedopuszczalne jest stosowanie koagulantów takich jak EDTA, cytrynian sodowy czy szczawian sodowy, ponieważ wiążą one jony magnezowe. Podczas hemolizy z erytrocytów uwalniają się duże ilości magnez. Także dłuższe przechowywanie pełnej krwi może spowodować uzyskanie fałszywie wysokiego wyniku stężenia magnez.

7.12. Hipomagnezemia

Obniżony poziom magnez najczęściej ma charakter wtórny; występuje u 10 – 20% pacjentów hospitalizowanych, a na oddziałach intensywnej opieki u 50-60% chorych. Główne przyczyny hipomagnezemii to utrata magnez drogą przewodu pokarmowego lub przez nerki oraz niedostateczna podaż/wchłanianie magnez. Hipomagnezemia może być też efektem przesunięcia jonów magnezowych z płynu pozakomórkowego do komórek (tab. 7.9).

Hipomagnezemia hamuje aktywność pompy sodowo-potasowej (Na^+ , K^+ -ATPazy) w błonach komórkowych, co skutkuje wyciekaniem z komórek jonów K^+ , które są następnie tracone z moczem (hipomagnezemia upośledza resorpcję zwrotną potasu). Ponadto hipomagnezemia może doprowadzić do hipokalcemii, ponieważ brak magnez upośledza sekrecję PTH. Tak więc kliniczne objawy zaawansowanej hipomagnezemii są sumą bezpośrednich efektów braku magnez i skutków hipokaliemii i hipokalcemii. Te ostatnie mogą spowodować poważne

zaburzenia rytmu serca. Ze strony układu nerwowego hipomagnezemia objawia się nadwrażliwością nerwowo-mięśniową (tężyczka), depresją, apatią, splątaniem.

Tabela 7.9. Przyczyny hipomagnezemii.

Utrata Mg przez nerki	diureza osmotyczna (cukrzyca), wzrost objętości płynu pozakomórkowego (infuzje płynów), leczenie diuretykami pętlowymi, choroby nerek, hiperaldosteronizm, nadczynność przytarczyc, leki nefrotoksyczne
Zaburzenia wchłaniania Mg	przewlekłe biegunki, zespoły złego wchłaniania (celiakia), choroby jelit, resekcja jelita, nadużywanie środków przeczyszczających
Niedostateczna podaż Mg	alkoholizm, przewlekłe niedożywienie, żywienie pozajelitowe
Przesunięcie Mg z płynu pozakomórkowego do wnętrza komórek	zespół głodnych kości, insulinoterapia w kwasicy cukrzycowej, podaż glukozy osobie niedożywionej, ostre zapalenie trzustki, stan po zawale mięśnia sercowego

Hipomagnezemia może być uwarunkowana genetycznym zaburzeniem wchłaniania magnezu w jelicie (rodzinna pierwotna hipomagnezemia) lub genetycznym zaburzeniem reabsorpcji zwrotnej magnezu w kanalikach nerkowych (rodzinna magnezuryczna hipomagnezemia).

7.13. Hipermagnezemia

Nerki bardzo wydajnie usuwają nadmiar magnezu z organizmu, dlatego hipermagnezemia w praktyce dotyczy pacjentów z niewydolnością nerek lub rzadziej pacjentów leczonych magnezem (np. stany przedrzucawkowe). Objawy hipermagnezemii nasilają się wraz ze wzrostem poziomu magnezu (tab. 7.10).

Tabela 7.10 Objawy kliniczne hipermagnezemii

Poziom magnezu we krwi	Objawy kliniczne
>1,5 mmol/L <2 mmol/L	zazwyczaj brak
>2-3 mmol/L <3 mmol/L	zmniejszenie głębokich odruchów ścięgniastych, senność, śpiączka
>3 mmol/L <5 mmol/L	zanik odruchów ścięgniastych, bradykardia, hipotonia, wydłużenie odstępu PR i QT
>5 mmol/L	porażenie wiotkie mięśni, brak przewodnictwa elektrycznego w sercu (zgon)

8. PODSTAWY LABORATORYJNEJ DIAGNOSTYKI HEMATOLOGICZNEJ

Anna Raszeja-Specht, Agnieszka Jankowska-Kulawy

Krew jest płynną tkanką, złożoną z elementów morfotycznych i osocza. Osocze składa się głównie z wody, białek (albuminy, globulin, fibrynogenu), enzymów, hormonów, tłuszczów, elektrolitów – makro i mikroelementów (sód, potas, chlorki, magnez, wapń, żelazo i inne). W organizmie dorosłego człowieka znajduje się 3,8 – 5,4 litrów krwi, co stanowi około 8% wagi ciała, w tym 45% stanowią elementy komórkowe, a 55% osocze.

Krew pełni funkcję transportową i odpornościową, a jej komórkowe i osoczowe składniki biorą udział w krzepnięciu krwi. Ogólne badanie krwi obejmuje oznaczanie szybkości opadania krwinek czerwonych (OB) oraz objętości krwi krążącej (nomogramy, metody barwnikowe lub izotopowe). Laboratoryjna diagnostyka hematologiczna obejmuje ocenę układu czerwonekrwinkowego, białokrwinkowego i płytkotwórczego, wykorzystując różnorodne metody badawcze. Do swoistych metod w diagnostyce hematologicznej można zaliczyć badania cytologiczne, cytochemiczne, cytogenetyczne, immunologiczne oraz próby czynnościowe krwinek białych i metabolizmu żelaza.

8.1. Hematopoeza

Obecnie wiadomo, że elementem wyjściowym dla wszystkich linii komórkowych są komórki macierzyste krwiotworzenia. Główną cechą komórek macierzystych jest ich zdolność do samoodnawiania oraz różnicowania się, a kolejne podziały prowadzą do powstawania komórek coraz bardziej dojrzałych - aż do stadium komórek końcowych (np. neutrofile, bazofile, eozynofile). Komórki macierzyste krwiotwórcze różnicują się stopniowo w kierunku 11 głównych linii komórkowych, początkowo w kierunku komórek macierzystych mielopoezy i limfopoezy. W następnej kolejności z komórek mielopoetycznych powstają linie: erytropoetyczna, megakariopoetyczna (płytkotwórcza), neutrofilopoetyczna, makrofagopoetyczna, eozynofilopoetyczna, bazofilopoetyczna i linia komórek tucznych. Z komórek limfopoetycznych powstają linie limfocytów T i B oraz limfocytów NK (naturalnie cytotoksycznych). Dodatkowym elementem są komórki dendrytyczne I i II, powstające zarówno w procesie mielopoezy jak i limfopoezy. Szczegółowe omówienie procesów hematopoezy wykracza poza zakres opracowania, nie mniej jednak rycina 8.1 przedstawia współczesny schemat różnicowania komórek macierzystych układu krwiotwórczego, ułatwia zrozumienie powyższych zagadnień i znajduje zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej.

Krwiotwórcze komórki macierzyste tworzą klony komórek potomnych, które po zużyciu zastępowane są przez kolejne klony wywodzące się z aktywowa-

nych komórek macierzystych. Proces produkcji przebiega stopniowo, poprzez stadia komórek ukierunkowanych (progenitorowych) i prekursorowych, aż do postaci końcowych – komórek dojrzałych, łatwo rozpoznawanych w obrazie mikroskopowym. Różne rodzaje komórek macierzystych i ukierunkowanych morfologicznie nie różnią się od siebie i przypominają limfocyty.

Replikacja komórek macierzystych odbywa się przez całe życie i w tym czasie każda z nich odbywa kilkadziesiąt podziałów. Mechanizmy kontrolujące replikację komórek macierzystych są jak dotąd mało poznane, ale zaburzenia replikacji prowadzą do rozwoju wielu schorzeń układu krwiotwórczego. Zahamowanie replikacji może być powodem ciężkiej aplazji szpiku kostnego, zaś nadmierna niekontrolowana proliferacja klonalna może być przyczyną chorób rozrostowych jak np. ostrej białaczki szpikowej.

Badania ostatnich lat wydają się dowodzić, że hematopoeza jest procesem w całości wyzwalanym przez czynniki humoralne oraz układy komórkowe zawarte w samym szpiku kostnym – tzw. mikrośrodowisko hematopoetyczne. W skład tego środowiska wchodzi zatoki naczyniowe, makrofagi, fibroblasty i komórki tłuszczowe (adipocyty).

Do tej pory wyizolowano kilkadziesiąt związków, które uważa się za regulatory hematopoezy. Badania prowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo* dowodzą, że regulacja hematopoezy jest zjawiskiem kompleksowym, zależnym od cząsteczek adhezyjnych i cytokin, które działają na różnych szczeblach hematopoezy. Przeważnie cząsteczki adhezyjne przekazują informację o miejscu docelowym danej komórki, a cytokiny – o jej zachowaniu.

Przykładami cząstek adhezyjnych, o największym znaczeniu w układzie krwiotwórczym, są VLA-4 (ligand cząsteczki adhezyjnej VCAM-1, obecnej na komórkach podścieliska) i CD34 (obecna na komórkach krwiotwórczych i przydatna jako znacznik).

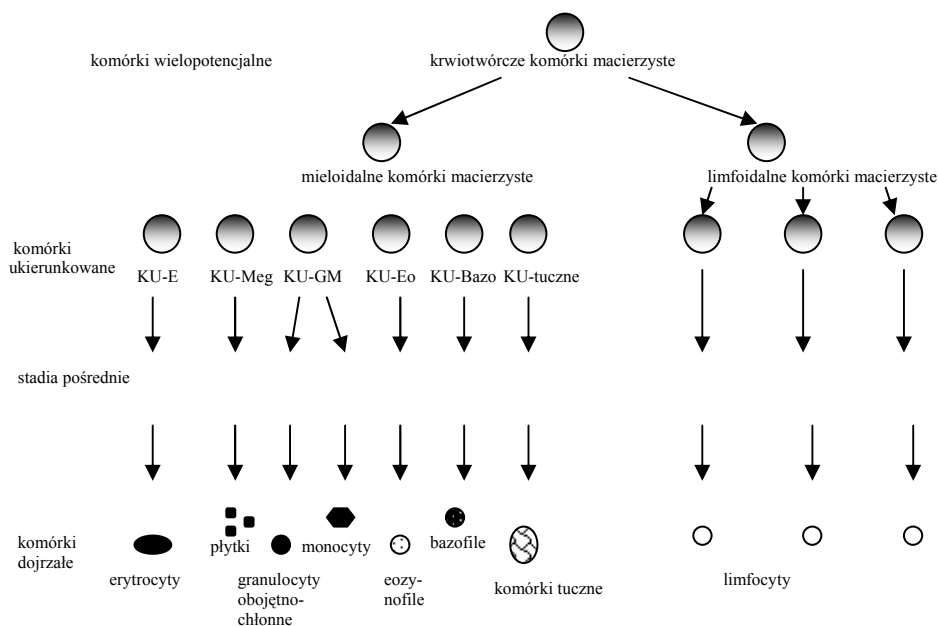
Cytokiny są dla komórek czynnikami przeżycia oraz – w wysokich stężeniach, czynnikami wzrostu. Cytokiny krwiotwórcze można podzielić na działające głównie na komórki wielopotencjalne (KIT-ligand czyli czynnik Steel, ligand FLT-3 oraz IL-3) oraz wybiórczo na poszczególne linie komórkowe (erytropoetyna, trombopoetyna, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, interleukiny IL-2, IL-4, IL-5).

Tak więc, do najważniejszych **czynników stymulujących hematopoezę**, zaliczamy:

- czynnik Steel, którego receptorem jest c-KIT (stąd inna nazwa: Ligand c-KIT),
- FLT-3 ligand – ligand receptora FLT-3 z rodziny kinaz,
- interleukinę 3 (IL-3, Multi-CSF) - działa na komórki macierzyste hematopoezy, podtrzymując ich zdolność do tworzenia kolonii komórek progenitorowych,
- interleukinę 2 (IL-2) – czynnik samoodnawiania i dojrzewania limfocytów T i NK,

- interleukinę 4 (IL-4) – czynnik odnawiania i samoodtwarzania limfocytów B,
- interleukinę 5 (IL-5) – czynnik dojrzewania eozynofików,
- granulopoetynę (G-CSF) – zasadniczy czynnik regulujący wytwarzanie granulocytów,
- granulocyarno-makrofagowy czynnik wzrostu (GM-SCF),
- M-CSF – regulujący różnicowanie makrofagów i osteoklastów,
- erytropoetynę (EPO), hormon krwiotwórczy produkowany przede wszystkim w nerkach, stymuluje proliferację komórek linii erytroblastycznej, wpływając również na proces hemoglobinizacji,
- trombopoetynę (TPO), stymulującą wzrost megakariocytów, dojrzewanie i ploidię jądra.

Na powierzchni komórek układu krwiotwórczego, wraz z ich różnicowaniem i dojrzewaniem pojawiają się i zanikają określone antygeny, a wśród nich receptory wiążące czynniki regulujące hematopoezę.



Ryc. 8.1. Ogólny schemat hematopoezy (KU-E – komórki ukierunkowane dla linii erytropoetycznej; KU-Meg - komórki ukierunkowane dla linii megakariopoetycznej; KU-GM - komórki ukierunkowane dla linii neutrofilo- i makrofagopoetycznej; KU-Eo - komórki ukierunkowane dla linii eozynofilopoetycznej; KU-Bazo - komórki ukierunkowane dla linii bazofilopoetycznej; KU-tuczne – linia komórek tucznych; NK- limfocyty naturalnie cytotoksyczne).

Obecność tych antygenów determinuje przynależność komórki do określonej linii rozwojowej. W szpiku kostnym płodu ludzkiego wyodrębniono 2 populacje komórek:

1. CD34+ HLA DR+ CD38-, która jest zdolna do różnicowania we wszystkie linie komórkowe hematopoezy;
2. CD34+ HLA DR- CD38-, utworzoną przez komórki zdolne do różnicowania we wszystkie linie komórkowe, oraz komórki macierzy zdolne do podtrzymywania różnicowania komórek prekursorowych.

8.2. Krew obwodowa

Krew obwodowa stanowi zawiesinę elementów morfotycznych (komórkowych) w osoczu. We krwi obwodowej wyróżniamy trzy główne składniki komórkowe: eryocyty, leukocyty oraz krwinki płytkowe, zawieszone w osoczu. Badanie tzw. krwi pełnej (pobranej na antykoagulant EDTA-K₂) czyli analiza jej składników morfotycznych, stanowi podstawę diagnostyki zaburzeń układu krwiotwórczego. Liczba krwinek czerwonych, białych, płytek krwi, wartość hematokrytu, stężenie hemoglobiny oraz parametry określające wielkość i zawartość hemoglobiny w krwinkach czerwonych i oraz objętość płytek, stanowią zestaw analiz określanych jako **morfologia krwi obwodowej**. Badanie to może być wprawdzie wykonywane metodami manualnymi, jednak w ostatnich latach powszechną metodą oceny morfologii krwi obwodowej jest metoda automatyczna za pomocą analizatorów hematologicznych. Współczesne liczniki (analizatory) hematologiczne wykorzystują najczęściej rozproszenie prostej wiązki światła lub metodę impedancyjną i pozwalają na ilościową i jakościową ocenę krwinek czerwonych, białych i płytek krwi. Zastosowane techniki pozwalają na równoczesne, automatyczne zbadanie kilkudziesięciu wskaźników, a zjawiska nietypowe lub patologiczne sygnalizowane są za pomocą odpowiednich oznakowań (flag). W takich przypadkach niezbędne jest wykonanie rozmazu krwi obwodowej, co pozostaje metodą referencyjną w przypadku oceny układu białokrwinkowego. Wartości prawidłowe morfologii krwi obwodowej przedstawia tabela 8.1.

8.3. Układ czerwonokrwinkowy

W warunkach fizjologicznych u dorosłych elementy układu czerwonokrwinkowego są wytwarzane wyłącznie w szpiku kostnym. Różnicowanie i dojrzewanie komórek macierzystych hematopoezy w komórki układu erytoblastycznego następuje pod wpływem erytropoetyny, wytwarzanej głównie w nerkach. Ponadto czynnikami niezbędnymi dla prawidłowej erytropoezy są m. in.: żelazo, miedź, kobalt, kwas foliowy, witamina B₁₂, B₁, B₆, C, E, aminokwasy, androge-

ny, somatotropina, tyroksyna i glikokortykoidy. Podstawowe wiadomości dotyczące żelaza, witaminy B₁₂ i kwasu foliowego zestawiono w tabeli 8.2.

Tabela 8.1. Wartości prawidłowe morfologii krwi obwodowej u osób dorosłych (wg. Dmoszyńskiej, 2008)

	Kobiety	Mężczyźni
Liczba leukocytów (WBC) G/L	4,5 - 11,0	4,5 - 11,0
Liczba erytrocytów (RBC) T/L	4,3 - 5,3	4,5 - 6,5
Hemoglobina (HGB) g/dL mmol/L	12,0 - 16,0 7,45 - 9,95	13,0 - 18,0 8,70 - 11,2
Hematokryt (HCT) %	37 - 47	42 - 52
MCV fL	80 - 100	80 - 100
MCH pg	27 - 32	27 - 32
MCHC g/dL	32,5 - 37,5	32,5 - 37,5
RDW %	11,6 - 14,0	11,6 - 14,0
Płytki krwi (PLT) G/L	130 - 400	130 - 400
Retykulocyty (RET) G/L	20 - 100	20 - 100
Receptor transferynowy (sTfR) μg/dL	0,6 - 8,5	0,6 - 8,5

Zasadniczą funkcją układu czerwonokrwinkowego (tzw. erytronu) jest przenoszenie tlenu z płuc do tkanek i odprowadzanie z nich dwutlenku węgla oraz udział w regulacji stężenia jonów wodorowych we krwi. Najczęściej spotykanym zaburzeniem w układzie czerwonokrwinkowym jest **niedokrwistość**, czyli spadek całkowitej masy krążącej hemoglobiny, znacznie rzadziej **nadkrwistość**. Oba te stany są wynikiem zaburzenia fizjologicznej równowagi pomiędzy wytwarzaniem erytrocytów, a ich utratą lub rozpadem. Szereg rozwojowy erytropoezy przedstawiony jest na rycinie 8.2.

Tabela 8.2. Właściwości podstawowych mikroelementów, odpowiedzialnych za sprawną erythropoezę

	Żelazo	Witamina B₁₂	Kwas foliowy
Dzienna podaż	10 - 15 mg	7 - 30 µg	600 - 1000 µg
Dzienne zapotrzebowanie	1- 2 mg	1-2 µg	100 - 200 µg
Pochodzenie	roślinne i zwierzęce	zwierzęce	roślinne oraz wątroba
Rezerwy	w tym: pula czynnościowa, zapasowa i transportowa 3,5 - 4,2 g (6-12 miesięcy)	2 - 3 mg (2 - 4 lata)	10 - 12 mg (3 - 4 miesiące)
Miejsce wchłaniania	dwunastnica, jelito czcze	jelito kręte	jelito czcze
Transport we krwi	transferyna	transkobalamina I i II	albumina
Zakres referencyjny	60 - 160 µg/dL (m) 40 - 145 µg/dL (k)	135 - 675 pmol/L	> 6,8 mmol/L

8.3.1. *Badanie podstawowych parametrów układu czerwonokrwinkowego*

Stan układu czerwonokrwinkowego ocenia się na podstawie badań krwi obwodowej oraz szpiku kostnego.

A. Hemoglobina (Hb)

Hemoglobina jest podstawowym białkiem erytrocytów, transportującym tlen z pęcherzyków płucnych do tkanek. Hemoglobina jest zbudowana z hemu złożonego z pierścienia protoporfiryny IX i żelaza oraz z globiny (łańcuchy α i nie- α – β , γ , lub δ). Synteza pierścienia protoporfiryny zachodzi w erytroblastach z glicyny i bursztynylo-CoA. Następnie pod wpływem syntetazy hemu wbudowane zostaje żelazo i powstaje hem, który łączy się z globiną, tworząc hemoglobinę. Te ostatnie procesy zachodzą ze słabnącą intensywnością aż do etapu retikulocyta. Najczęściej stosowanymi jednostkami dla określenia stężenia hemoglobiny są g/L lub g/dL. Wartość ta jest zależna od płci, wieku i warunków środowiskowych. Powszechnie stosowaną metodą oznaczania hemoglobiny jest metoda cyjanomethemoglobinowa. W zaburzeniach syntezy hemoglobiny (hemoglobinopatie, talasemie) wykonywana jest elektroforeza hemoglobiny lub chromatografia o dużej rozdzielczości.

Hemoglobina może być mierzona również w surowicy i w moczu, i wtedy określana jest jako „wolna hemoglobina”. Zwiększenie stężenia wolnej hemoglobiny w surowicy i pojawienie się jej w moczu stwierdza się u chorych z nasiloną hemolizą erytrocytów.

B. Erytrocyty (E)

Są dojrzałymi funkcjonalnie komórkami układu erytoblastycznego, odpowiadającymi za transport tlenu i dwutlenku węgla w organizmie. Ich liczba jest zależna od płci i wieku. Stosowane jednostki to: $10^{12}/L$ (T/L), oraz $10^6/\mu L$ (G/L). Stosowane powszechnie metody elektroniczne pozwalają na dokładne oznaczenie liczby erytrocytów.

C. Hematokryt (HCT)

Jest to frakcja objętościowa erytrocytów we krwi pełnej, zależna od ich ilości i objętości. Stosowaną jednostką jest %. Hematokryt jest zależny od płci i wieku. W nowoczesnych analizatorach hematologicznych hematokryt jest najczęściej parametrem wtórnym, wyliczanym na podstawie liczby erytrocytów oraz ich objętości.

D. Wskaźniki morfologiczne erytrocytów

- **MCV** (średnia objętość krwinki czerwonej)

Charakteryzuje średnią objętość pojedynczego erytrocyta. Jednostka to: fL. Analizatory hematologiczne dokonują pomiaru objętości pojedynczego erytrocyta, a wartość MCV jest wartością średnią objętości wszystkich zmierzonych erytrocytów. Służy do określania rodzaju niedokrwistości (różnicowanie niedokrwistości mikrocytowych, normocytowych i makrocytowych). Wartość MCV może służyć również do oceny zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej. W tym celu należy jednak posługiwać się wartością wyliczoną MCV:

$$MCV = HCT (\%) \times 10 / RBC (T/L)$$

- **MCH** (średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej)

Charakteryzuje średnią masę hemoglobiny w krwince czerwonej. Jednostka to: pg. Parametr ten może być wyliczony ze wzoru:

$$MCH = Hb (g/dL) \times 10 / RBC (T/L)$$

MCH powinien korelować z wartościami MCV i MCHC.

- **MCHC** (średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej)

Stosowana jednostka g/dL. Wyliczenie tego parametru:

$$MCHC = Hb (g/dL) \times 100 / HCT (\%)$$

- **RDW** (wskaźnik anizocytozy)

Jest miarą rozkładu objętości krwinek czerwonych w badanej próbce krwi. Jest to wartość wyliczana przez większość współczesnych analizatorów hematologicznych jako współczynnik zmienności (%):

$$RDW (\%) = OS \times 100\% / MCV$$

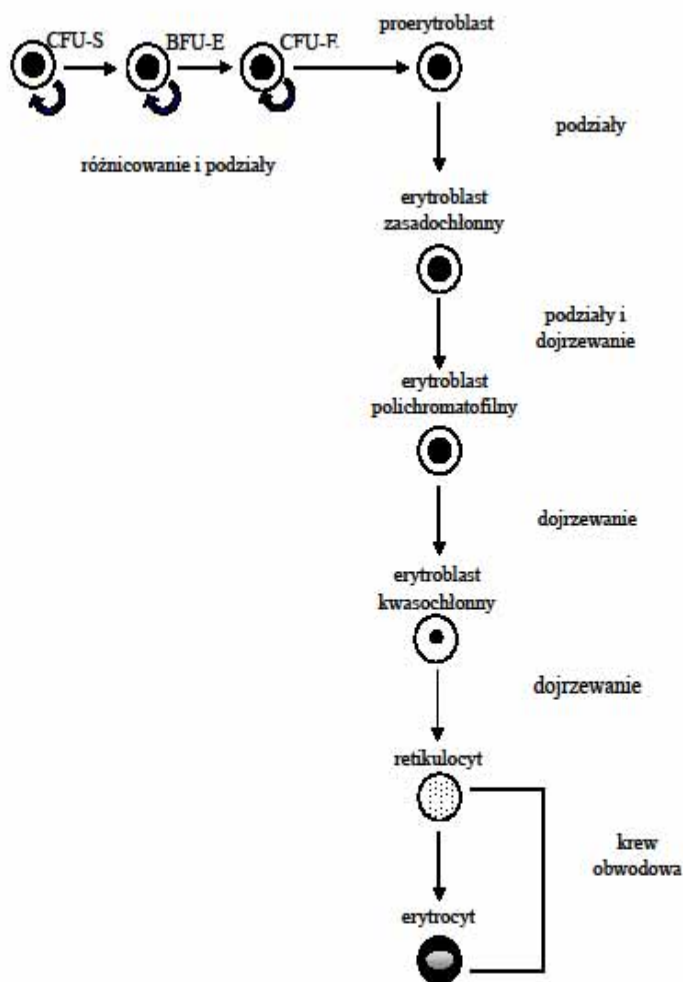
gdzie OS to odchylenie standardowe rozkładu objętości krwinek czerwonych. RDW należy oceniać łącznie z histogramem krwinek czerwonych.

Parametry: RDW, MCV, MCH i MCHC służą do różnicowania morfologicznego niedokrwistości. RDW należy oceniać łącznie z histogramem krwinek czerwonych.

W stanach patologicznych erytrocyty mogą różnić się wielkością (anizocytoza), kształtem (poikilocytoza) oraz zabarwieniem (polichromatofilia). Cechy te widoczne są w obrazie mikroskopowym prawidłowo zabarwionego rozmazu krwi obwodowej. Oglądając rozmaz w mikroskopie lub na ekranie monitora w analizatorze hematologicznym, należy zwrócić uwagę na różnice wielkości erytrocytów (normocyty, mikrocyty, makrocyty), kształtu (poikilocyty, sferocyty, krwinki tarczowate, owalocyty, krwinki sierpowate) oraz występowanie postaci nieprawidłowych (nakrapianie zasadochłonne, pierścienie Cabota, ciała Howella-Jolly'ego itp.). Dokładna analiza rozmazu ma dużą wartość diagnostyczną.

E. Retykulocyty (RET)

Są to niedojrzałe erytrocyty, stanowiące pośrednie stadium rozwojowe pomiędzy jądrzastym erytroblastem, a dojrzałą krwinką czerwoną. Mają pozostałości kwasów nukleinowych w rybosomach, a zawartość RNA zmniejsza się wraz z dojrzewaniem krwinki czerwonej. Liczba retykulocytów odzwierciedla aktywność erytropoetyczną szpiku kostnego. Najbardziej precyzyjną metodą oceny liczby retykulocytów jest metoda bezpośredniego automatycznego oznaczania przy użyciu analizatora hematologicznego. W rozmazie krwi obwodowej retykulocyty widoczne są jako komórki większe od dojrzałych erytrocytów, z błękitnym nakrapianiem (barwienie przyżyciowe wykrywające kwasy nukleinowe). Ocena wartości bezwzględnych retykulocytozy pozwala na rozróżnienie niedokrwistości regeneracyjnych od nieregeneracyjnych (z wydajną oraz z niewydajną erytropoezą). Ilość retykulocytów zazwyczaj wyrażana jest jako procent całkowitej liczby erytrocytów lub jako wartość bezwzględna (% , G/L).



Ryc. 8.2. Schemat erytropoezy

8.3.2. *Badania uzupełniające w zaburzeniach układu czerwonokrwinkowego*

W przypadku stwierdzenia zaburzeń w morfologii krwi obwodowej obowiązuje **dalsza diagnostyka różnicowa niedokrwistości**:

- ocena rozmazu krwi obwodowej – kształt i wielkość erytrocytów,
- badanie cytologiczne oraz histopatologiczne szpiku kostnego,
- ocena metabolizmu żelaza (stężenie żelaza w surowicy, całkowita zdolność wiązania żelaza - TIBC, transferyna, ferrytyna, wolne żelazo i syderoblasty w szpiku, rozpuszczalny receptor transferyny - sTfR),
- oznaczenie stężenia kwasu foliowego w erytrocycie i/lub stężenia witaminy B₁₂ w surowicy, przeciwciała przeciw komórkom okładzinowym żołądka itp.,
- badania w kierunku potwierdzenia lub wykluczenia hemolizy wewnątrznaczyniowej oraz różnicowania hemolizy wewnątrznaczyniowej i pozanaczyniowej (stężenie bilirubiny, haptoglobiny, wolnej hemoglobiny w osoczu i w moczu, oraz urobilinogenu w moczu); wykorzystywane w różnicowaniu niedokrwistości hemolitycznych.

Niedokrwistość definiowana jest jako obniżenie stężenia hemoglobiny we krwi poniżej 11 g/dL, po wykluczeniu zmian objętości osocza w wyniku hemodylucji (ciąża, przewodnienie) lub zagęszczenia krwi (odwodnienie). Omówione powyżej badania laboratoryjne pozwalają na różnicowanie niedokrwistości niedoborowych, aplastycznych i wtórnych (np. w przebiegu białaczek, chorób nerek itp.). Wykorzystanie oznaczania retikulocytów pozwala na odróżnienie niedokrwistości regeneracyjnych od nieregeneracyjnych.

Osobną grupę stanowią **badania w kierunku porfirii**: oznaczanie porfiryn w erytrocytach, w moczu dobowym i w kale.

8.4. Układ białokrwinkowy

Historycznie utrwalone i nadal używane w praktyce pojęcie układu białokrwinkowego jest nieściśle i obejmuje co najmniej dwie podstawowe populacje komórek:

układ granulocytarno - monocytarny czyli leukocyty fagocytyjące, to granulocyty obojętnochłonne (neutrocyty), kwasochłonne (eozynofile), zasadochłonne (bazofile) i monocyty. We krwi krążącej w warunkach zdrowia występują jedynie dojrzałe granulocyty, znajdujące się w dwóch przedziałach: neutrocytów marginalnych, przylegających do ścian naczyń oraz neutrocytów krążących, określanych w badaniu morfologii krwi obwodowej jako tzw. „leukocytoza”. Neutrocyty marginalne mogą przemieszczać się do puli neutrocytów krążących: po spożyciu posiłku, w stresie, po wysiłku fizycznym. To zjawisko powo-

duje wzrost leukocytozy u pacjentów nie będących na czczo. Szereg rozwojowy granulopoezy i monopoezy przedstawione są na rycinie 8.3.

układ limfocytny: limfocyty T, B, NK. We krwi obwodowej 65-80% limfocytów stanowią limfocyty T. Jest to heterogenna populacja komórek. Dominującą populacją są limfocyty T-helper (pomocnicze), które posiadają antygen powierzchniowy CD4. Komórki T-supresorowe/cytotoksyczne charakteryzują się natomiast obecnością antygenu powierzchniowego CD8.

Leukocyty produkowane są w szpiku kostnym i w tkance limfatycznej. Podstawową funkcją krwinek białych jest obrona ustroju przed mikroorganizmami.

8.4.1. Badanie ilościowe komórek układu białokrwinkowego

Badanie morfologiczne krwi metodą automatyczną zawiera wstępną ocenę krwinek białych: oznacza się ich liczbę (WBC) oraz wykonuje rozdział na 3 lub więcej frakcji (patrz niżej). Do badania pobiera się krew żylną lub włosniczkową do próbówki zawierającej antykoagulant EDTA-K₂.

Znaczenie diagnostyczne mają bezwzględne liczby poszczególnych rodzajów krwinek białych, zawartych we krwi obwodowej. Precyzyjne pomiary liczby poszczególnych rodzajów krwinek białych możliwe są jedynie dzięki metodom automatycznym, przy pomocy analizatorów hematologicznych. Połączenie cytometrii przepływowej z metodami oceniającymi fizykochemiczne i biochemiczne właściwości komórek, umożliwiło wprowadzenie precyzyjnego różnicowania krwinek białych na 3 lub 5 populacji:

- rozdział 3-częściowy jest badaniem przesiewowym. Krwinki białe są dzielone na małe (limfocyty), mononuklearne (MID, średniej wielkości) oraz duże (granulocyty). Dzięki wprowadzeniu tej metody ograniczono o 70-80% konieczność wykonywania pracochłonnego badania mikroskopowego.
- rozdział 5-częściowy wykonuje się różnymi metodami: za pomocą barwienia cytochemicznego, mierząc zmiany impedancji prądu o niskiej oraz wysokiej częstotliwości, mierząc rozproszenie lub absorpcję światła lub wiązki lasera. Wyniki badania przedstawiane są w wartościach bezwzględnych, we wzorze odsetkowym oraz w postaci graficznej.

8.4.2. Badanie morfologiczne (jakościowe) - rozmaz krwi obwodowej (wzór Schillinga), leukogram

Rozmaz krwi obwodowej oznacza mikroskopowe badanie preparatu krwi wybarwionego metodą panoptyczną (MGG, Romanowsky'ego, Wrighta). Ocena rozmazu powinna zawierać opis morfologiczny erytrocytów, płytek krwi i skład odsetkowy krwinek białych (leukogram) – patrz poniżej, tabele 8.3 – 8.7.

Metoda automatyczna pozwala na różnicowanie krwinek białych również przy bardzo niskich wartościach leukocytozy.

8.4.3. *Określenia stosowane przy ocenie zaburzeń układu białokrwinkowego*

Poniżej przedstawione są przykłady najczęściej opisywanych patologii, spotykanych przy ocenie układu białokrwinkowego, zarówno ilościowe jak i jakościowe.

Używane określenia:

leukocytoza – wzrost leukocytów powyżej normy (powyżej $11 \times G/L$),

leukopenia – spadek liczby leukocytów poniżej $4 \times G/L$,

neutropenia – spadek liczby neutrocytów poniżej $1,5 \times G/L$,

neutrofilia – wzrost liczby leukocytów powyżej $7.5 \times G/L$,

agranulocytoza – ciężka postać granulocytopenii, spadek liczby granulocytów poniżej $0,5 \times G/L$.

Odczynowe przesunięcie obrazu odsetkowego w lewo (tzw. odczyn białaczkowy): widoczne są młodsze postacie szeregu granulocytarnego: promielocyty, mielocyty, metamielocyty, oraz zwiększona liczba postaci pałeczkowatych.

- ostre choroby zakaźne i przewlekłe zakażenia (obecność ziarnistości toksycznych w cytoplazmie neutrofilii),
- kwasica, stany śpiączkowe, oparzenia, alergia,
- wysiłek fizyczny

Patologiczne przesunięcie obrazu odsetkowego w lewo: widoczne są młodsze postacie szeregu granulocytarnego: mieloblasty, promielocyty, mielocyty, metamielocyty:

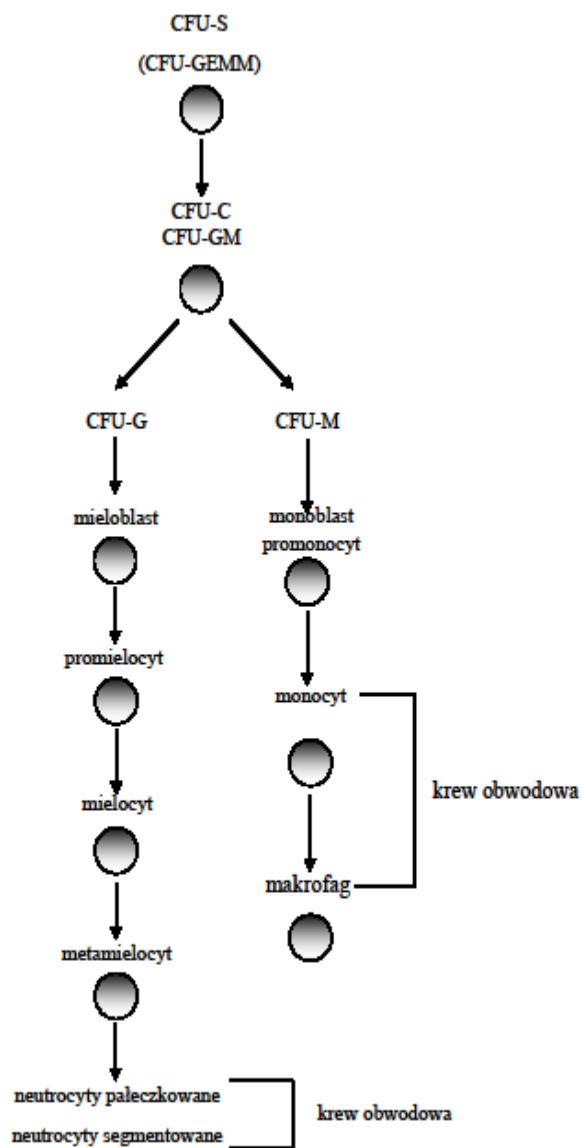
- przewlekła białaczka szpikowa,
- erytroleukemia,
- osteomielifibroza,
- przerzuty nowotworowe do kości.

Przerwa białaczkowa (*hiatus leucaemicus*): we krwi obwodowej widoczne są komórki blastyczne oraz dojrzałe granulocyty, nie występują formy pośrednie:

- ostre choroby rozrostowe układu krwiotwórczego

Przesunięcie obrazu odsetkowego w prawo: obecne są granulocyty hipersegmentowane (powyżej 5 płatów):

- niedokrwistość megaloblastyczna,
- choroby nerek i wątroby,
- głębokie niedożywienie,
- po przetoczeniach krwi.



Ryc. 8.3. Schemat granulopoezy i monopoezy

Tabela 8.3. Przyczyny ilościowych zaburzeń neutrocytów

NEUTROFILIA	NEUTROPENIA
> 7.5 x G/L	<1.5 x G/L
neutrocyty pałeczkowane 1-5%, neutrocyty segmentowane 40-70%	
infekcje bakteryjne ostre i przewlekłe, grzybicze, pierwotniakowe, pasożytnicze, wirusowe (półpasiec) urazy tkanek zawały tkanek choroby nowotworowe stan po splenektomii, leki: steroidy, sole litu przewlekłe zespoły mieloproliferacyjne zaburzenia metaboliczne i endokrynologiczne (mocznicza, kwasica cukrzycowa) III trymestr ciąży	wrodzone choroby komórki pnia nabyte choroby komórki pnia toksyczne związki chemiczne leki cytostatyczne zwiększone niszczenie (infekcje) procesy autoimmunologiczne (reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń trzewny)

Tabela 8.4. Przyczyny ilościowych zaburzeń monocytów

MONOCYTOZA	MONOCYTOPENIA
> 1.0 x G/L	<0.1 x G/L
monocyty 3-8%	
zakażenia bakteryjne, grzybicze, pasożytnicze, wirusowe gruźlica, kiła, podostre zapalenie wsierdzia regeneracja leukocytozy po neutropenii choroby nowotworowe przewlekłe zespoły mieloproliferacyjne choroby autoimmunizacyjne, kolagenozy	glukokortykoidy infekcje powodujące neutropenię aplazja szpiku endotoksemia

Tabela 8.5. Przyczyny ilościowych zaburzeń eozynocytów

EOZYNOFILIA	EOZYNOPENIA
> 0.5 x G/L	< 0,1 x G/L
eozynofile 1-5%	
choroby o etiologii alergicznej (astma oskrzelowa, katar sienny) infekcje pasożytnicze choroby skóry (łuszczyca, egzema) płonica choroby nowotworowe (ziarnica złośliwa) przewlekłe zespoły mieloproliferacyjne choroby jelit choroby tkanki łącznej (RZS)	ACTH glukokortykoidy ostre infekcje bakteryjne

Tabela 8.6. Przyczyny ilościowych zaburzeń bazocytów

BAZOFILIA	BAZOPENIA
> 0.2 x G/L	< 0.05 x G/L
bazofile 0-1%	
odczyny nadwrażliwości – leki, pokarmy, obce białko zespoły mieloproliferacyjne (przewlekła białaczka szpikowa) zapalenia i zakażenia: RZS, wrzodziejące zapalenie jelit niedoczynność tarczycy choroby nowotworowe	ostre infekcje stres nadczynność tarczycy

Tabela 8.7. Przyczyny ilościowych zaburzeń limfocytów

LIMFOCYTOZA	LIMFOPENIA
> 4.5 x G/L	< 1.0 x G/L
limfocyty 20-45%	
zakażenia wirusowe (odra, różyczka, świnka, oспа wietrzna, grypa, mononukleozą zakaźną, CMV i HIV) przewlekłe zespoły limfoproliferacyjne niektóre zakażenia bakteryjne, głównie u dzieci	wrodzone i nabyte zespoły zaburzeń odporności po napromienianiu, cytostatykach, steroidoterapii wstrząs, zespół Cushinga sarkoidoza, kolagenozy

W praktyce klinicznej pojęcia monocytopenii, eozynopenii i bazopenii nie mają większego zastosowania, ze względu na fizjologicznie niskie poziomy tych krwinek we krwi obwodowej oraz techniczne ograniczenia metod ich pomiaru.

8.4.4. Specjalistyczna diagnostyka zaburzeń układu białokrwinkowego

W przypadku stwierdzenia zaburzeń w morfologii krwi obwodowej dotyczących układu białokrwinkowego, obowiązuje dalsza diagnostyka różnicowa:

- ocena rozmazu krwi obwodowej (badania cytomorfologiczne),
- badanie cytologiczne oraz histopatologiczne szpiku kostnego,
- badania cytochemiczne i cytoenzymatyczne,
- immunofenotypizacja,
- badania cytogenetyczne i molekularne.

Badania cytochemiczne polegają na wywołaniu reakcji barwnej w rozmazach komórek krwi obwodowej i szpiku, w wyniku której uwidocznione zostają

substancje obecne w komórkach lub aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych.

Diagnostyka chorób nowotworowych układu krwiotwórczego obejmuje również ocenę antygenów powierzchniowych i cytoplazmatycznych komórek białczkowych (CD) przy użyciu przeciwciał monoklonalnych. Antygeny te są glikoproteinami, specyficznymi dla poszczególnych komórek na określonym poziomie dojrzałości, i dzięki temu pozwalają na różnicowanie typów i podtypów białaczek.

Immunofenotypizacja może być prowadzona metodą immunofluorescencji lub cytometrii przepływowej, a także metodami immunoenzymatycznymi. Aktualna klasyfikacja białaczek i chłoniaków oparta jest na immunologicznym znakowaniu antygenów w nowotworowych komórkach hematopoetycznych. Przykładowo, w przypadku podejrzenia ostrej białaczki wykonywane są badania w kierunku obecności układu mieloidalnego (CD13, CD33, CD65, CD117, anty MPO), oraz w kierunku linii limfocytów B (CD19, CD22, CD79a) i limfocytów T (CD2, CD3) oraz komórek niedojrzałych (CD34). Panel podstawowy może zostać uzupełniony odpowiednimi badaniami dodatkowymi (antygeny świadczące o dojrzewaniu i różnicowaniu w kierunku monocytów, megakariocytów lub erytroblastów lub markery różnicowania komórek T i B).

Zmiany genetyczne, stanowiące podłoże nowotworów układu krwiotwórczego, analizowane są rutynowo za pomocą metod cytogenetycznych i molekularnych, takich jak cytogenetyka klasyczna, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), łańcuchowe reakcje polimerazy z użyciem odwrotnej transkryptazy (RT-PCR, RQ-PCR), oraz mikromacierze DNA lub RNA. Opisy w/w metod znajdują się w rozdziale 13. Badania te pozwalają na ustalenie rozpoznania, ocenę rokowania, wybór metody leczenia z uwzględnieniem jego skuteczności oraz na monitorowanie choroby resztkowej.

9. DIAGNOSTYKA ZABURZEŃ KRZEPNIĘCIA

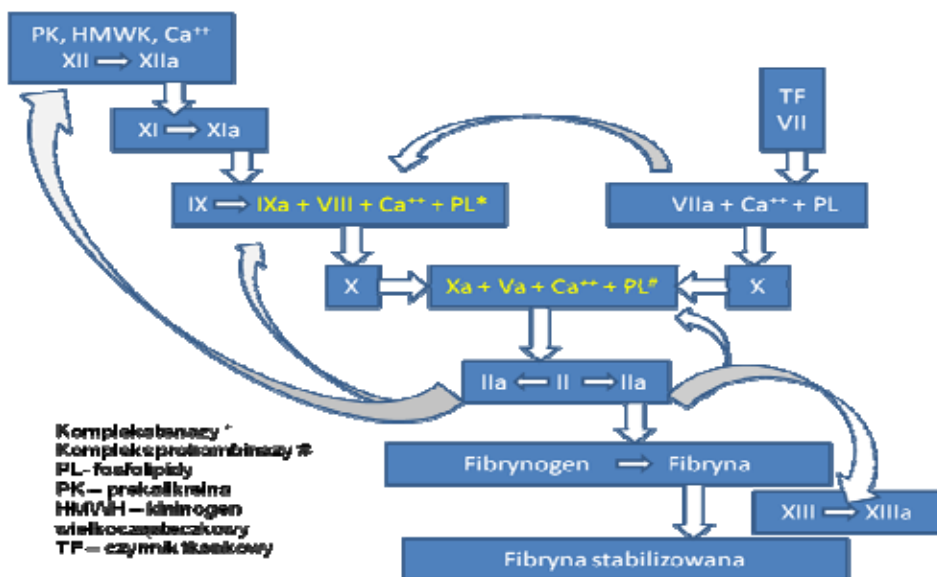
Anna Raszeja- Specht

Hemostaza jest to zespół mechanizmów obronnych organizmu, pozwalający na utrzymanie płynności krwi krążącej i chroniący przed utratą krwi w wyniku przerywania ciągłości naczyń krwionośnych. Dodatkowo układ hemostazy uczestniczy w regulacji funkcjonowania łożyska naczyniowego oraz mechanizmów odpornościowych ustroju. Prawidłowa hemostaza jest wynikiem równowagi między czynnikami aktywującymi i hamującymi procesy krzepnięcia, co wymaga współdziałania naczyń krwionośnych i przyległych tkanek, płytek krwi, białek układu krzepnięcia i układu fibrynolitycznego, inhibitorów i aktywatorów obu układów – przede wszystkim białek układu antykoagulacyjnego, a także układu fagocytarnego, monocytów i granulocytów obojętnochłonnych. W celu prawidłowego zrozumienia tak złożonych procesów od lat wprowadzane są różne modele, z których najpopularniejsze są: model strukturalny (omawiający poszczególne składniki hemostazy), model funkcjonalny (etapowanie procesów) oraz model równowagi dynamicznej (krzepnięcie kontra antykoagulacja).

Zgodnie z teorią funkcjonalną, hemostaza jest procesem trójfazowym, złożonym z:

- **hemostazy pierwotnej**, angażującej naczynia i płytki, trwającej 3-5 minut i zakończonej wytworzeniem czopu płytkowego w miejscu uszkodzenia naczynia,
- **procesów krzepnięcia**, aktywowanych głównie przez czynnik tkankowy (TF) w układzie zewnątrzpochodnym oraz na powierzchni fosfolipidów płytkowych (układ wewnątrzpochodny), wykorzystującego czynniki osoczowe i czynnik płytkowy 3 (PF3), trwającego 5-10 minut i zakończonego wytworzeniem fibryny wzmacniającej czop płytkowy (skrzep ostateczny),
- **fibrynolizy**, trwającej 48-72 godzin i powodującej rozpuszczenie skrzepu.

Istotą procesu krzepnięcia jest więc przekształcenie rozpuszczalnego białka – fibrynogenu - w początkowo rozpuszczalną i niestabilną, a następnie w nierozpuszczalną sieć fibryny. W warunkach fizjologicznych *in vivo* procesy hemostazy pierwotnej, krzepnięcia i fibrynolizy są ze sobą nierozzerwalnie połączone, a głównym aktywatorem krzepnięcia w ustroju jest czynnik tkankowy (TF), pochodzący z uszkodzonych tkanek lub związany z monocytami (ryc. 9.1).



Ryc. 9.1 Schemat kaskady krzepnięcia

Klasyczny model kaskadowej aktywacji czynników krzepnięcia, obowiązujący od 50-ciu lat, uległ obecnie pewnym modyfikacjom. Podstawą zmian teorii kaskadowej stało się odkrycie, że w warunkach *in vivo* kompleks czynnika VIIa i czynnika tkankowego aktywuje zarówno czynnik X jak i IX oraz, że część czynników regulujących hemostazę związana jest z powierzchniami komórek. Każdy z etapów procesu krzepnięcia regulowany jest dodatkowo obecnością inhibitorów, w tym specyficznego inhibitora hamującego kompleks VIIa/TF/Xa (określanego jako TFPI), białek układu antykoagulacyjnego białka C oraz antytrombiny.

Aktualny model kaskady krzepnięcia uwzględnia więc rolę powierzchni fosfolipidowej jako struktury wspomagającej tworzenie kompleksów aktywacyjnych, oraz wprowadzając pojęcia fazy: inicjacji, wzmocnienia i efektorowej, ogranicza rolę układu wewnątrzpochodnego do fazy wzmocnienia, pozostawiając inicjację po stronie układu zewnątrzpochodnego. Model ten stanowi proste zaplecze teoretyczne dla laboratoryjnej diagnostyki układu hemostazy. Należy jednak pamiętać, że aktywacja procesów krzepnięcia zależy od oddziaływań komórkowo-osoczowych, co w wielu sytuacjach pozwala na wyjaśnienie przyczyn braku zmian w powszechnie stosowanych badaniach laboratoryjnych u pacjenta z objawami skazy krwotocznej lub zakrzepicy.

9.1. Badania laboratoryjne zaburzeń krzepnięcia

Diagnostyka zaburzeń układu krzepnięcia obejmuje diagnostykę wrodzonych i nabytych skaz krwotocznych oraz zaburzeń zakrzepowo- zatorowych. Schematy postępowania w diagnostyce laboratoryjnej wykorzystują w pierwszej kolejności wyniki badań podstawowych i w zależności od obserwowanych zmian sugerują dalsze postępowanie diagnostyczne. Pozwala to na optymalizację postępowania diagnostycznego i minimalizację kosztów wykonywanych badań.

9.1.1. Zasady pobierania krwi do badań układu krzepnięcia

Do badań koagulologicznych należy pobierać krew żylną, najlepiej bez stazy i po 15- minutowym odpoczynku. Nieprawidłowe wyniki badań bardzo często nie są spowodowane błędami analitycznymi, ale wynikają z zaniedbań przedanalitycznych - sposobu pobrania krwi, uzyskania osocza i jego przechowywania.

W wyznaczynionej krwi bardzo szybko dochodzi do zmian składników układu krzepnięcia i hemostazy. Niektóre z nich, takie jak aktywacja płytek i uwalnianie czynników płytkowych rozpoczynają się niemal natychmiast po wyznaczynieniu krwi. Niektóre ze składowych układu krzepnięcia ulegają aktywacji, podczas gdy inne ulegają stopniowej dezaktywacji. Jeżeli zachodzi jakiegokolwiek podejrzenie co do jakości pobrania lub przechowywania materiału, próbkę należy pobrać ponownie. Należy zwrócić uwagę na próbki pobrane z linii naczyniowej (stałe wklucie żyłne), ze względu na częste występowanie mikroskrzepów, a także możliwe zanieczyszczenie heparyną (którą są przemylwane), lub innymi lekami podawanymi do linii naczyniowych.

Materiałem stosowanym do badań koagulologicznych jest osocze. Dla uzyskania wiarygodnego wyniku istotny jest stosunek objętości krwi do objętości roztworu antykoagulantu, który powinien wynosić 9:1. Cytrynian trójsodowy, stosowany w stężeniu 3,8% lub 3,2%, kompleksuje jony wapnia, posiada specyficzne właściwości stabilizujące labilne czynniki krzepnięcia (czynnik V i czynnik VIII), a osocze cytrynianowe jest bardziej czułe na efekty działania heparyny. Można stosować mieszaninę antykoagulacyjną, zawierającą cytrynian, teofilinę, adenozyne i dipirydamol (CTAD), która stabilizuje płytki krwi i zalecana jest przede wszystkim w specjalistycznych badaniach układu krzepnięcia (do oceny aktywacji płytek i układu fibrynolizy). Badania układu krzepnięcia powinny być wykonane natychmiast po odwirowaniu próbki. Jeśli jest to niemożliwe, osocze może być przechowywane w temperaturze 4°C do dwóch godzin, lub zamrożone do temperatury poniżej -20°C przez okres kilku tygodni.

9.1.2. Metody pomiarowe stosowane w badaniach układu krzepnięcia

Sprawność układu krzepnięcia może być badana metodami:

- ogólnymi - czynnościowymi (ocena naczyń i płytek),

- ogólnymi – koagulometrycznymi (ocena wykrzepiania),
- immunologicznymi (z użyciem specyficznych przeciwciał),
- biochemicznymi chromogennymi,
- diagnostyki molekularnej.

Osobną grupę stanowią szczegółowe badania struktury i funkcji płytek krwi, w oparciu m. in. o metody cytometrii przepływowej i mikroskopii elektronowej.

Kaskada krzepnięcia złożona jest z szeregu reakcji enzymatycznych katalizowanych przez proteazy serynowe, których aktywności można mierzyć przy pomocy metod stosowanych w chemii klinicznej. Wprowadzenie substratów chromogennych do diagnostyki koagulologicznej dało nowe możliwości wykrywania i oceny aktywności poszczególnych białek krzepnięcia, nie wykrywanych metodami czynnościowymi. Wśród nich znalazły się m. in. plazminogen i alfa₂antyplazmina, naturalne inhibitory krzepnięcia (antytrombina, białko C) oraz pojedyncze czynniki krzepnięcia.

9.2. Podstawy diagnostyki skłonności do krwawień

Na podstawie dokładnie zebranego wywiadu oraz badania przedmiotowego, u ponad połowy pacjentów można wstępnie zdecydować, czy skaza krwotoczna wynika z zaburzeń naczyniowo-płytkowych czy osoczowych. Defekty płytkowo-naczyniowe charakteryzują krwawienia powierzchowne, krwawienia z dziąseł i nosa, a zaburzenia osoczowe – rozległe, opóźnione i przedłużone krwawienia domięśniowe i donarządowe (np. artropatie w hemofiliach). Diagnostyka laboratoryjna w przypadku pacjenta ze skłonnością do krwawień ma na celu zróznicowanie zaburzeń naczyniowych, płytkowych i osoczowych przy użyciu prostych badań przesiewowych, a w przypadkach wątpliwych pozwala na dobór odpowiednich badań uzupełniających (ryc. 9.2).

9.2.1. Czas krwawienia

Czas krwawienia – klasyczne badanie zaburzeń hemostazy, obecnie wykonywane jest coraz rzadziej i zastępowane przesiewowymi badaniami czynności płytek. Należy jednak pamiętać, że jest to czas upływający od momentu wystandaryzowanego zranienia skóry do chwili ustania wypływu krwi i dzięki temu pozwala na ocenę pierwotnej hemostazy *in vivo*. Czas krwawienia jest miarą czynności krwinek płytkowych (ilości krwinek płytkowych i ich funkcji adhezyjno-agregacyjnych z udziałem czynnika von Willebranda) oraz naczyń włosowatych, nie zależy natomiast od procesów krzepnięcia krwi. Badanie to jest testem przesiewowym dla wrodzonych i nabytych zaburzeń czynnościowych płytek krwi. Pomocne jest również w diagnostyce choroby von Willebranda.

Wartości prawidłowe: czas krwawienia nie powinien przekraczać 7 minut (420 s).



Ryc. 9.2 Schemat badania pacjenta z cechami skazy krwotocznej

Czas krwawienia jest przedłużony w stanach pierwotnych i wtórnych małopłytkowości ($< 25 \text{ G/L}$), w przebiegu białaczek, mocznicy, marskości wątroby i niektórych chorób zakaźnych; w chorobie von Willebranda oraz w skazach naczyniowych przebiegających z upośledzeniem obkurczania naczyń przedwłosowatych, a także w przebiegu stosowania leków zaburzających czynność płytek. Skrócony czas krwawienia jest najczęściej następstwem błędu technicznego w wykonywaniu badania. Często stosowana metoda Duke'a do oznaczania czasu krwawienia jest obarczona błędem wynikającym ze sposobu nakłuwania skóry opuszki palca lub płatka ucha. W celu uniknięcia błędów w wykonaniu czasu krwawienia zalecana jest metoda Ivy w modyfikacji Mielkego (Hematom, nożyki Simplate I i II), w której wystandaryzowano sposób nakłucia skóry.

9.2.2. *Badanie funkcji naczyń*

W przypadku skaz naczyniowych wyniki badań laboratoryjnych z reguły nie odbiegają od normy. W badaniach funkcji naczyń stosowana jest próba opaskowa Rumpla i Leedego, która służy do oceny kruchości i przepuszczalności naczyń włosowatych. Test ten jest stosunkowo mało specyficzny i obecnie rzadko stosowany, niemniej pomocny w przypadku diagnostyki uogólnionych skaz naczyniowych.

9.2.3. Badania ilościowe i czynnościowe płytek

Obejmują pomiar liczby płytek we krwi obwodowej oraz ocenę zdolności płytek do adhezji, agregacji, bezpośrednią i pośrednią ocenę reakcji uwalniania płytkowego, oznaczanie czynnika von Willebranda oraz badania glikoprotein płytkowych metodą cytometrii przepływowej. W diagnostyce pomocna jest mikroskopowa ocena rozmazu krwi obwodowej, która pomaga w ocenie wielkości, anizocytozy i obecności agregatów płytkowych. Zestawienie wyników badań podstawowych i uzupełniających pozwala na rozpoznanie skaz płytkowych i różnicowanie skaz naczyniowo-płytkowych od skaz osoczowych oraz wykluczenie tzw. małopłytkowości rzekomej, spowodowanej aktywacją przeciwciał typu zimnego w środowisku wersenianowym. Najczęstsze przyczyny małopłytkowości i nadpłytkowości zestawiono w tabeli 9.1.

Tabela 9.1. Najczęstsze przyczyny małopłytkowości i nadpłytkowości

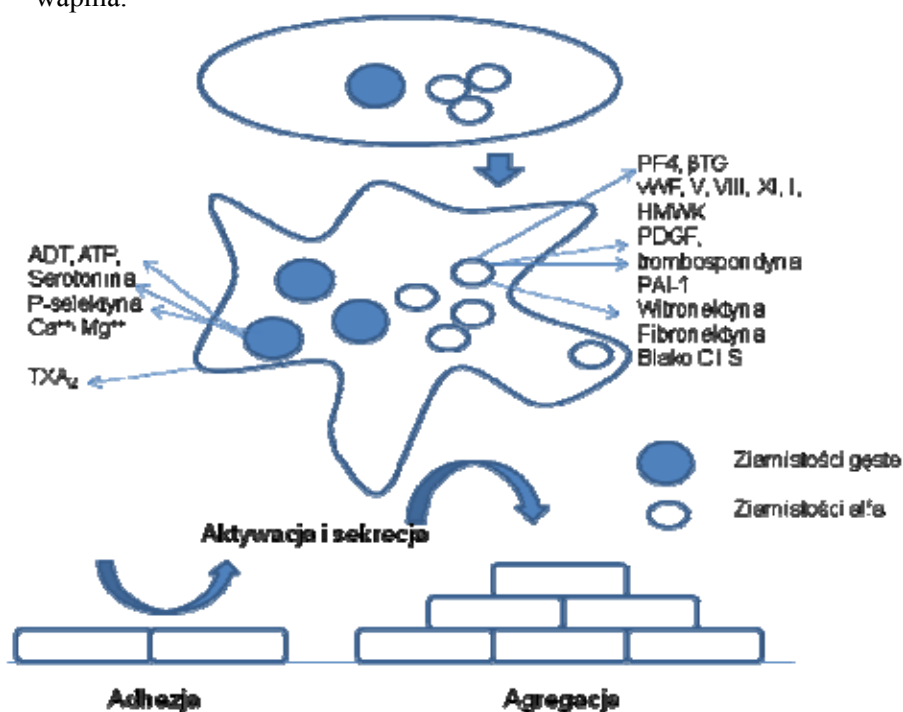
Małopłytkowość < 150 x G/L	Nadpłytkowość > 400 x G/L
Centralne - zmniejszone wytwarzanie: • niedokrwistość megaloblastyczna i aplastyczna • popromienne, polekowe (cytostatyki) • zespoły mielodysplastyczne • infekcje wirusowe	Pierwotne: • samoistna • zespoły mieloproliferacyjne
Obwodowe - nadmierne niszczenie: • procesy immunologiczne (polekowe – w tym HIT, poprzetoczeniowe, choroby autoimmunologiczne), szpiczak, chłoniaki, ciąża, po przeszczepie szpiku • zaburzenia nieimmunologiczne (DIC, posocznice, zespół hemolityczno-mocznicowy, hipersplenizm, krwotoki, masywne przetoczenia, zabiegi w krążeniu pozaustrojowym)	Wtórne: • ostre i przewlekłe stany zapalne • choroby nowotworowe • polekowe, pokrwotoczne, powysiłkowe • po splenektomii • w przebiegu niedokrwistości hemolitycznej i z niedoboru żelaza
Zmniejszone wytwarzanie i nadmierne niszczenie: • alkoholowa marskość wątroby	

Badania laboratoryjne funkcji płytek uwzględniają procesy przebiegające w warunkach *in vivo*, a więc pobudzenie płytek wskutek uszkodzenia ściany naczynia, ich zdolność do adhezji i agregacji oraz do uwalniania czynników zawartych w ziarnistościach płytkowych (ryc.9.3).

Badania funkcji płytek obejmują:

- ocenę zdolności płytek do adhezji,

- automatyczną ocenę adhezji i agregacji płytek przy pomocy prostych analizatorów funkcji płytek – PFA-100 (tzw. czas okluzji), Impact-R, FerifyNowR i inne,
- ocenę zdolności płytek do agregacji samoistnej lub po stymulacji agonistami – ADP, kolagenem, epinefryną, rylostetyną, kwasem arachidonowym,
- badania degranulacji płytek - ocenę ziarnistości płytkowych i reakcji uwalniania (oznaczanie czynnika płytkowego 4, β -tromboglobuliny, serotoniny, P-selektyny),
- ocenę przemian prostaglandyn (oznaczanie tromboksanu TXB_2 i jego metabolitów),
- ocenę prokoagulacyjnej aktywności płytkowej (czas zużycia protrombiny, ocena rozpraszania światła przez mikrocząstki),
- cytometryczną ocenę aktywności i reaktywności błonowych glikoprotein płytkowych z użyciem cytometru przepływowego, specyficznych przeciwciał monoklonalnych i odpowiednich agonistów płytkowych,
- badania fosforylacji enzymów płytkowych oraz zmian stężenia płytkowego wapnia.



Ryc. 9.3. Udział płytek w procesach adhezji i agregacji

Metody oceny funkcji płytek stosowane są w celu diagnostyki zaburzeń wrodzonych, potwierdzenia zaburzeń nabytych oraz w monitorowaniu leczenia

przeciwwagregacyjnego i podczas stosowania leków przeciwzapalnych i przeciwreumatycznych.

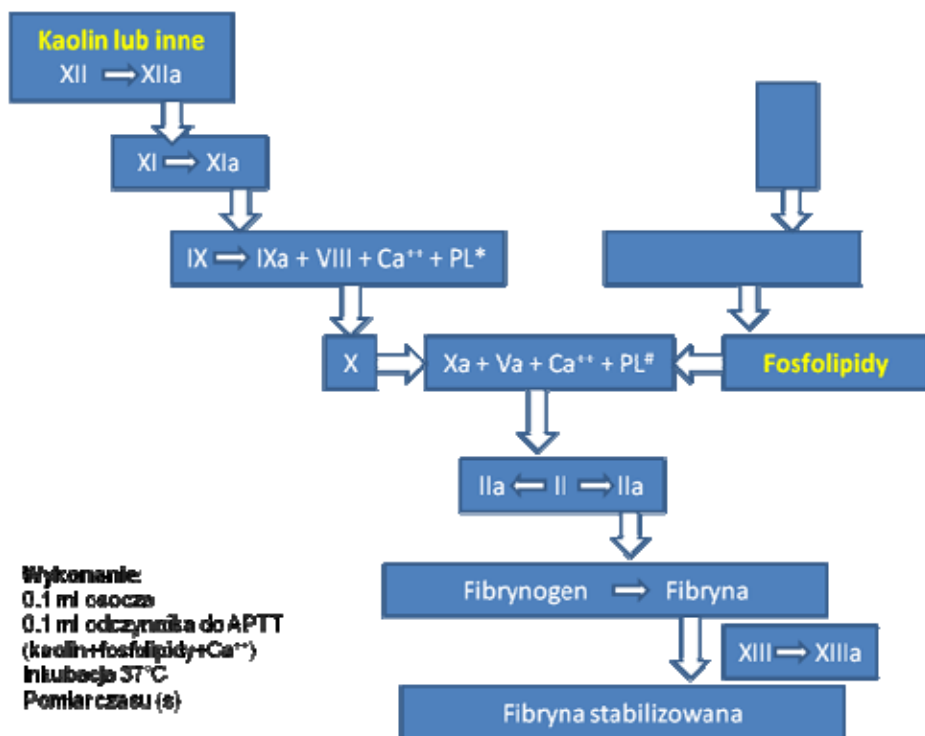
9.2.4. *Badania oceniające wewnątrzpochodną, zewnątrzpochodną i wspólną drogę kaskady krzepnięcia*

Stosowane przez kilkadziesiąt lat badania oceniające proces krzepnięcia - czas krzepnięcia krwi (czas Lee-White) oraz czas rekalcynacji osocza (czas krzepnięcia osocza po uwapnieniu) mają dziś znaczenie wyłącznie historyczne i nie powinny być wykonywane w laboratoriach diagnostycznych. Przyczyną krytycznej oceny tych badań była mała czułość i specyficzność, oraz mała powtarzalność badań wynikająca z błędów pobrania krwi. Do badań przesiewowych oceniających kaskadę krzepnięcia osoczkowego należą badania układu wewnątrzpochodnego, zewnątrzpochodnego oraz drogi wspólnej.

A. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, APTT (dawniej czas kaolinowo-kefalinowy) jest miarą wewnątrzpochodnego układu aktywacji protrombiny, po maksymalnej aktywacji czynników XI i XII (ryc. 9.4). Zależy on od zawartości w osoczu czynników II, V, VIII, IX, X, XI, XII i fibrynogenu, nie zależy natomiast od liczby krwinek płytkowych. *Wartości prawidłowe* czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji zależą od stosowanej metody i wynoszą 28 – 34 s. Prawidłowo wykonane badanie jest bardzo dobrym testem przesiewowym dla wewnątrzpochodnej i wspólnej drogi układu krzepnięcia. Przedłużony czas częściowej tromboplastyny po aktywacji w nieobecności heparyny wskazuje na niedobór jednego z czynników krzepnięcia (hemofilie typu A, B, choroba von Willebranda) lub na pojawienie się w krążeniu krążących antykoagulantów lub przeciwciał skierowanych przeciwko czynnikom krzepnięcia (np. czynnikowi VIII lub IX). Wydłużenie APTT zaczyna być zauważalne przy niedoborach czynników rzędu 40-50% normy.

Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji jest przedłużony w:

- hemofiliach typu:
 - A - wrodzonym niedoborze czynnika VIII,
 - B - wrodzonym niedobrze czynnika IX,
 - C - wrodzonym niedoborze czynnika XI,
- wrodzonych niedoborach innych czynników wewnątrzpochodnego układu krzepnięcia (zaburzenia fazy kontaktu - niedobór czynnika XII, prekalkireiny, kininogenu; niedobór czynnika V),
- afibrynogenemii, hipo- i dysfibrynogenemii,
- niektórych postaciach choroby von Willebranda,
- obecności inhibitorów krzepnięcia (heparyna, produkty degradacji fibrynogenu, krążące antykoagulanty).



Ryc. 9.4 Zasada oznaczania czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT)

W przypadku monitorowania leczenia heparyną wielkocząsteczkową należy oczekiwać przedłużenia APTT 1,5 do 2,5-krotnego w stosunku do wartości prawidłowych. Leczenie heparynami niskocząsteczkowymi, prowadzące do wybiórczej inaktywacji czynnika Xa, nie wpływa na wartości APTT i nie wymaga regularnego monitorowania. W przypadkach szczególnych (ciąża, przewlekłe choroby wątroby i nerek, powikłania krwotoczne lub zakrzepowe, dzieci, osoby starsze itp.) należy oznaczać aktywność anty-Xa.

Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji jest prawidłowy w:

- naczyniowych i płytkowych skazach krwotocznych,
- wybiórczym niedoborze czynnika VII,
- niewielkich zaburzeniach wewnątrz- i zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia (łagodne postacie hemofilii, powyżej 20-30% normy czynnika VIII).

Skrócenie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji nie ma znaczenia diagnostycznego.

B. Czas protrombinowy (PT), czas tromboplastynowy jest miarą zewnątrzpochodnego układu aktywacji protrombiny (ryc. 9.5). Zależy on od zawartości w osoczu protrombiny, czynników V, VII, X i fibrynogenu. Nie zależy

natomiast od pozostałych czynników krzepnięcia i od liczby krwinek płytkowych. Czas protrombinowy jest badaniem z wyboru służącym do monitorowania terapii przeciwwkrzepowej antagonistami witaminy K. Wartości prawidłowe dla czasu protrombinowego wynoszą od 11 do 14 s i zależą od aktywności używanej do badania tromboplastyny. Duże rozbieżności w wynikach badania u osób leczonych przeciwwkrzepowo wymusiły standaryzację stosowanej do badania tromboplastyny tkankowej, dlatego już w 1977 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) uznała określoną serię ludzkiej mózgowej tromboplastyny za pierwotny międzynarodowy preparat referencyjny, któremu po kalibracji przyznano współczynnik $ISI=1,0$ (International Sensitivity Index). Stosowane do diagnostyki tromboplastyny są kalibrowane w odniesieniu wzorca pierwotnego i wtórnych materiałów referencyjnych. Obecnie wartość czasu protrombinowego jest przedstawiana jako międzynarodowy współczynnik znormalizowany – INR, a tradycyjnie jako procentowy wskaźnik protrombinowy. INR odpowiada takiej wartości współczynnika czasu protrombinowego (R), jaką by uzyskano, używając do oznaczeń pierwotnego wzorca tromboplastyny. Posługiwanie się tym współczynnikiem możliwe jest przy stosowaniu standaryzowanych preparatów tromboplastyny i pozwala na jednolitą interpretację wyników czasu protrombinowego, niezależnie od laboratorium, w którym badanie zostało wykonane. Stosowanie INR ma szczególne znaczenie w monitorowaniu chorych leczonych doustnymi antykoagulantami.

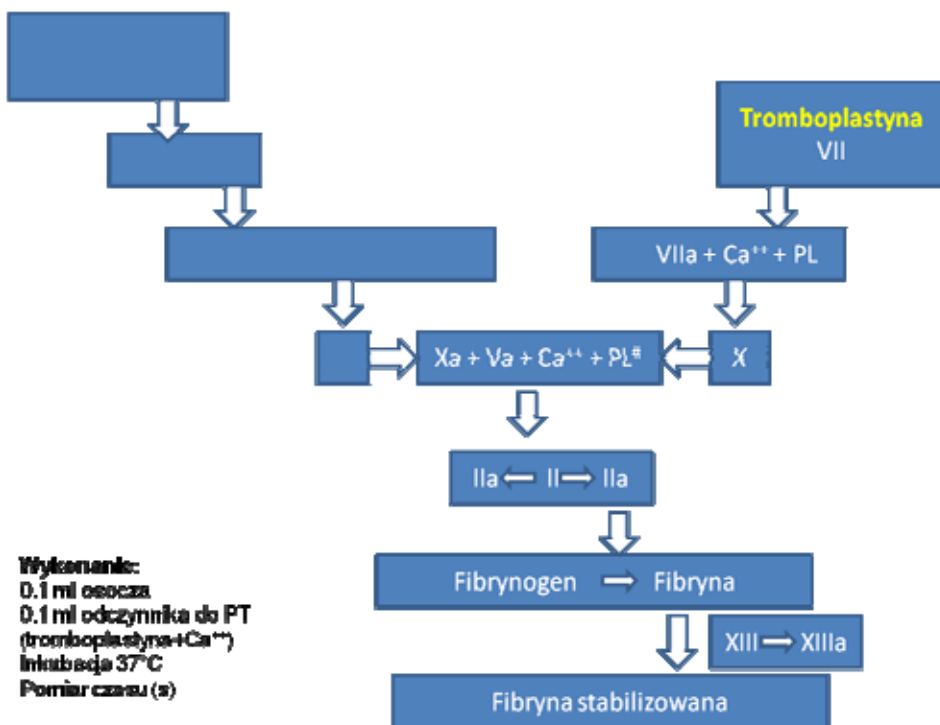
Wartości prawidłowe: INR 0.9 - 1.2, wskaźnik protrombinowy: 80 - 120%.

Czas protrombinowy jest przedłużony (INR podwyższony, wskaźnik protrombinowy obniżony) w:

- wrodzonych niedoborach czynników II, V, VII, X,
- przewlekłych chorobach miększu wątroby, w niedoborach witaminy K, w chorobie krwotocznej noworodków,
- leczeniu doustnymi antykoagulantami,
- rozsianym wykrzepianiu wewnątrznaczyniowym (DIC),
- przy znacznych niedoborach fibrynogenu, dysfibrinogenemii i zaburzeniach polimeryzacji fibrynogenu,
- w obecności inhibitorów krzepnięcia (heparyna, produkty degradacji fibrynogenu, krążące antykoagulanty u chorych z toczniem rumieniowatym),
- w przebiegu białaczek, mocznicy, choroby Addisona-Biermera.

Skrócenie czasu protrombinowego nie ma znaczenia diagnostycznego.

W różnych sytuacjach klinicznych u chorych leczonych ustnymi antykoagulantami zalecane są różne zakresy terapeutyczne INR, od 2-2,5 w profilaktyce zaburzeń zakrzepowych po zabiegach operacyjnych, do 4-4,5 w przypadku nawracających zakrzepów i zatorów. U pacjentów ze znacznie przedłużonym czasem protrombinowym w wyniku leczenia antykoagulacyjnego należy spodziewać się również przedłużenia APTT z powodu obniżenia aktywności czynnika IX.



Ryc. 9.5 Zasada oznaczania czasu protrombinowego (PT)

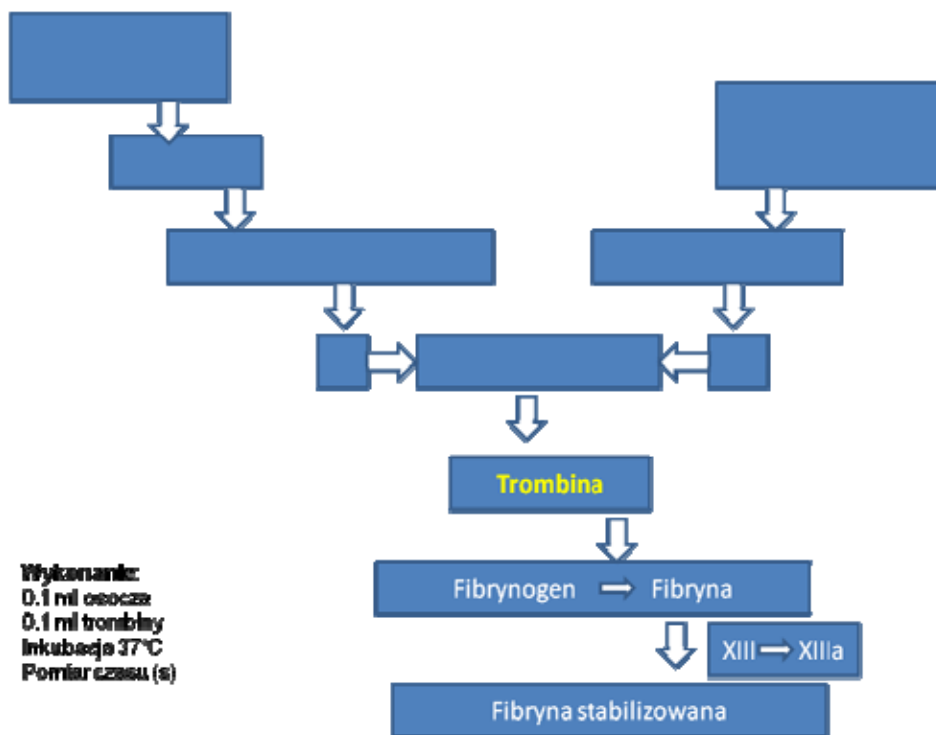
C. Badania oceniające wspólną drogę kaskady krzepnięcia

Czas trombinowy (TT) jest miarą przejścia fibrynogenu w fibrynę i nie zależy od wewnątrz- i zewnątrzpochodnego układu aktywacji protrombiny (ryc. 9.6). Zależy natomiast od stężenia fibrynogenu, obecności nieprawidłowego fibrynogenu, aktywności antytrombiny oraz procesów polimeryzacji i stabilizacji fibryny.

Wartości prawidłowe czasu trombinowego wynoszą około 15-20 s i są zależne od aktywności użytej do badania trombiny.

Czas trombinowy jest przedłużony w:

- hipofibrynogenemiach (DIC - zespół rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego, marskość i inne choroby wątroby) - przy wartościach fibrynogenu bliskich lub równych 0 g/L (afibrynogenemia) osocze nie krzepnie,
- dysfibrynogenemiach,
- obecności immunologicznych inhibitorów trombiny i paraprotein,
- zaburzeniach polimeryzacji fibryny (obecność produktów degradacji fibrynogenu – FDP/DD),
- obecności nieprawidłowych globulin u chorych z gammopatiami monoklonalnymi,
- leczeniu heparyną, hirudyną, lekami trombolitycznymi.



Ryc. 9.6 Zasada oznaczania czasu trombinowego (TT)

Czas batroksobinowy (reptylazowy, RT) jest to czas krzepnięcia osocza po aktywacji trombino- podobnym enzymem - reptylazą, obecną w jadzie żmiji *Bothrops atrox*. Podobnie jak czas trombinowy jest miarą przejścia fibrynogenu w fibrynę i nie zależy od wewnątrz- i zewnątrzpochodnego układu aktywacji protrombiny. Na czas reptylazowy nie mają wpływu: heparyna i immunologiczne antytrombiny, dlatego w trakcie leczenia heparyną lub w przypadku zanieczyszczenia próbki krwi śladowymi ilościami heparyny czas reptylazowy pozostaje niezmienny. W stanach dysfibrynogenemii czas reptylazowy jest bardziej przedłużony niż czas trombinowy, a w obecności FDP i D-Dimerów – mniej.

Fibrynogen jest α_2 -globuliną syntetyzowaną w wątrobie, która uczestniczy w procesie tworzenia skrzepu (czynnik krzepnięcia I, rozpuszczalny prekursor fibryny). Najczęściej stosowaną metodą do oznaczania fibrynogenu jest zmodyfikowany pomiar czasu trombinowego opisany w 1957 r. przez Claussa. Czas krzepnięcia rozcieńczonego osocza po dodaniu wysokich stężeń trombiny jest odwrotnie proporcjonalny do stężenia fibrynogenu. Badanie to jest więc miarą ostatniego etapu wspólnej drogi w kaskadzie krzepnięcia.

Wartości prawidłowe stężenia fibrynogenu wynoszą: 1,8 - 3,5 g/L.

Stężenie fibrynogenu jest **fizjologicznie podwyższone** podczas miesiączki i w ciąży. Fibrynogen jako białko ostrej fazy jest podwyższony w stanach zapalnych (ostre stany gorączkowe, choroby zakaźne, duże zabiegi operacyjne, urazy), a najsilniejszym stymulatorem jego syntezy jest czynnik stymulujący hepatocyty - HSF-II. Brak wzrostu fibrynogenu w tych stanach może sugerować wzmożoną fibrynolizę lub rozwijający się zespół wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC).

Do wzrostu stężenia fibrynogenu dochodzi w:

- przebiegu chorób nerek (zespół nerczycowy, kłębkowe zapalenie nerek, zespół hemolityczno- mocznicowy),
- kolagenozach (toczeń rumieniowaty, zapalenie guzkowe okołotętnicze),
- zawale serca i udarze mózgu,
- nocnej napadowej hemoglobinurii,
- chorobach nowotworowych,
- plamicy zakrzepowej małopłytkowej,
- stosowaniu niektórych leków, w tym doustnych środków antykoncepcyjnych.

Ponadto hiperfibrynogenemia jest niezależnym hemostatycznym czynnikiem ryzyka zawału mięśnia sercowego, udaru niedokrwienego mózgu i miażdżycy naczyń obwodowych.

Stężenie fibrynogenu jest obniżone w:

- wrodzonych niedoborach fibrynogenu (afibrynogenemie, hypofibrynogenemie, dysfibrynogenemie),
- chorobach wątroby (piorunujące zapalenie wątroby, marskość, martwica wątroby, śpiączka wątrobową),
- zespole rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC),
- skazach fibrynolitycznych (pokrwtotoczne, pourazowe, pooparzeniowe, ostra białaczka promielocytowa, nowotwory),
- mononukleozie zakaźnej,
- leczeniu trombolitycznym (streptokinaza, urokinaza, batroksobina, ankrod, rtPA) oraz innymi lekami (np. fenobarbital, L-asparaginaza).

9.2.5. Podstawowe badania układu fibrynolitycznego

Stosowane przez kilkadziesiąt lat badania oceniające proces fibrynolizy - czas lizy skrzepu euglobulin (czyli czas rozpuszczania skrzepu zawierającego frakcję euglobulinową osocza, w tym aktywatorów i inhibitorów fibrynolizy) oraz pomiar pola lizy fibrynogenu pod wpływem frakcji euglobulin, mają dziś znaczenie historyczne i są rzadko wykonywane w laboratoriach diagnostycznych. Obecnie laboratoria diagnostyczne specjalizujące się w badaniach układu

fibrinolitycznego oznaczają stężenie plazminogenu, inhibitora plazminy: α_2 -antyplazminy, oraz wykonują badania aktywacji i hamowania przemiany plazminogenu. W tym celu oznaczany jest tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) - mierzyć można stężenie antygeny i jego aktywność oraz stężenie antygeny inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1). Badania aktywacji plazminy, która ulega natychmiastowej inaktywacji przez tzw. antyplazminy, są trudne i wymagają badań pośrednich – należy do nich oznaczanie kompleksów plazmina - antyplazmina (PAP) oraz produktów degradacji fibrynogenu i fibryny (FDP, D-Dimery, fibrynopeptydy A i B, peptydy B β 1-42, B β 15-42 i B β 1-118).

9.2.6. Podstawowe badania układu antykoagulacyjnego

Oznaczenia najważniejszych białek układu antykoagulacyjnego – antytrombiny, białka C i białka S, prowadzone są metodami pozwalającymi na ocenę ich aktywności i/lub stężenia.

Niedobór antytrombiny obserwowany jest:

- w zakrzepicach uwarunkowanych genetycznie (typy I i II),
- u noworodków i wcześniaków,
- w zaburzeniach syntezy (marskość wątroby),
- w zespołach utraty białka (enteropatie, zespół nerczycowy)
- po hemodializie,
- w DIC-u i posocznicy,
- podczas leczenia dużymi dawkami heparyny wielkocząsteczkowej.

Defekty wrodzone występują rzadziej niż nabyte. Typ I charakteryzuje równomierne obniżenie stężenia i aktywności białka, natomiast typ II jest wywołany defektem struktury antytrombiny i może dotyczyć regionu wiązania heparyny, miejsca aktywnego w stosunku do czynników krzepnięcia, lub obu regionów równocześnie.

Niedobór białek C i S może występować:

- w zakrzepicach uwarunkowanych genetycznie (typy I, II i III)
- u noworodków i wcześniaków,
- w chorobach wątroby,
- w DIC-u i posocznicy,
- w zespołach utraty białka (zespoły złego wchłaniania jelitowego, zespół nerczycowy),
- w ciąży,
- w ostrej niewydolności oddechowej,
- podczas leczenia doustnymi antykoagulantami, antagonistami witaminy K.

W przypadku podejrzenia niedoboru białka C oznaczana jest jego aktywność, a w przypadku białka S - frakcja wolna (niezwiązana z C4BP z układu dopełniacza) oraz aktywność.

9.3. Diagnostyka najczęstszych skaz krwotocznych

9.3.1. Diagnostyka zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC)

Zespół DIC jest definiowany jako nabyty zespół wewnątrznaczyniowej niezlokalizowanej aktywacji krzepnięcia, wynikający z rzutu do krążenia tromboplastyn tkankowych, aktywacji osoczonego krzepnięcia i zwolnienia przepływu krwi. Związane jest to z uszkodzeniem naczyń mikrokrażenia, co może doprowadzić do dysfunkcji wielonarządowej, a wtórnie do aktywacji fibrynolizy.

W wyniku uogólnionego wykrzepiania pojawiają się mnogie zakrzepy w mikrokrażeniu, co prowadzi do niedokrwiennego uszkodzenia wielu narządów. Zużycie płytek i czynników krzepnięcia objawia się nasilającą się skazą krwotoczną.

W praktyce klinicznej przyjęto podział zespołu DIC na skompensowany (faza początkowa DIC lub stan przewlekły) oraz zdekompensowany (ostry DIC).

Główną rolę w przebiegu DIC-u pełnią dwa enzymy – trombina i plazmina, odpowiedzialne za aktywację krzepnięcia i fibrynolizy oraz aktywację i zwiększone niszczenie płytek. Wyniki badań laboratoryjnych wskazują na zmiany określonych elementów układu krzepnięcia i tym samym pozwalają na rozpoznanie DIC.

Prawidłowa diagnostyka DIC powinna obejmować badania podstawowe, łatwe do wykonania w warunkach szpitalnych (APTT, PT, TT, fibrynogen, liczba płytek, antytrombina i D-Dimery) oraz testy bardziej specyficzne, niestety rzadko dostępne w warunkach ostrego dyżuru, takie jak kompleksy trombina-antytrombina (TAT) i plazmina-antypłazmina (PAP), fragmenty protrombiny F1+2, białko C i peptyd aktywacyjny białka C, plazminogen, monomery fibryny oraz oznaczenia czynników krzepnięcia V, VII i VIII. Gwałtowny spadek liczby płytek, stężenia fibrynogenu i antytrombiny oraz wzrost stężenia D-dimerów mogą świadczyć o narastaniu objawów DIC.

9.3.2. Diagnostyka choroby von Willebranda

Choroba von Willebranda jest najczęstszą skazą wrodzoną i występuje z częstością 1-2% w populacji ogólnej. Chorobę tę wywołuje zmiana struktury lub funkcji czynnika von Willebranda, który odpowiada za procesy adhezji płytek oraz transport i ochronę czynnika VIII w osoczu. Typy 1 i 3 choroby von Willebranda cechuje ilościowy niedobór czynnika, niewielki w typie 1 i znaczny w typie 3. Typ 2, charakteryzujący się zaburzeniami struktury i funkcji czynnika, podzielono na 4 podtypy: 2A, 2B, 2M i 2N. Badania laboratoryjne pozwalają na rozpoznanie poszczególnych podtypów i tym samym umożliwiają właściwą decyzję terapeutyczną. Tabela 9.2 przedstawia szczegółową charakterystykę poszczególnych postaci.

Tabela 9.2. Charakterystyka poszczególnych postaci choroby von Willebranda

Typ/ podtyp	Cechy charakterystyczne	Obraz skazy krwotocznej
1	Częściowy niedobór ilościowy , proporcjonalne obniżenie antygeny i aktywności (<50%)	Łagodna lub umiarkowana
2A	Niedobór jakościowy : upośledzona adhezyjna funkcja płytek, zmniejszenie ilości/brak dużych i pośrednich multimerów.	Różna
2B	Niedobór jakościowy : wzrost powinowactwa vWF do płytkowej GP Ib/IX, nieprawidłowe/brak dużych multimerów. Antygen i aktywność zmniejszone w różnym stopniu, łagodna małopłytkowość.	Różna
2M	Niedobór jakościowy : obniżenie powinowactwa vWF do płytkowej GP Ib/IX, brak zmian multimerowych. Antygen i aktywność zmniejszone w różnym stopniu, głównie spadek aktywności.	Różna
2N	Niedobór jakościowy : spadek powinowactwa vWF do czynnika VIII, prawidłowy rozkład multimerów.	Różna
3	Całkowity niedobór ilościowy z dużym obniżeniem aktywności czynnika VIII (<5%), brak multimerów.	Ciężka

Badania przesiewowe w kierunku choroby von Willebranda obejmują oznaczanie czasu krwawienia lub okluzji (PFA-100), APTT, oznaczenie liczby płytek, aktywności i stężenia antygeny czynnika von Willebranda oraz aktywności czynnika VIII. W badaniach uzupełniających można oznaczać agregację płytek w obecności ristocetyny – нефизjologicznego kofaktora czynnika von Willebranda, badać strukturę multimerów, wiązanie czynnika vW z płytkami (GPIb), kolagenem lub z czynnikiem VIII, a także oznaczać przeciwciała przeciwko czynnikowi von Willebranda. Badania te umożliwiają rozpoznanie typów i podtypów choroby von Willebranda, rozróżnienie postaci wrodzonych od nabytych i pozwalają na podjęcie decyzji odnośnie leczenia desmopresyną (DDAVP).

9.4. Diagnostyka laboratoryjna trombofilii

Pojęcie „trombofilia” oznacza wrodzoną lub nabytą skłonność do zakrzepów, głównie żylnych. Omawiane powyżej badania przesiewowe układu krzepnięcia, wykonywane u pacjentów ze skłonnością do zakrzepów nie pozwalają na wykrycie przyczyn zaburzenia (ryc. 9.7). Dlatego u pacjentów z podejrzeniem trombofilii po wykonaniu badań przesiewowych wykluczających inne przyczyny zaburzeń zakrzepowo-zatorowych (choroby układu krwiotwórczego, nowotworowe, nerek, wątroby, miażdżycę itp. – tabela 9.3), należy wykonać szczegółowe badania specjalistyczne, uwzględniając częstość występowania niedoborów i dysfunkcji poszczególnych białek. Należy pamiętać, że rozległe zabiegi opera-

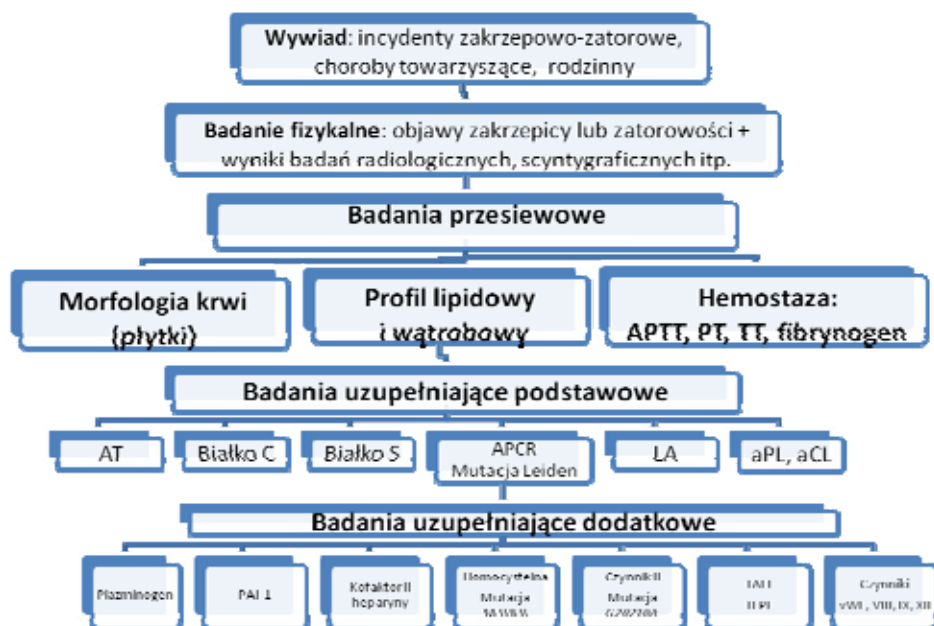
cyjne, długotrwałe unieruchomienie, ciąża, połów i stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych oraz terapii hormonalnej u osób z wrodzonymi defektami prozakrzepowymi, mogą wywołać objawy zakrzepicy i dlatego są wskazaniem do wykonania badań szczegółowych.

W badaniach przesiewowych układu krzepnięcia, obejmujących podobnie jak w przypadku skłonności do krwawień oznaczenia APTT, PT, TT i fibrynogenu, rzadko obserwuje się odchylenia od wartości prawidłowych. U osób ze skłonnością do zakrzepów może pojawić się tzw. „paradoksalne” przedłużenie APTT, wywołane obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (LA, aPL, aCL) u pacjentów ze schorzeniami autoimmunologicznymi (np. toczeń rumieniowaty, reumatoidalne zapalenie stawów itp.). Rzadko obserwuje się dysfibrinogemie, prowadzące do zaburzeń zakrzepowych.

Wśród badań podstawowych u osób z podejrzeniem trombofilii wymienia się obecnie badania układu antykoagulacyjnego białka C (w tym oznaczanie białka C, białka S i oporności na białko C – tzw. APC-Resistance), oznaczanie antytrombiny (AT) oraz przeciwciał antyfosfolipidowych (aPL, np. antykoagulantu tocznia - LA) i antykardiolipinowych (aCL).

Oporność na aktywne białko C (APC-R) spowodowana jest najczęściej mutacją w obrębie genu kodującego czynnik V (mutacja typu Leiden, G1691A), która prowadzi do syntezy ułomnego czynnika V, aktywnego wprowadzie w kaskadzie krzepnięcia, lecz nie wykazującego aktywności kofaktorowej w układzie białka C.

Innymi, rzadszymi przyczynami trombofilii wrodzonej są: podwyższenie stężenia glikoproteiny bogatej w histydynę (HRGP) prowadzące do hipoplazminogenemii, dysplazminogenemia, a także niedobór kofaktora II heparyny. W ostatnich latach potwierdzono, że przyczyną trombofilii wrodzonej może być również hiperhomocysteinemia, związana z mutacją genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR C677T), enzymu odpowiedzialnego za przemianę homocysteiny do metioniny. Przyczyny zakrzepicy wrodzonej i nabytej zestawiono w tabeli 9.3.



Ryc. 9.7 Schemat badania pacjenta z cechami trombofilii (wrodzonej lub nabytej) – objaśnienia skrótów w tekście

Tabela 9.3. Przyczyny zakrzepicy nabytej i wrodzonej

Trombofilia wrodzona	Trombofilia nabyta	Przyczyny inne (?)
Niedobór antytrombiny Niedobór białka C Niedobór białka S APCR – mutacja FV Leiden Hiperprotrombinemia – mutacja FII G20210A Dysfibrynogenemia Hipo/ dysplazminogenemia Niedobór kofaktora II heparyny Hiperhomocysteinemia – Polimorfizm C677T MTHFR Wzrost czynnika VIII Wzrost PAI-1	Zabiegi ortopedyczne i chirurgiczne Urazy i długotrwałe unieruchomienie Ciąża, połóg, hormonalna terapia zastępcza i antykoncepcja Przeciwciała antyfosfolipidowe Nowotwory Zespoły mieloproliferacyjne Udar niedokrwienny mózgu Wzrost czynników VIII i von Willebranda Wzrost PAI-1	Nabyta APC-R Otyłość Hiperfibrynogenemia Wzrost czynników IX, XI Spadek czynnika XII Wzrost TAFI (inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną)* Spadek TFPI (inhibitora układu zewnątrzpochodnego)*

*TAFI i TFPI uznano za nowe czynniki odpowiedzialne za stany nadkrzepliwości

Mutacja genu protrombiny (FII G20210A) również została uznana za jedną z przyczyn wrodzonej trombofilii, jednak wzrost aktywności protrombiny nie znajduje odzwierciedlenia w żadnym prostym teście laboratoryjnym i dlatego zaburzenie to wykrywane jest wyłącznie przy pomocy badań metodami PCR.

W przypadku stwierdzenia niedoboru białek C i S oraz antytrombiny metodami czynnościowymi należy wykonać oznaczenia antygenów tych białek technikami immunologicznymi w celu określenia typu i podtypu zaburzenia oraz badania metodami biologii molekularnej (PCR) w celu określenia rodzaju mutacji (patrz również rozdział 13).

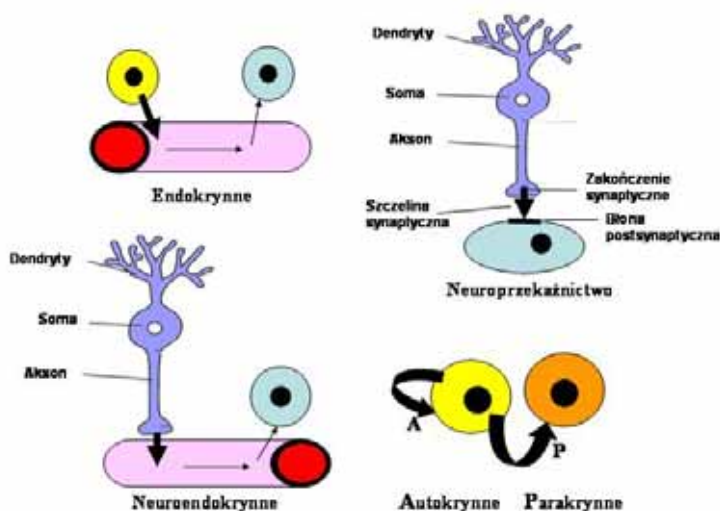
10. PODSTAWY DIAGNOSTYKI ENDOKRYNOLOGICZNEJ

Andrzej Szutowicz, Dorota Bizon-Zygmańska

10.1. Mechanizmy homeostazy ustrojowej

Układ nerwowy i endokrynnny stanowią dwa główne systemy odpowiadające na bodźce środowiskowe i dostosowujące organizm do zmieniających się warunków zewnętrznych. Odpowiedzialne są również za utrzymanie wewnętrznej równowagi (homeostazy) organizmu.

W układzie nerwowym neurony wywierają swoje działanie na inne neurony i tkanki bezpośrednio poprzez zakończenia synaptyczne. Substancje neuroprze-kaźnikowe zgromadzone w pęcherzykach synaptycznych są wydzielane z zakończenia nerwowego do szczeliny synaptycznej między jego błoną presynaptyczną a błoną postsynaptyczną na powierzchni komórki recepcyjnej. Neuroprze-kaźnik wiąże się ze specyficznymi dla siebie receptorami błony postsynaptycznej wywołując określone reakcje takie jak: otwarcie kanału jonowego, aktywacja białek G czy też kinazy tyrozynowej.



Ryc. 10.1. Schematy oddziaływań substancji sygnałowych na komórki docelowe
Przykłady wydzielania: endokrynnne – hormony tropowe przysadki mózgowej, prolakty-na, hormon antydiuretyczny, hormon wzrostu, glukokortykoidy, mineralokortykoidy, tyroksyna; neuroprzekaznictwo – glutaminian, acetylocholina, kwas gamma amino ma-słowy, dopamina, serotonina; wydzielanie neuroendokrynnne – hormony uwalniające hormony przysadki mózgowej, dopamina; wydzielanie autokrynnne – prostaglandyny, insulino-podobne czynniki wzrostu; wydzielanie parakrynnne - glukagon, somatostatyna.

To z kolei uruchamia drogi wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów, które zmieniają doraźnie lub trwale (adaptacyjnie) funkcję, a czasem strukturę komórki odbiorczej. Stężenie neuroprzekaźnika w szczeliny synaptycznej jest zwykle wysokie (kilka-kilkadziesiąt mmol/L) co powoduje, że siła sygnału jest duża. Działanie neuroprzekaźnika kończy jego rozkład (np. acetylocholina: esteraza-acetylocholina) lub wychwyt przez specyficzne transportery (np. glutaminian, dopamina). Neuroprzekaźniki działają więc lokalnie w obrębie synapsy, w zasięgu od ułamka do kilku mikrometrów od miejsca wydzielania.

Hormony są syntetyzowane, składowane i wydzielane przez wyspecjalizowane komórki endokrynne zgromadzone w gruczołach wewnętrznego wydzielania bądź rozproszone w różnych tkankach w postaci pojedynczych komórek lub ich niewielkich skupień. Są one wydzielane z ziarnistości wydzielniczych w odpowiedzi na specyficzny bodziec stymulujący do krwi, za pośrednictwem której dostają się do komórek docelowych. Wydzielenie do krążenia ogólnego powoduje znaczne rozcieńczenie hormonów. Ich stężenia w osoczu i płynie śródmiąższowym są niskie, rzędu 10^{-9} – 10^{-12} mol/L. Po dotarciu do komórek receptorowych hormony peptydowe i aminy katecholowe wiążą się z odpowiednim receptorem błonowym wywierając swoje działanie poprzez białka G sprzężone z cyklazą adenylanową lub fosfolipazą C, bądź poprzez drogi kinaz tyrozynowych. Inne hormony takie jak hormony sterydowe lub tarczycowe dyfundują przez błonę plazmatyczną i łączą się z rozpuszczalnym ligandem wewnątrzkomórkowym, który staje się aktywnym czynnikiem transkrypcyjnym. Wiąże się on ze specyficznymi miejscami promotorowymi DNA zwiększając lub zmniejszając ekspresję odpowiednich genów. W ten sposób odbywa się długoczasowa adaptacyjna modyfikacja struktury i funkcji różnych tkanek. Przykładem wielokierunkowych zmian adaptacyjnych wywołanych przez hormony jest dojrzewanie płciowe lub ciąża.

Hormony wywierają również działania krótkoczasowe. Przykładem takiego wpływu jest wywołany przez insulinę wzrost gęstości transporterów glukozy GLUT4 w błonach plazmatycznych komórek insulino-zależnych. Równowaga układów hormonalnych w większości przypadków jest utrzymywana przez system sprzężeń zwrotnych. Oznacza to, że niski poziom we krwi substancji podlegającej regulacji przez hormon powoduje wzrost, a wysoki poziom spadek jego wydzielania do krwi. I tak, hipokalcemia powoduje wzrost wydzielania parathormonu przez przytarczycę, który zwiększa poziom $[Ca^{2+}]$ w płynie pozakomórkowym. Natomiast wzrost $[Ca^{2+}]$ hamuje wydzielanie parathormonu. Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku insuliny, której wydzielanie z komórek beta wysiępek trzustki jest stymulowane przez hiperglikemię, a hamowane przez hipoglikemię.

10.2. Współdziałanie układu nerwowego i układu hormonalnego

Układ nerwowy moduluje czynność gruczołów wydzielania wewnętrznego poprzez drogi nerwowe bezpośrednio unerwiające komórki gruczołowe (neuroprzekątnictwo) lub poprzez wydzielanie neuroprzekazników do krwi (droga neuroendokrynną) (ryc. 10.1). I tak, pobudzenie włókien cholinergicznym nerwu błędnego unerwiających wysepki trzustki zwiększa wydzielanie insuliny i glukagonu. Natomiast stymulacja włókien sympatycznych nerwu trzewnego unerwiających wysepki hamuje wydzielanie insuliny i somatostatyny, a zwiększa wydzielanie glukagonu.

10.2.1. Hormony podwzgórza i przedniego płata przysadki

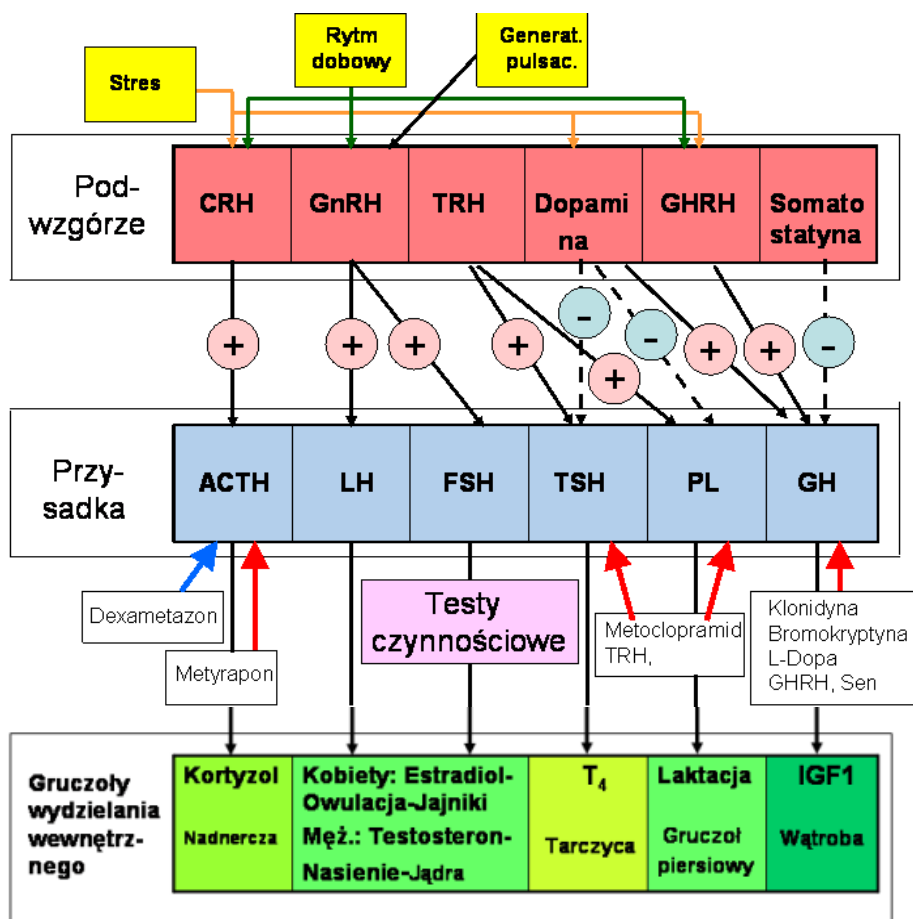
Kluczowe znaczenie w regulacji czynności komórek endokrynnych przysadki mają neurohormony wydzielane przez zakończenia nerwowe neuronów jąder podwzgórzowych. Neurony te w swoich perikarionach syntetyzują różne hormony peptydowe - **liberyny**. Ciała tych neuronów (neurony drobnokomórkowe) tworzą jądra w regionie podwzgórzowo-przysadkowym, a ich aksony formują drogi nerwowe kończące się skupieniami zakończeń nerwowych neurosekrecyjnych (narząd neurohemalny) na naczyniach włosowatych spłotów naczyniowych. Liberyny transportowane przez aksony są akumulowane w pęcherzykach sympatycznych zakończeń nerwowych i wydzielane do spłotów naczyniowych. Spłoty są ukrwione przez tętnicę przysadkową górną, a uchodzą do dwóch żył wrotnych przysadkowych. W obrębie przedniego płata (części gruczołowej) przysadki mózgowej naczynia te ponownie rozgałęziają się i dostarczają liberyny do komórek wydzielających hormony tropowe, a następnie uchodzą do żył odprowadzających (ryc. 10.2).

Do liberyn zaliczamy m.in. hormon uwalniający tyreotropinę (TRH, tyreoliberyna), hormon uwalniający gonadotropiny follitropinę i lutropinę (GnRH, gonadoliberyna), hormon uwalniający kortykotropinę (CRH, kortykoliberyna) i hormon uwalniający hormon wzrostu (GHRH).

Podwzgórze wydziela również hormony hamujące niektóre funkcje przedniego płata przysadki. Czynniki te nazwano czynnikami hamującymi albo **statynami**. Somatostatyna hamuje wydzielanie hormonu wzrostu, somatomedyna - tyreotropiny, a czynnik hamujący uwalnianie melanotropiny (MSH) - hormon melanotropowy. W podwzgórzu znajdują się również neurony wydzielające dopaminę, która drogą neuroendokrynną hamuje wydzielanie prolaktyny i tyreotropiny oraz zwiększa wydzielanie hormonu wzrostu (ryc. 10.2).

Przysadka jest niewielkim gruczołem dokrewnym położonym u podstawy czaszki, w zagłębieniu kości klinowej, (siodło tureckie). Posiada dwie zasadnicze części: mniejszą część nerwową, do której wydzielane są hormony antydiuretyczny i oksytocyna, oraz większą część gruczołową (ok. 70% masy gruczołu). Znajduje się w niej sześć grup komórek wydzielających siedem hormonów: prolaktynę (PL), hormon adrenokortykotropowy (ACTH), hormony gonadotro-

powe (lutropinę (LH) i follitropinę (FSH), hormon tyreotropowy (TSH), hormon wzrostu (GH) i hormon melanotropowy (MSH) (ryc. 10.2).

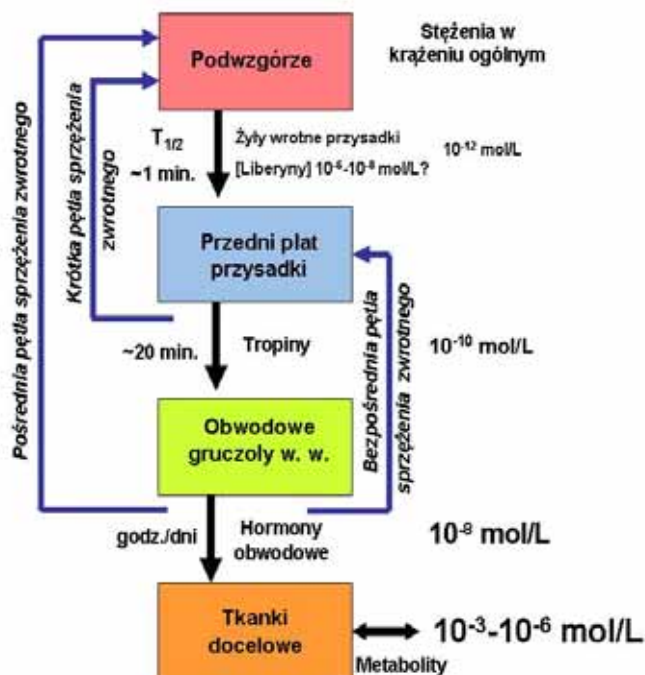


Ryc. 10.2. Osie podwzgórzowo-przysadkowo-gruczołowe. Podwzgórzowa -neurohormonalna regulacja wydzielania hormonów przedniego płata przysadki mózgowej. Regulacja wydzielania hormonów z obwodowych gruczołów wydzielania wewnętrznego i tkanek przez hormony tropowe przysadki mózgowej.

Oprócz liberyn czynność wydzielniczą odpowiednich komórek części gruczołowej przysadki regulują ujemne sprzężenia zwrotne wywierane przez hormony gruczołu tarczowego, hormony płciowe i glikokortykosterydy (ryc. 10.3). Zjawisko to zachodzi pośrednio przez zahamowanie wydzielania odpowiednich liberyn z podwzgórza, oraz przez bezpośrednie hamowanie wydzielania hormonów tropowych z komórek gruczołowej części przysadki (ryc. 10.3).

Bodźce innego rodzaju, takie jak hipoglikemia, aktywują wydzielanie tyreoliberyny, hormonu wzrostu i adrenokortykotropowego. Wysiłek fizyczny zwiększa wydzielanie prolaktyny i hormonu wzrostu. Sen stymuluje wydzielanie

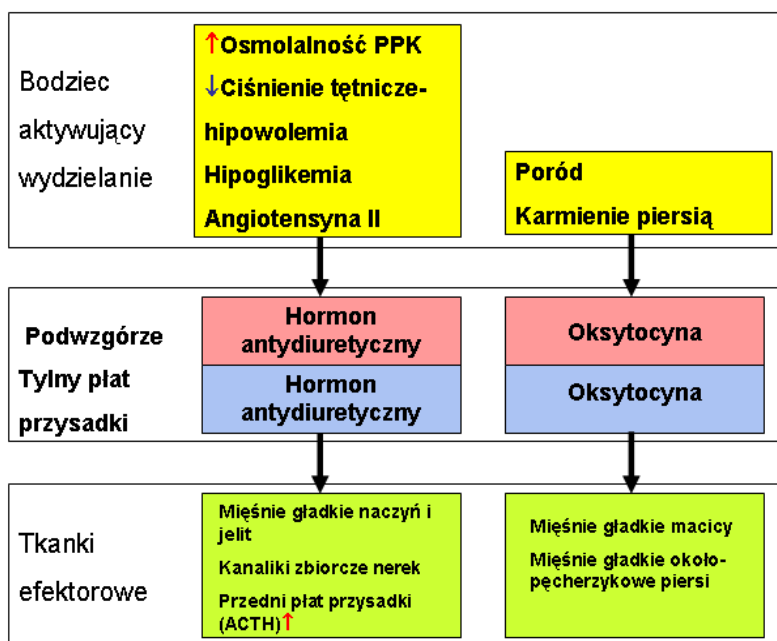
hormonu wzrostu, a stres - hormonu adrenokortykotropowego i hormonu wzrostu. Wymienione mechanizmy regulacyjne są wykorzystywane w próbach czynnościowych mających na celu wykrycie niedoczynności bądź nadczynności układów endokrynnych (ryc. 10.2, 10.3).



Ryc. 10.3. Kaskada wydzielania hormonów. Układ sprzężeń zwrotnych

10.2.2. Hormony tylnego płata przysadki (część neurohormonalna)

Nieco inaczej jest zaopatrywany w krew tylny płat przysadki. Jest on unaczyniony przez tętnicę przysadkową dolną, do której spłotu kapilarnego są wydzielane hormony antydiuretyczny (wazopresyna, AVP, ADH) i oksytocyna. Synteza tych hormonów odbywa się w perikarionach neuronów olbrzymiomórkowych jądra przykomorowego i nadwzrokowego podwzgórza, skąd za pośrednictwem drogi nadwzrokowo-przysadkowej są dostarczane bezpośrednio do tylnego płata przysadki (ryc. 10.4). Wazopresyna działa w krążeniu ogólnym; zmniejsza diurezę poprzez zwiększenie przepuszczalności dla wody nabłonka kanalik zbiorczego i dystalnego nerek. Działanie to odbywa się poprzez aktywację kinazy białkowej A fosforylującej białko - akwaporynę w błonie luminalnej komórek kanalików nerkowych.



Ryc.10.4. Regulacja wydzielania i działanie hormonów tylnego płata przysadki mózgowej

W dawkach farmakologicznych ADH obkurcza mięśnie gładkie naczyń wieńcowych i obwodowych oraz mięśnie gładkie jelit. Niedobór ADH, powoduje moczówkę prostą (*mellitus insipidus*), w której dochodzi do upośledzenia zagęszczania moczu i nadmiernej utraty wody z moczem. Powoduje to odwodnienie (*hypovolemia*) hipertoniczne (*hypernatremia*). Z kolei zespół nieodpowiedniego wydzielania ADH, nadmiar tego hormonu, powoduje zwiększoną reabsorbcję zwrotną wody w kanalikach dystalnych powodującą przewodnienie hipotoniczne (*hypervolemia*, *hyponatremia*). Wydalany mocz jest zagęszczony (wysoki c.wł.) nieodpowiednio do istniejącej hiponatremii.

Oksytocyna jest oktapeptydem o składzie aminookwasowym podobnym do ADH. Hormon ten podczas porodu pobudza skurcze macicy, a w czasie karmienia piersią obkurcza włókna mięśniowe wokół pęcherzyków gruczołu mlecznego. Nie są znane patologie wynikające ze wzrostu wydzielania lub niedoboru oksytocyny.

10.3. Diagnostyka laboratoryjna wybranych zaburzeń endokrynologicznych

Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń endokrynologicznych odbywa się na poziomie podstawowym poprzez oznaczanie zmian stężeń analitów w płynach ustrojowych regulowanych przez odpowiednie hormony, oraz oznaczanie zmian stężeń hormonów obwodowych i tropowych. Stężenia liberyn w krążeniu ogólnym są zbyt niskie i zbyt zmienne by mogły stanowić wiarygodną wskazówkę diagnostyczną (ryc. 10.3.)

Tabela 10.1. Rodzaje badań laboratoryjnych stosowane w diagnostyce pierwotnych i wtórnych zaburzeń endokrynnych

Rodzaj badania	Przykłady zaburzeń hormonalnych
Ocena efektu biologicznego hormonu	Glukoza- insulina, glukagon, tyroksyna, IGF1 – cukrzyca, zespoły hipoglikemiczne Ca/Pi – parathormon, 1,25hydroksy- kalcyferol – hiper lub hipo paratyreoidyzm
Pomiar podstawowego stężenia hormonu w osoczu/surowicy i/lub jego wydalania z moczem	Kortyzol/ACTH – pierwotna i wtórna nadczynność lub niedoczynność kory nadnerczy Hormon tyreotropowy – nadczynność/ niedoczynność tarczycy Prolaktyna – <i>prolactinoma</i> , lub wtórna hiperprolaktynemia
Pomiar drugiego przekąznika informacji lub produktu przemiany hormonu	Nefrogenny cAMP – hiperparatyreoidyzm, psedohipoparatyreoidyzm Kwas 5-hydroksyindoloocetowy, serotonin-rakowiaki
Ocena rytmu wydzielania hormonu – dobowego lub miesięcznego	Kortyzol/ACTH – utrata rytmu – gruczolaki kory nadnerczy, zespoły depresyjne Estradiol/progesteron, FSH/LH – brak lub nieprawidłowe zmiany poziomów w cyklu miesięcznym – cykle bezowulacyjne, zespół wielotorbielowatych jajników, hiperprolaktynemia i inne zaburzenia płodności
Próby czynnościowe – hamujące w nadczynnościach i stymulujące w niedoczynnościach układów hormonalnych	Hormon wzrostu, próby stymulujące - próba snu, insulina, bromokryptyna, L-dopamina, klonidyna, somatoliberyna – w niedoborach wzrostu -próby hamujące – doustny test obciążenia glukozą (4-punktowy) – w akromegalii. Kortyzol/ACTH -Próby aktywujące z kortykoliberyną, synaktemem – w pierwotnych i wtórnych niedoczynnościach kory nadnerczy - próby hamujące z deksametazonem w nadczynnościach kory nadnerczy
Pomiar miana przeciwciał przeciw antygenowi/(m) związanym z mechanizmem działania hormonu	Przeciwciała przeciw antygenom tarczycy – nadczynności i niedoczynności tarczycy Przeciwciała przeciw-wyspowe i przeciw insulinowe w cukrzycy.

Badania laboratoryjne, które są stosowane do diagnostyki i oceny leczenia pacjentów z chorobami endokrynnymi, jak również zaburzeń endokrynnych przebiegu różnych chorób somatycznych i psychicznych można zaliczyć do kilku grup wymienionych w tabeli 10.1.

10.3.1. Diagnostyka laboratoryjna chorób układu podwzgórzowo-przysadkowo-tarczycowego

Badania markerów laboratoryjnych funkcji tarczycy stanowią 80% wszystkich oznaczeń hormonów wykonywanych w laboratoriach medycznych co odzwierciedla epidemiologię tej grupy chorób endokrynologicznych.

10.3.1.1. Badania podstawowego poziomu hormonów

A. Hormon tyreotropowy- (tyreotropina, TSH)

Istnienie ujemnego sprzężenia zwrotnego między stężeniem hormonów tarczycy a sekrecją TSH sprawia, że oznaczanie podstawowego stężenia tego hormonu jest jednym z najbardziej czułych wskaźników czynności tarczycy (ryc. 10.3).

Oznaczanie TSH jest stosowane jako przesiewowy test wykluczający zaburzenia czynności gruczołu tarczycowego.

Wartości referencyjne dla TSH w surowicy: 0,3- 5,0 mU/L.

Podwyższone stężenie TSH: świadczy o pierwotnej (tyreogennej) niedoczynności tarczycy (najczęściej ch. Hashimoto). Ten fakt jest wykorzystywany w badaniach przesiewowych noworodków w kierunku wrodzonej niedoczynności tarczycy wykonywanych w tzw. „suchej kropli krwi – poziom odcięcia w tych badaniach wynosi 15.0 mU/L. Wzrost TSH obserwuje się w subklinicznej niedoczynności tarczycy, oraz w przypadkach gruczolaka przysadki produkującego TSH (wtórna nadczynność tarczycy), a także w fazie zdrowienia po ciężkich chorobach.

Obniżone stężenie TSH: świadczy o pierwotnej nadczynności tarczycy lub wtórnej niedoczynności tarczycy pochodzenia przysadkowego lub podwzgórzowego (bardzo rzadka). Występuje również po przedawkowaniu tyroksyny u pacjentów leczonych z powodu niedoczynności tarczycy, u ludzi w starszym wieku i chorych w ciężkim stanie ogólnym, oraz w I trymestrze ciąży, w terapii sterydami lub dopaminą i lekami o podobnym działaniu.

B. Hormony tarczycy

Pomiary całkowitego stężenia hormonów tarczycy w surowicy są obecnie rzadko wykonywane. Wynika to z trudności interpretacji tych wyników. Stanowią one bowiem sumę stężeń tyroksyny (T4) lub trójjodotyroniny (T3) związanej z białkami surowicy i hormonu wolnego (aktywnego biologicznie). W postaci wolnej krąży we krwi tylko około 0,03% T4 i 0,3 % całkowitego T3. Tylko ta pula decyduje o stanie czynnościowym osi podwzgórzowo-tarczycowej. Nato-

miast poziom pozostałej olbrzymiej, nieczynnej biologicznie, frakcji tych hormonów związanej z białkami osocza może zmieniać się w zależności od poziomu białek wiążących: globuliny wiążącej tyroksynę (Thyroid Binding Globulin, TBG, 70% wiązania), albuminy (10%) wiązania i prealbuminy wiążącej tyroksynę (Transthyretin, thyroxin-binding prealbumin, TBPA, 20% wiązania). Zmiany poziomu tych białek są niezależne od stanu osi podwzgórzowo-tarczycowej. Dlatego diagnostyczne znaczenie ma pomiar stężenia wolnych hormonów tarczycowych:

- wolna tyroksyna (FT4), *wartości referencyjne* 9- 24 pmol/L
- wolna trijodotyronina (FT3), *wartości referencyjne* 2,2- 5,3 pmol/L

C. Autoprzeciwciała przeciwko komórkom tarczycy

- przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie- (anty-Tg). Ich poziom wzrasta w 90 % przypadków autoimmunologicznego zapalenia tarczycy typu Hashimoto. Poziom ich wzrasta również w chorobie Graves-Basedow'a (immunologiczna nadczynność tarczycy) szczególnie u chorych ze zmianami ocznymi (50% przypadków).
- przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej- anty-TPO (wcześniej określane jako przeciwciała mikrosomalne); miano tych przeciwciał wzrasta w chorobie Hashimoto (90%) i chorobie Graves-Basedow'a (70-90%).
- przeciwciała przeciwko receptorom TSH (Thyroid Stimulating Immunoglobulins, TSI), wiążąc się z receptorem TSH pobudzają czynność tarczycy. Obecność tych przeciwciał stwierdza się u 90-95% chorych na chorobę Gravesa- Basedowa w fazie nadczynności tarczycy.

D. Wskaźniki chorób nowotworowych tarczycy

- tyreoglobulina w surowicy krwi (Tg), *wartości referencyjne* <50 ng/mL. Stężenie Tg wzrasta w zróżnicowanych nowotworach tarczycy: pęcherzykowym i brodawkowym. Stężenie Tg poniżej wartości oznaczalnych (<1 ng/mL) występuje w agenezji tarczycy, po leczeniu operacyjnym zróżnicowanego raka tarczycy. Dlatego ponowne zwiększenie Tg po zabiegu tyreoidektomii z powodu raka tarczycy świadczy o istnieniu przerzutów;
- kalcytonina w surowicy krwi, *wartości referencyjne* <150 ng/L.

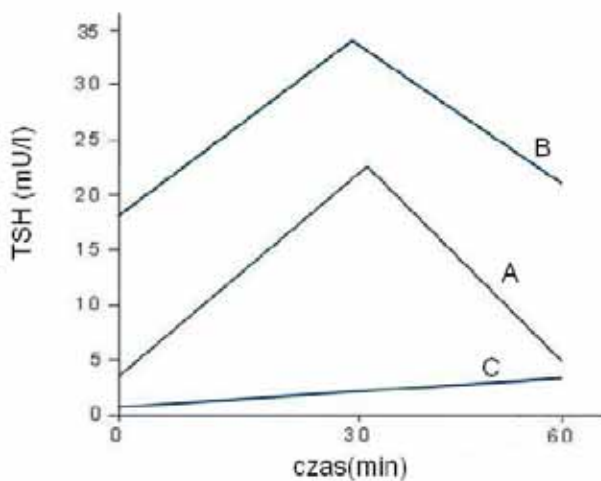
Oznaczanie kalcytoniny ma duże znaczenie diagnostyczne w rakach rdzenia- stych tarczycy wywodzących się z komórek C. Raki te są elementem dziedzicznych zespołów mnogiej gruczolakowatości endokrynnej o dominującym sposobie dziedziczenia. Po wykryciu tej postaci raka, powinny być przeprowadzone badania diagnostyczne u krewnych pacjenta.

10.3.1.2. Badania czynnościowe w chorobach tarczycy

A. Test pobudzenia TRH- test stymulacji wydzielania TSH tyreoliberyną

Test z TRH jest wykonywany rzadko w celu zróżnicowania przysadkowych i podwzgórzowych przyczyn niedoczynności tarczycy. Testu nie wolno wyko-

nywać u kobiet ciężarnych. U chorego oznacza się stężenie wyjściowe TSH w surowicy (czas 0), a następnie podaje się 200 µg TRH (trójpeptyd, pGlu-His-ProNH₂) dożylnie i krew pobiera się ponownie po 30 i 60 min. W sytuacji zachowanego mechanizmu sprzężenia zwrotnego (podwzgórze-przysadka- tarczyca) podanie TRH powoduje zwiększenie stężenia TSH do wartości przekraczających górny zakres normy. TSH wzrasta u zdrowego człowieka o około 25 mU/L w 30 min i stopniowo spada do wartości wyjściowych w 60 min (ryc. 10.5A). W pierwotnej nadczynności tarczycy przy niskim wyjściowym poziomie TSH, nie obserwuje się jego wzrostu (krzywa płaska) (ryc.10.5C). Wynika to z blokady układu podwzgórzowo- przysadkowego przez wysokie stężenia hormonów tarczycy. U chorych z niedoczynnością pierwotną tarczycy wyjściowa wartość TSH jest wysoka i w 30 min wzrost jest bardzo duży (patologicznie dodatni test stymulacji TRH) (ryc. 10.5.B). U chorych z niedoczynnością tarczycy wtórną pochodzenia przysadkowego obserwujemy patologicznie małe stężenia TSH (ryc. 10.5.C., ujemny test stymulacji TRH).



Ryc.10.5. Stężenie TSH w surowicy po podaniu TRH: w eutyreozie (A); pierwotnej niedoczynności (B) pierwotnej nadczynności oraz wtórnej niedoczynności tarczycy pochodzenia przysadkowego (C).

Natomiast przy niedoczynności pochodzenia podwzgórzowego odpowiedź może być opóźniona z najwyższymi wartościami TSH w 60 min testu.

Test stymulacji TRH stosuje się również w celu zróżnicowania hiperprolaktynemii spowodowanej gruczolakiem (*prolactinoma*) od hiperprolaktynemii czynnościowej (ryc. 10.2). W pierwszym przypadku przy wysokim poziomie wyjściowym protaktyny nie dochodzi do wzrostu jej poziomu w surowicy. W drugim obserwuje się wzrost stężenia protaktyny.

10.3.1.3. Diagnostyka laboratoryjna najczęstszych chorób tarczycy

A. Wole proste

Wolem obojętnym określa się powiększenie gruczołu tarczowego przy zachowanej prawidłowej sekrecji hormonów, bez objawów zapalenia i zezłośliwienia. Wole obojętne stanowi ponad 90% chorób tarczycy.

Głównymi przyczynami wola obojętnego są:

- niedobór jodu, który powoduje wzrost wydzielania TSH oraz aktywację miejscowych wewnątrz-tarczycowych czynników wzrostowych np. czynnika wzrostowego naskórka (EGF), insulino-podobnego czynnika wzrostu (IGF1). Następstwem jest hiperplazja tyreocytów.

Do przerostu może dochodzić w:

- okresach życia, w których istnieje zwiększone zapotrzebowanie na hormony tarczycy (pokwitanie, ciąża, laktacja, przekwitanie)
- przy spożywaniu związków wolotwórczych (tioglikozydy, tiocyjaniany, izocyjaniany w kapuście, rzepaku, rzeźusze)
- niedoborach enzymów biorących udział w syntezie i przemianie hormonów tarczycy, uwarunkowanych genetycznie.

Wszystkie te defekty prowadzą do niedoboru hormonów tarczycy. Powoduje to z kolei wzrost wydzielania TSH, który działa troficznie na komórki tarczycy.

Wartości stężeń TSH w surowicy krwi są podwyższone, a fT3 i fT4 prawidłowe lub obniżone.

U osób żyjących na obszarach znacznego niedoboru jodu wartości stężeń hormonów mogą być nieco inne. Wskutek zmniejszenia stężenia jodków wewnątrz komórek pęcherzykowych tarczycy obserwuje się kompensacyjne zwiększenie syntezy T3 w porównaniu z T4. Stwierdza się wówczas tylko nieznaczne zwiększenie TSH, wyraźne obniżenie fT4 i wzrost fT3. Wyrównanie niedoboru jodu w diecie normalizuje te zmiany.

W Polsce w 1997 wprowadzono jodowanie soli kuchennej. Podaż jodu wyraźnie wzrosła i osiągnęła wartości niemalże prawidłowe. Wśród przebadanych dzieci szkół podstawowych różnych regionów kraju częstość występowania wola zmniejszyła się z 38% w 1994 roku do 7% w 1999 roku.

B. Niedoczynność tarczycy

Niedoczynność tarczycy jest stanem, w którym w organizmie dochodzi do deficytu hormonów tarczycy. Objawy kliniczne to spowolnienie funkcji umysłowych przechodzące w letarg, u dzieci niedorozwój umysłowy, hipotonia, obrzęk śluzakowy (przerost tkanki podskórnej), obniżenie filtracji kłębkowej, hipotermia, bezpłodność.

Przyczyny niedoczynności tarczycy to:

- **Wrodzona niedoczynność tarczycy**, występuje z częstością 1 na 5000 urodzin noworodków. Odpowiednio wczesne rozpoznanie i wdrożenie leczenia całkowicie zapobiega powstawaniu ciężkich zaburzeń rozwojowych (kretynizm, niedobory wzrostu, deformacje kostne itp.). Wczesne rozpoznanie zapewniają

powszechnie badania przesiewowe noworodków. Oznaczany jest poziom TSH w „suchej kropli krwi”. Poziom powyżej 15mU/L jest wskazaniem do dokładniejszych badań i rozpoczęcia leczenia.

- Nabyta niedoczynność gruczołu tarczowego

Pierwotna niedoczynność tarczycy może być spowodowana najczęściej chorobą autoimmunologiczną (choroba Hashimoto), przewlekłym stanem zapalnym (choroba de Quervaina, rzadko), zwłóknieniem gruczołu (choroba Riedl'a), leczeniem jodem promieniotwórczym, lekami lub zabiegiem operacyjnym (*strumectomy*).

Wtórna (przysadkowa, podwzgórzowa) niedoczynność tarczycy jest spowodowana niedoczynnością przedniego płata przysadki mózgowej, lub bardzo rzadką niedoczynnością podwzgórza. Badaniem przesiewowym jest oznaczanie TSH w surowicy w warunkach podstawowych.

Tabela 10.2. Diagnostyka laboratoryjna hipotyreozy

Postać choroby	FT4	TSH	TSH po pobudzeniu TRH	Inne objawy i badania
Pierwotna niedoczynność tarczycy	↓	↑	Patologicznie dodatni (ryc. 10.5)	Wole - może być obecne
Wtórna niedoczynność tarczycy	↓	↓	Ujemny test (krzywa płaska) (ryc. 10.5)	Wole - nigdy nie występuje. Niskie poziomy ACTH, LH, FSH, GH - panhipopituitaryzm

- Utajona niedoczynność tarczycy:

Stężenia FT3 i FT4 są prawidłowe (zwykle w dolnych granicach normy).
Stężenie podstawowe TSH jest w różnym stopniu podwyższone.

C. Nadczynność tarczycy

Nadczynność tarczycy jest stanem chorobowym, indukowanym zbyt wysokim poziomem wolnych hormonów tarczycy w osoczu. Objawy kliniczne to: tachykardia, arytmia (pochodzenia nadkomorowego) i nadciśnienie, oraz pogorszenie współistniejących chorób niedokrwienych, uszkodzenie wątroby, hiperkineza, osłabienie mięśni. W krańcowych przypadkach zmiany te prowadzą do przełomu tarczycowego.

Nadczynność tarczycy może wystąpić jako:

- nadczynność tarczycy pochodzenia autoimmunologicznego- choroba Gravesa-Basedowa wywołana przez przeciwciała aktywujące przeciw receptorom TSH;
- wole guzkowe nadczynne - mięsz tarczycy wytwarza w autonomiczny sposób nadmierne ilości hormonów tarczycy. Może mieć postać pojedynczego gruczolaka lub wola wieloguzkowego;

- zatrucie hormonami tarczycy - nadmierna podaż hormonów tarczycy w celach terapeutycznych;
- przemijająca, w przebiegu podostrego zapalenia tarczycy lub towarzysząca rakowi gruczołu tarczowego i przerzutom do odległych narządów;

Badania laboratoryjne: obniżony poziom TSH (test przesiewowy), wzrost FT4 (90% przypadków). Rzadziej dochodzi do izolowanego wzrostu poziomu FT3 (tyreotoksykoza T3). Nadczynność tarczycy ma w 80% przypadków podłoże autoimmunologiczne; w surowicy występują specyficzne autoprzeciwciała (patrz 10.3.1.1.C).

Zwiększone wydalenie jodu z moczem może wskazywać na nadczynność tarczycy wywołaną nadmierną podażą tego pierwiastka.

W przypadku utajonej nadczynności tarczycy obserwuje się zmniejszenie podstawowego stężenia TSH i prawidłowe stężenia FT3 i FT4 w surowicy.

Wtórna (przysadkowa) nadczynność tarczycy (bardzo rzadko występująca), jest spowodowana gruczolakiem przysadki produkującym TSH. Rozpoznaje się ją na podstawie zwiększonego stężenia FT4, FT3 oraz prawidłowego lub zwiększonym stężeniu TSH w surowicy.

10.3.1.4. Inne badania laboratoryjne w chorobach tarczycy

W niedoczynności tarczycy dochodzi od hipercholesterolemii, wzrostu aktywności kinazy kreatynowej, poziomu kreatyniny, TBG oraz prolaktyny; poziom sodu jest obniżony.

W nadczynności tarczycy obserwuje się wzrost poziomu wapnia, globuliny wiążącej hormony płciowe, enzymu konwertującego angiotensynę, wzrost aktywności hormonów wątrobowych (AST, ALT, GGT). Doustny test tolerancji glukozy często jest upośledzony (50%). Może występować leukopenia i monocytopenia.

10.3.2. Diagnostyka laboratoryjna chorób układu podwórzowo-przysadkowo-nadnerczowego

Kora nadnerczy syntetyzuje trzy podstawowe grupy hormonów steroidowych: glukokortykoidy (kortyzol), mineralokortykoidy (aldosteron) oraz androgeny (dihydroepiandrosteron, DHEAS oraz androstendion). W związku z tym objawy nadczynności kory nadnerczy będą zależały od stopnia pobudzenia poszczególnych grup komórek syntetyzujących te sterydy. Objawy i diagnostyka zaburzeń związanych z mineralokortykoidami została omówiona w rozdz. 6. W tym rozdziale są omówione patologie układu glikokortykoidowego.

Ocena laboratoryjna czynności kory nadnerczy polega na:

- ilościowym oznaczaniu stężenia hormonów kory nadnerczy lub ich metabolitów w warunkach podstawowych,
- ilościowym oznaczeniu hormonów kory nadnerczy w testach dynamicznych w próbach obciążeniowych.

10.3.2.1. Badania podstawowego poziomu hormonów osi podwzgórzowo-nadnerczowej

A. Podstawowe stężenie kortyzolu w surowicy krwi wykazuje wyraźną zmienność dobową. Najwyższe stężenie kortyzolu obserwuje się w godzinach porannych około godz. 8.00, a najniższe późnym wieczorem. Również wydzielanie ACTH ma podobny rytm dobowy (Tabela 10.3.).

Oznaczanie stężenia ACTH w surowicy jest wykorzystane do różnicowania pierwotnej i wtórnej nadczynności kory nadnerczy. W pierwotnej nadczynności kory nadnerczy (zespole Cushinga) przy wysokim poziomie kortyzolu poziom ACTH w osoczu jest obniżony. Wtórnej nadczynności kory nadnerczy (chorobie Cushinga) wysokiemu poziomowi kortyzolu towarzyszy wzrost lub prawidłowy poziom ACTH. W przypadku ekotopowego wydzielania ACTH jego poziom jest znacznie zwiększony. Istotne jest również oznaczanie profilu dobowego kortyzolu i ACTH w surowicy. Najczęstszą przyczyną zespołu Cushinga jest gruczolak przysadki (70%), następnie ekotopowe wydzielanie ACTH (12%) oraz gruczolaki (10%) i raki (8%) nadnerczy. Bardzo rzadko występuje ekotopowe wydzielanie CRH. Długotrwałe leczenie sterydami powoduje jatrogenny zespół Cushinga. Wymienione choroby powodują utratę rytmu dobowego wydzielania tych hormonów. Podobnie dzieje się w chorobach psychicznych (choroba dwubiegunowa, stres, ciężkie choroby).

Tabela 10.3. Podstawowe poziomy hormonów osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej

Parametr	Godzina 8.00	Godzina 17.00	Godzina 24.00
Kortyzol w surowicy nmol/L	150-700	55-250	30-120
ACTH kortyzonu osoczu ng/L	< 100 < 30		
Kortyzol - wydalanie z moczem nmol/dobę	30 - 300		
17-hydroksy-kortykosteroidy*- wydalanie z moczem, mg/dobę	Mężczyźni 12 - 20 Kobiety 8 - 16		
17-keto-kortykosteroidy*- wydalanie z moczem, mg/dobę	Mężczyźni 8 - 14 Kobiety 5 - 10		

*17-OHCS odpowiadają wydalaniu kortyzolu i jego metabolitów; natomiast 17-KS odpowiadają wydalaniu androgenów nadnerczowych i ich produktów przemian. Wyniki oznaczeń kortyzolu i ACTH w osoczu w warunkach podstawowych pozwalają na wstępną diagnozę zaburzeń osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (tab. 10.4).

Tabela 10.4. Zmiany poziomów kortyzolu i ACTH w warunkach podstawowych w zaburzeniach osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej

Zaburzenie	Kortyzol	ACTH
Pierwotna nadczynność kory nadnerczy - zespół Cushinga.	↑	↓
Wtórna nadczynność kory nadnerczy z ektopowym wydzielaniem ACTH - zespół Cushinga	↑	↑
Wtórna nadczynność kory nadnerczy przysadkopochodna – choroba Cushinga	↑	↑
Pierwotna niedoczynność kory nadnerczy	↓	↑
Wtórna niedoczynność kory nadnerczy przysadkowa	↓	↓
Wtórna niedoczynność kory nadnerczy podwzgórzowa	↓	↓

Z kolei przyczyną pierwotnej przewlekłej niedoczynności kory nadnerczy (choroba Addisona, cisawica) są procesy zapalne, nowotworowe i degeneracyjne. Z reguły dochodzi jednocześnie do niedoborów aldosteronu, które powodują maksymalne pobudzenie układu renina-angiotensyna (rozdz. 6).

Wtórna przewlekła niedoczynność kory nadnerczy związana jest z wypadnięciem czynności kortykotropowej przysadki. Zwykle kojarzy się on z niedoborem innych hormonów (zespół Sheehana, choroba Glińskiego Simmondsa). W pierwszym przypadku poziom ACTH jest podwyższony, w drugim zaś niski (tab. 10.4.).

10.3.2.2. Próby czynnościowe w diagnostyce laboratoryjnej niedoczynności kory nadnerczy

A. Test stymulacji kortykoliberyną. Dożylne podanie 0.1 mg syntetycznego CRH powoduje podwyższenie stężenia ACTH i kortyzolu w surowicy krwi ludzi zdrowych. Próbkę krwi pobiera się przed podaniem oraz w 30 i 60 min po podaniu CRH.

Za prawidłową odpowiedź uważa się wzrost stężenia ACTH w 30 i 60 min. o przynajmniej 50% oraz wzrost stężenia kortyzolu w zakresie wartości referencyjnych w 60 min. przynajmniej o 50%. Test służy do różnicowania niedoczynności kory nadnerczy pochodzenia przysadkowego i podwzgórzowego. Daje również charakterystyczne wyniki w innych zaburzeniach osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (tab. 10.5).

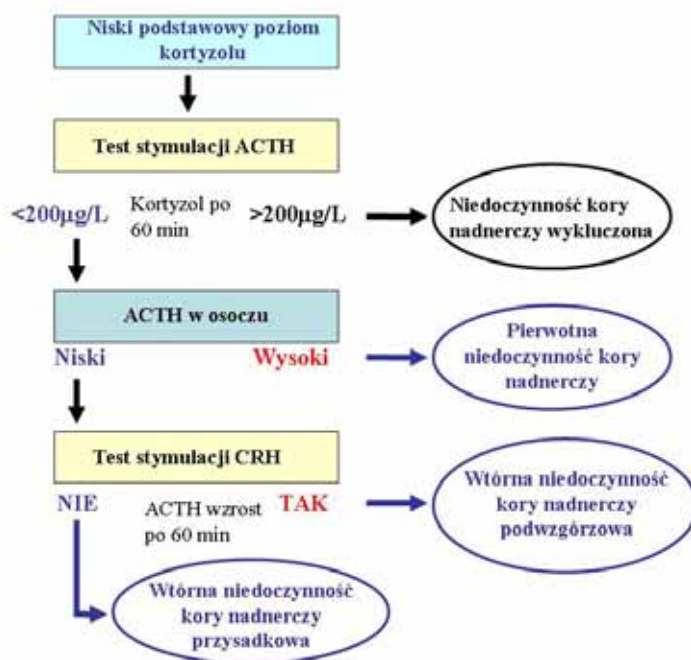
Tabela 10.5. Interpretacja testu stymulacji tyreoliberyną

Wynik testu stymulacji TRH	Zaburzenie
Niskie [ACTH] w czasie 0, brak wzrostu w czasie trwania testu	Pierwotna nadczynność kory nadnerczy
Podwyższone [ACTH] w czasie 0, nadmierny wzrost [ACTH] i [kortyzolu] po CRH	Choroba Cushinga
Podwyższone [ACTH] w czasie 0, brak wzrostu [ACTH] oraz [kortyzolu] po CRH	Ektopowe wydzielanie ACTH
Niskie [ACTH] w czasie 0, nadmierne wydzielanie w 30 i 60 minucie przy braku wzrostu [kortyzolu]	Niedoczynność podwzgórza
Niskie [ACTH] w czasie 0, brak wzrostu [ACTH]	Izolowana niedoczynność komórek produkujących ACTH
Wysokie [ACTH] w czasie 0, wzrost [ACTH] w czasie 30 i 60 minut, brak wzrostu [kortyzolu]	Niedoczynność pierwotna kory nadnerczy

B. Test stymulacji synaktenem

Synakten jest syntetycznym peptydem zawierającym aktywny fragment (1-24) ACTH. Test wykonuje się rano (8.00). Po pobraniu krwi na oznaczenie wyjściowego poziomu kortyzolu, podaje się dożylnie 0.25 mg synaktenu i 60 min później pobiera się krew do oznaczenia stężenia kortyzolu. Niedostateczny wzrost stężenia kortyzolu w surowicy świadczy o niedoczynności kory nadnerczy (pierwotnej lub wtórnej).

Test z dużą dawką synaktenu pozwala na różnicowanie pierwotnej lub wtórnej niedoczynności kory nadnerczy. Synakten podaje się domięśniowo w dawce 1 mg przez 3 dni. Stężenie kortyzolu w surowicy oznacza się w czasie „0” i w 24 godzinie po ostatnim podaniu. Prawidłowo poziom kortyzolu wzrasta o 1000-1800 nmol/L w stosunku do poziomu wyjściowego. W pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy występuje brak lub zbyt mały wzrost poziomu kortyzolu. We wtórnej niedoczynności kory nadnerczy obserwujemy w trakcie testu powolny, stopniowy wzrost stężenia kortyzolu w surowicy w stosunku do wartości wyjściowych.



Ryc. 10.6. Schemat diagnostyki przyczynowej niedoczynności kory nadnerczy

Tabela 10.6. Diagnostyka różnicowa niedoczynności kory nadnerczy

Parametr	Niedoczynność przy- sadkowa (wtórna)	Niedoczynność kory nadnerczy (pierwotna)
ACTH w osoczu	↓	↑
Kortizol w osoczu	↓	↓
17-ketosterydy w moczu	↓	↓
Test z CRH	Nie	Tak
Test z synaktenem 3-dniowy	Tak	Nie

C. Diagnostyka laboratoryjna w chorobie Addisona

Oprócz specyficznych zmian poziomu hormonów (tab. 10.4) w zespole tym występuje: hiponatremia (<130 mmol/L), hiperkalemia (>5 mmol/L), kwasica metaboliczna, hipoglikemia, odwodnienie, zanik rytmu dobowego kortyzolu i nieprawidłowy wynik stymulacji synaktenem (ryc. 10.6.).

Wtórna przewlekła niedoczynność kory nadnerczy, poza typowymi zmianami hormonalnymi (tab. 10.4, ryc. 10.6) cechuje się łżejszym przebiegiem klinicznym, dzięki zachowaniu warstwy kłębkowej kory nadnerczy. W niedomodzie wtórnej, z powodu niedoboru ACTH i melanotropiny występuje bielactwo, w pierwotnej zaś wskutek nadprodukcji melanotropiny pojawiają się przebarwienia skóry (cisawica). Z drugiej strony proces chorobowy uszkadza również komórki produkujące inne hormony (panhipopituitaryzm).

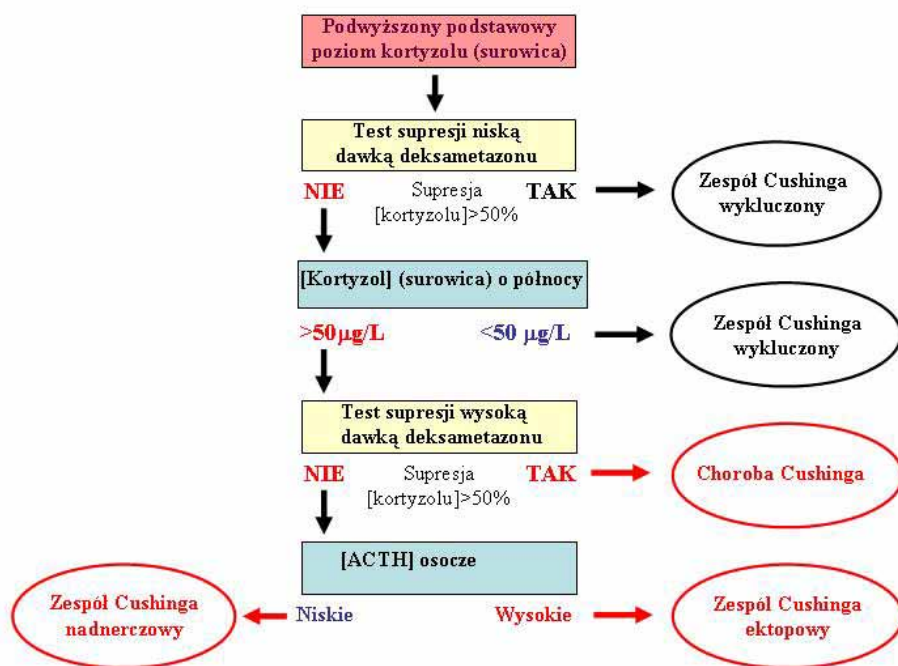
10.3.2.3. Próby czynnościowe w diagnostyce laboratoryjnej nadczynności kory nadnerczy

A. Test hamowania deksametazonem.

Deksametazon jest syntetycznym glikokortykosteroidem o wielokrotnie silniejszym i dłuższym działaniu hamującym układ podwzgórzowo - przysadkowy (wydzielanie ACTH) niż naturalny glikokortykosteroid -kortyzol.

Zahamowanie wydzielania ACTH przez deksametazon prowadzi do zmniejszenia syntezy i wydzielania kortyzolu z warstwy pasmowatej kory nadnerczy. Spadek ten jest zachowany, lecz słabiej zaznaczony, u ludzi z chorobą Cushinga (gruczolak przysadki mózgowej). Natomiast u chorych z zespołem Cushinga, spowodowanym gruczolakiem lub rakiem kory nadnerczy deksametazon podany nawet w dużej dawce, nie hamuje wydzielania kortyzolu. (ryc. 10.7.). Deksametazon nie hamuje również ekotopowego wydzielania ACTH przez inne nowotwory (rak owsianokomórkowy oskrzeli, rzadziej rakowiaki płuc, guzy trzustki i grasicy).

Próbie przeprowadza się w dwóch wariantach. W teście z małą dawką deksametazonu, poprzedniego dnia o godz. 23.00 jest podawane doustnie 2 mg tego sterydu. Rano o 8.00 pobierana jest krew na oznaczanie kortyzolu. U ludzi zdrowych dochodzi do ponad 50% obniżenia poziomu kortyzolu (ryc 10.7). Brak supresji lub nieznaczne obniżenie poziomu kortyzolu wskazuje na nadczynność kory nadnerczy (hiperkortyzolemia). W drugim przypadku wykonuje się test z dużą dawką deksametazonu w celu zróżnicowania zespołu i choroby Cushinga. Test rozpoczyna się pobraniem krwi na oznaczenie bazowego poziomu kortyzolu o 9.00, a następnie co 6 godzin podaje się doustnie 2 mg dawki deksametazonu przez 48 godzin (dawka łączna 16 mg). Próbkę krwi pobiera się w 24 i 48 godzinie testu. W tym teście 80% chorych z chorobą Cushinga, a tylko 10% z zespołem Cushinga wykazuje ponad 50% obniżenie poziomu kortyzolu.



Ryc. 10.7. Schemat diagnostyki przyczynowej nadczynności kory nadnerczy

Tabela 10.6. Diagnostyka różnicowa zespołu Cushinga

Parametr	Choroba Cushinga	Zespół Cushinga ektopowy	Zespół Cushinga nadnerczowy
[ACTH] w osoczu	↑/N	↑↑	↓
[Kortyzol] w surowicy	↑	↑	↑
17-hidroksy-sterydy w moczu	↑	↑	↑
Spadek kortyzolu po niskiej dawce deksametazonu	nie	nie	nie
Spadek kortyzolu po dużych dawkach deksametazonu	tak	nie	nie
Wzrost ACTH po podaniu CRH	tak	nie	nie

B. Badania laboratoryjne w zespole Cushinga. W zespole tym stwierdza się: hyperkortyzolemię (70% przypadków), utratę rytmu dobowego kortyzolu oraz ACTH, zwiększenie dobowego wydalania 17-hidroksy-kortykosteroidów z mo-

czem, upośledzoną tolerancję glukozy, zwiększone wydalanie wapnia z moczem i zasadowicę metaboliczną z hipokalemią.

10.3.3. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń hormonu wzrostu (GH)

10.3.3.1. Patofizjologia hormonu wzrostu

Hormon wzrostu jest syntetyzowany i wydzielany przez komórki kwasochłonne alfa przedniego płata przysadki. Podwzgórzowe czynniki: hormon uwalniający GH i somatostatyna odpowiednio zwiększają i zmniejszają syntezę i wydzielanie GH (ryc. 10.2). Wydzielanie GH jest stymulowane przez agonistów dopaminergicznych (L-DOPA, Klonidyna). U dzieci i dorosłych wyrzut GH następuje około 90 min po zaśnięciu (ryc. 10.8), oraz po podaniu L-argininy. Stres i emocje, wysiłek fizyczny, hiperglikemia, hiper i hipotyreoidyzm, bromokryptyna (antagonista DOPA), glukokortykoidy hamują wydzielanie GH. Natomiast, hipoglikemia, głodzenie, estrogeny i androgeny oraz ACTH zwiększają wydzielanie GH. Sam hormon wykazuje działanie hiperglikemizujące.

We krwi GH wiąże się ze specyficznym białkiem wiążącym hormon wzrostu (GHBP), które stanowi rezerwuar zapasowy GH i zmniejsza wahania jego poziomu wynikające z pulsacyjnego wydzielania. Jego działanie biologiczne są albo bezpośrednie lub pośrednie poprzez zwiększenie syntezy i wydzielania insulinopodobnego czynnika wzrostu – IGF-1 w wątrobie i fibroblastach. Poziom IGF-1 jest bardziej stabilny niż GH. W związku z tym wydaje się być lepszym wskaźnikiem zaburzeń wzrostu niż GH. GH wywiera bezpośrednie działanie na płytki wzrostowe przynasadowych rejonów wzrostu w kościach długich. Zwiększa on bezpośrednio różnicowanie komórek prekursorowych płytek wzrostowych i pośrednio poprzez uwrażliwienie ich na działanie IGF-1. GH wywiera bezpośrednie działanie glikogenne i lipolityczne, podczas gdy IGF-1 wywiera działanie hipoglikemizujące. Natomiast efekty stymulujące wzrost tkanek i działania mitogenne są częściowo mediowane przez IGF-1. Hormon wzrostu bezpośrednio zwiększa syntezę białek, a za pośrednictwem IGF-1 hamuje ich degradację.

Prawidłowy dobowy rytm wydzielania GH:

wartości referencyjne

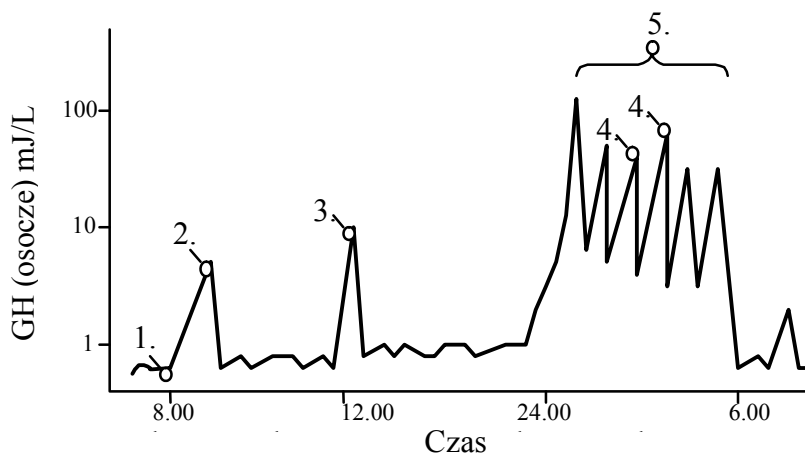
8.00 0-10 mU/L

1-2 godz. po zaśnięciu > 20 mU/L pulsacyjne wydzielanie GH

(próbki pobierane co 15-20 minut w ciągu nocy)

10.3.3.2. Badania laboratoryjne w zaburzeniach hormonu wzrostu

Pulsacyjne wydzielanie GH sprawia, że badanie jego poziomu w warunkach podstawowych ma ograniczoną wartość diagnostyczną. Podstawą diagnostyki zaburzeń GH są próby czynnościowe.



Ryc. 10.8. Zmiany stężenia GH we krwi w ciągu doby. 1, poziom podstawowy; 2, wzrost po posiłkowy, 3, reakcja na stres, wysiłek fizyczny itp. 4, 5 wyrzut po zaśnięciu i pulsacyjne wydzielanie podczas snu w przedziałach 1-2 godzinnych

A. Diagnostyka niedoboru wzrostu

Niedobory wzrostu są spowodowane różnymi chorobami uszkodzającymi przysadkę mózgową. Kojarzą się wówczas z objawami niedoczynności innych osi hormonalnych (panhipopituitarizm). Jednak, względnie częste są również izolowane niedobory hormonu wzrostu, które cechuje niska szybkość wzrostu w dzieciństwie. Istnieje wiele przyczyn niewrażliwości tkanek na GH. Wtórna niewrażliwość może być spowodowana hypotyreoidyzmem, niewydolnością nerek, zespołami złego wchłaniania, chorobą Crohn'a, wrodzonymi wadami serca, przewlekłymi stanami zapalnymi, zespołem Turner'a itp.

Testem przesiewowym w diagnostyce niedoboru wzrostu jest oznaczanie wolnego GH w moczu dobowym. Wolny GH, nie związany z białkami, o masie cząsteczkowej 22 kDa jest katabolizowany głównie w wątrobie. Niewielka część hormonu, oceniana na 0.001 do 0.01% całkowitej puli GH, wydalana jest z moczem. Stwierdzono, że do okresu dojrzewania płciowego oraz w pierwszych stadiach dojrzewania, dobowe wydalanie GH z moczem koreluje z poziomem GH w surowicy w profilu dobowym. Dla celów diagnostycznych zaleca się powtórzenie badania w trzech kolejnych dniach.

Testy stymulacji stosuje się w diagnostyce niedoborów GH, ponieważ jego podstawowy poziom u osób z niedoczynnością i u osób zdrowych może być podobny. Do stymulacji wydzielania GH stosuje się standaryzowany wysiłek fizyczny na ergometrze rowerowym, doustne podanie propranololu, L-dopa lub klonidyny, dożylną infuzję L-argininy, GHRH lub insuliny. Wszystkie testy z różną czułością wykrywają upośledzenie wydzielania GH. Zwykle stosuje się kilka testów w celu uzyskania pewnej diagnozy. Bardzo rzadko może występować niewrażliwość receptorowa tkanek na GH. W takich przypadkach kliniczne objawy niedoboru GH występują przy jego prawidłowym lub podwyższonym poziomie w osoczu.

B. Akromegalia i gigantyzm

Schorzenie to spowodowane jest mikro lub makrogruczolakiem komórek kwasochłonnych przysadki. Choroba rozwija się bardzo powoli w przedziale 5-10 lat. U dzieci wyraża się gigantyzmem. U dorosłych przerastają kości czaszki (szczeka, łuki brwiowe), kości drobne kończyn, w obrazie RTG zaznacza się poszerzenie i deformacja siodełka tureckiego, dochodzi do przerostu tkanek miękkich, częste są bóle głowy, zaburzenia widzenia, nietolerancja glukozy, nadciśnienie. Zaznaczają się objawy niedoczynności innych układów endokrynych przysadki. Zmiany te powodują znaczną śmiertelność u tych chorych. Poziomy podstawowe GH i IGF-1 w osoczu są podwyższone. Jednakże należy brać pod uwagę fakt, że u osób zdrowych możemy zmierzyć poziom GH w jego fazie wyrzutowej. Testem diagnostycznym jest test doustnego obciążenia 75g glukozy z czterokrotnym pomiarem poziomu GH. U osób zdrowych poziom GH obniża się do wartości <1 mU/L często nieoznaczalnych. Natomiast u chorych poziom GH obniża się nieznacznie, nie ulega zmianie, bądź paradoksalnie wzrasta.

10.3.4. Diagnostyka zaburzeń prolaktyny

Patofizjologiczne znaczenie mają tylko stany hiperprolaktynemii. Objawy kliniczne to oprócz typowych objawów guza tej okolicy, brak lub skąpe miesiączki, cykle bezowulacyjne, niedobór LH, mlekotok, upośledzone *libido*, hirsutyzm i trądzik. U mężczyzn występuje hipogonadyzm i *ginecomastia*, upośledzenie *libida*, rzadko mlekotok. Pierwotna hiperprolaktynemia spowodowana jest przez mikro (<10 mm) lub makrogruczolaki (>10 mm) komórek kwasochłonnych epsilon i teta przysadki mózgowej (*prolactinoma*). Kobiety chorują 6 razy częściej niż mężczyźni. Znacznie częstsze są stany prolaktynemii wtórnej spowodowane różnymi specyficznymi i niespecyficznymi czynnikami aktywującymi. Hiperprolaktynemię wtórną mogą powodować: inne gruczolaki rozwijające się w przysadce, niedoczynność tarczycy (ryc. 10.2, wzrost TRH), zespół wielotorbielowatych jajników, ziarninowe zmiany w oponach podstawy mózgu (sarkoidoza), niewydolność nerek czy też urazy czaszki. Również leki takie jak chloropromazyna i inne środki psychotropowe, antagoniści dopaminy, leki przeciwwymiotne, rezerpina, cymetydyna i estrogeny zwiększają wydzielanie PL. Fizjologiczna hiperprolaktynemia jest związana z ciążą i karmieniem piersią. Stężenia PL powyżej 5000 mU/L są patognomiczne dla *prolactinoma*. W dużych guzach mogą one osiągać poziomy rzędu 100000 mU/L. W wielu przypadkach tych guzów poziomy PL są niższe od 5000 mU/L. Wówczas istnieje wskazanie do próby stymulacji dożylnym podaniem metoklopramidu (10 mg, antagonistą dopaminy). Oznaczanie poziomu PL służy również do monitorowania leczenia *prolactinoma* bromokryptyną, cabergoliną – agonistami dopaminy. W hiperprolaktynemiach wtórnych (czynnościowych) w 30 min. PL wzrasta około pięciokrotnie. Natomiast w przypadku *prolactinoma* wzrostu PL nie obserwuje się.

11. ZABURZENIA METABOLIZMU GLUKOZY. CUKRZYCA

Dorota Bizon-Zygmańska, Andrzej Szutowicz

11.1. Definicja cukrzycy

Cukrzyca jest stanem chorobowym, charakteryzującym się przewlekłą hiperglikemią spowodowaną bezwzględnym lub względnym niedoborem insuliny. Cukrzyca jest objawem wielu jednostek chorobowych spowodowanych różnymi czynnikami i mechanizmami patogenetycznymi. Ich cechą wspólną, niezależną od przyczyny, jest wysokie, zależne od stopnia przewlekłej hiperglikemii, ryzyko wystąpienia późnych powikłań naczyniowych w postaci mikro- i makroangiopatii oraz neuropatii.

11.2. Epidemiologia

W Polsce w latach 1995-2000 wskaźnik zachorowań na cukrzycę typu 1 wynosił około 0.4% populacji osób do 29 roku życia; natomiast łączny wskaźnik zachorowań wśród ludzi dorosłych (powyżej 19 rż, głównie typ 2) wynosił 6.6%, a w populacji powyżej 70 rż 11,1%. Częstość występowania nietolerancji glukozy jest 2-3 razy większa niż cukrzycy.

Wydłużanie się średniego czasu życia, zmiany stylu życia spowodowane urbanizacją, dieta składająca się z wysoko-przetworzonych składników, zmniejszenie wysiłku fizycznego podczas pracy i wypoczynku powodują ciągły wzrost liczby chorych, szczególnie na cukrzycę typu 2. Powolny i bezobjawowy, w początkowym okresie, rozwój cukrzycy typu 2 powoduje, że około 50% przypadków pozostaje nierozpoznanych do chwili pojawienia się powikłań. Wskaźnik chorobowości w poszczególnych społecznościach różni się w zależności od rasy, nawyków żywieniowych, średniej długości życia itd. Dla przykładu częstość występowania cukrzycy typu 2 u ludzi powyżej 40 rż w obszarze krajów cywilizacji zachodniej wynosi 5-10%, w Japonii 2.3%, a w Chinach 0.7%. W subpopulacji Europejczyków z BMI powyżej 30 kg/m² częstość cukrzycy typu 2 jest 7 razy większa niż w całej populacji. W Europie dla cukrzycy typu 1 najniższa zachorowalność występuje w byłej Jugosławii - 0.022%, Francji - 0.04%, a najwyższa w Finlandii i innych krajach skandynawskich - 0.59%. Cukrzyca pojawiająca się w wieku 40 lat skraca oczekiwany okres życia o około 7 lat, a w wieku 60 lat o około 3 lata.

11.3. Mechanizmy homeostazy glukozy i jej zaburzenia

Stężenie glukozy w płynie pozakomórkowym podlega ścisłej regulacji. W stanie potrawnym, po nocnym odpoczynku glikemia w osoczu krwi wynosi

4.5-5.6 mmol/L. Po posiłku, w zależności od zawartości węglowodanów w diecie oraz jego formy i obfitości, stężenie glukozy w osoczu wzrasta do poziomu nie przekraczającego 8-10 mmol/L, a powrót do wartości wyjściowych następuje w ciągu 2-4 godzin po posiłku. Z kolei hipoglikemia może wystąpić u zdrowych osób nie wytrenowanych podczas forsownego wysiłku, długiego głodzenia lub przez oba te czynniki łącznie.

W okresie resorpcyjnym organizm wykorzystuje glukozę wchłanianą z przewodu pokarmowego. Przed nadmierną hiperglikemią zabezpiecza insulina wydzielana przez komórki beta wysepek trzustki. Jest ona syntetyzowana jako preproinsulina (pojedynczy łańcuch polipeptydowy), gromadzona w zbiornikach szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, z której po proteolitycznym odszczepieniu 23-aminokwasowego peptydu N-terminalnego powstaje proinsulina. Wiąże się to ze zmianą konformacji cząsteczki i utworzeniem wewnętrznych kowalencyjnych wiązań dwusiarczkowych. Następnie w aparacie Golgiego dochodzi do usunięcia środkowego peptydu C (31 aminokwasów). W efekcie powstaje insulina - hormon zbudowany z dwóch łańcuchów polipeptydowych: A - 21 aminokwasów i B - 30 aminokwasów, połączonych dwoma wiązaniami dwusiarczkowymi. W postaci kompleksu z jonami Zn^{2+} jest ona wraz peptydem C akumulowana w ziarnistościach wydzielniczych aparatu Golgiego.

Bodźcem do wydzielania insuliny jest wzrost stężenia ATP w komórkach beta. Dochodzi do tego w wyniku zwiększonego transportu glukozy przez insulino-niezależne transportery GLUT-2 o niskim powinowactwie do glukozy ($K_m \sim 25$ mM). Zwiększenie syntezy glukozo-6-fosforanu przez glukokinazę stymuluje szlak glikolityczny i kwasów trójkarboksylowych, a więc i syntezę ATP. Nukleotyd ten hamuje wrażliwe na ATP kanały potasowe powodując depolaryzację komórek beta i wydzielanie insuliny zakumulowanej w ich ziarnistościach wydzielniczych poprzez fuzję z błoną komórkową.

Wydzielona do krwioobiegu insulina, w tkankach od niej zależnych (mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, tkanka tłuszczowa) łączy się receptorami insulinowymi w błonie komórkowej powodując zwiększenie w niej gęstości transporterów glukozy GLUT-4 poprzez ich przemieszczenie z wnętrza komórki do błony plazmatycznej. Oprócz tego, poprzez różne drogi wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów doprowadza do szeregu zmian adaptacyjnych takich jak: zwiększenie syntezy DNA i RNA i związanej z tym zwiększonej ekspresji genów kodujących syntezę enzymów lipogenetycznych i glikolitycznych, transporterów aminokwasów i glukozy, rybosomalnej syntezy białek, a więc wykazuje aktywności anaboliczne. Hamuje również przemiany kataboliczne: proteolizę, lipolizę, ketogenezę i glukoneogenezę.

Działanie insuliny wzmagają dwa hormony insulintropowe (inkretyny). Zwiększają one wydzielanie insuliny przez komórki beta i hamują wydzielanie glukagonu z komórek alfa wysepek trzustki oraz inne mechanizmy glukogenne.

Są to:

- glukagonopodobny peptyd 1 (Glucagon-like Peptide 1, GLP-1)
- glukozozależny peptyd insulinotropowy (Glucose-dependent Insulinotropic Peptide, GIP).

Są one wydzielane przez komórki nabłonka dwunastnicy i jelita cienkiego pod wpływem wzrostu stężenia glukozy w przewodzie pokarmowym. Ich insulinotropowe działanie zaznacza się przy prawidłowych lub podwyższonych stężeniach glukozy. W związku z tym mogą one odgrywać rolę w rozwoju niektórych postaci cukrzycy typu 2. Są już dostępne leki przeciwcukrzycowe zwiększające poziom inkretyn w płynie pozakomórkowym.

Działanie hipoglikemizujące i anaboliczne insuliny jest antagonizowane przez szereg substancji biologicznie czynnych takich jak: hormony tarczycowe, sterydowe, hormon wzrostu, aminy katecholowe, glukagon czy somatostatyna. Hormony te stymulują glukoneogenezę i glikogenolizę i hamują wydzielanie insuliny. W związku z tym hiperglikemia jest częstym objawem endokrynopatii, w których dochodzi do nadmiernego wydzielania tych hormonów. Nietolerancję glukozy może również wywoływać hiperprolaktynemia oraz hiperparatyreoidyzm.

11.4. Etiologiczna klasyfikacja cukrzycy

Podane wyżej fakty wskazują, że przewlekła hiperglikemia może być objawem wielu jednostek chorobowych o różnych mechanizmach i wynikających z tego różnych podejściach terapeutycznych (patrz tabela 11.1).

11.5. Diagnostyka laboratoryjna cukrzycy

Cukrzycę oraz zaburzenia określane jako stan przedcukrzycowy rozpoznaje się na podstawie podwyższonego stężenia glukozy. Oznaczenie powinno być wykonane w osoczu krwi żyłnej w akredytowanym laboratorium, przy użyciu metody enzymatycznej spełniającej standardy jakości analitycznej.

Próbkę krwi należy pobrać do probówki zawierającej antykoagulant EDTA i w możliwie krótkim czasie dostarczyć do laboratorium (do 60 min.). Jeżeli nie jest to możliwe, krew należy pobierać do probówek zawierających EDTA oraz fluorek sodu lub jodoocetan sodu - związki hamujące glikolizę. Istnieje pogląd, że najlepszą metodą zabezpieczenia przed spadkiem stężenia glukozy jest zakwaszenie próbki krwi buforem cytrynianowym do pH 5.3-5.9.

Przy podejrzeniu cukrzycy należy wykonać następujące badania:

- glikemię przygodną – próbka krwi pobrana o dowolnej porze dnia, niezależnie od czasu jaki upłynął od ostatniego posiłku
lub

- glikemię na czczo – próbka krwi pobrana 8-14 godzin od ostatniego posiłku (zalecana),
- glikemię w 120 min. doustnego testu tolerancji glukozy (w przypadku stwierdzenia nietolerancji glukozy (tab. 11.2).

Cukrzycę rozpoznajemy, gdy:

- przy 2-krotnym badaniu glikemia na czczo jest ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L)
- glikemia w 2 godzinie po doustnym obciążeniu glukozą jest ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)
- objawy hiperglikemii i glikemia przygodna jest ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

Tabela 11.1. Typy etiologiczne i charakterystyka różnych postaci cukrzycy

Postać cukrzycy	Diagnostyka kliniczna i laboratoryjna
Cukrzyca typu 1 A. autoimmunologiczna B. „samoistna”	A. początek w dzieciństwie, od początku leczenia insuliną potrzebne do utrzymania przy życiu, przynajmniej jedno specyficzne przeciwciało obecne u 85-90% pacjentów, związana z układem HLA, skłonność do innych chorób autoimmunologicznych B. rzadko występująca, nie powiązana z układem HLA, silna komponenta dziedziczna, głównie u azjatów i afrykanów
Cukrzyca typu 2	Początek w wieku dojrzałym, związana z otyłością i brakiem aktywności fizycznej, ryzyko zachorowania rośnie z wiekiem, często ujawnia się w czasie ciąży, związana z insulinoopornością tkankową i/lub upośledzeniem wydzielania insuliny
Specyficzne typy cukrzycy: A. genetycznie uwarunkowane defekty komórek beta B. Genetyczne defekty działania insuliny C. choroby egzokrynnej części trzustki D. Endokrynopatie	MODY* 1 – czynnik transkrypcyjny jądrowy czynnik hepatocytów (HNF-4, chromosom 20) MODY 2 – glukokinaza (chromosom 7) MODY 3 – HNF-1(chromosom 12, najczęstsza, 60% MODY) MODY 4 – czynnik promoterowy insuliny-1 (chromosom 13, INF.-1) MODY – 5 HNF -1 beta (chromosom 17) MODY – 6 NeuroD1 (chromosom 2) Defekty mitochondrialnego DNA Insulinooporność typu A, mutacje receptora insuliny (leprechaunizm, zespół Rabsona-Mendenhalla), cukrzyca lipoatroficzna Zapalenia trzustki, urazy/pankreatektomia, mukowiscydoza, hemochromatoza itp. <i>Akromegalia</i> , zespół Cushinga, <i>glucagonoma</i> , <i>pheochromocytoma</i> , nadczynność tarczycy, <i>somatostatino-</i>

Postać cukrzycy	Diagnostyka kliniczna i laboratoryjna
E. Uszkodzenia toksyczne	<i>ma, aldosteronoma</i> itd. Polekowe (kwas nikotynowy, hormony tarczycy, diazoksyd, agoniści receptorów beta-adrenergicznych, tiazydy, interferon-alfa, glikokortykosterydy itp.
F. Zakażenia	Różyczka wrodzona, cytomegalia itp.
G. Rzadkie postaci o charakterze immunologicznym	Zespół „sztywnego człowieka” P-ciała przeciw receptorowi insulinowemu
H. Częściowo związana z chorobami genetycznie uwarunkowanymi	Zespół: Down’a Klinefelter’a Turner’a Wolfram’a Lawrence-Moon-Biedl’a Prader-Willy’ego Ataksja Friedreich’a Płaskawica Huntington’a Dystonia miotoniczna Porfirie
Cukrzyca ciężarnych	Rozpoczynająca się cukrzyca typu 2 Przedciążowa, nie rozpoznana cukrzyca typu 2 Cukrzyca typu 1 o powolnym przebiegu Nowe zachorowanie na typową cukrzycę typu 1

*MODY – Maturity Onset Diabetes of Youth. Istnieje więcej rzadkich defektów tego typu.

Do rozpoznania cukrzycy konieczne jest stwierdzenie dwóch nieprawidłowości lub 2- krotne stwierdzenie jednej z nich; przy oznaczaniu stężenia glukozy we krwi należy uwzględnić ewentualny wpływ czynników niezwiązanych z wykonywanym badaniem (pora ostatniego posiłku, pora dnia, wysiłek fizyczny).

Wskazania do wykonania doustnego testu tolerancji glukozy (DTTG, OGTT- Oral Glucose Tolerance Test) istnieją, gdy stwierdza się:

- cechy zespołu metabolicznego przy prawidłowej glikemii na czczo
- glikemię na czczo w zakresie 100 - 125 mg/dL (5.6- 6.9 mmol/L)
- glukozurię przy prawidłowej glikemii na czczo
- jako badanie diagnostyczne w rozpoznawaniu cukrzycy ciężarnych

Tabela 11.2. Kryteria rozpoznania cukrzycy

Oznaczenie	Stężenie glukozy w osoczu	Interpretacja
glikemia przygodna	≥ 200 mg/dL (≥ 11.1 mmol/L)	cukrzyca, jeśli obecne są objawy kliniczne: wzmożone pragnienie, wielomocz, zmniejszenie masy ciała, osłabienie.
glikemia na czczo	60-99 mg/dL (3,4-5.5 mmol/L)	prawidłowa glikemia na czczo
	100- 125 mg/dL (5.6- 6.9 mmol/L)	nieprawidłowa glikemia na czczo
	≥ 126 mg/dL (≥ 7.0 mmol/L)	cukrzyca
glikemia w 120 min. doustnego testu tolerancji glukozy	< 140 mg/dL (< 7.8 mmol/L)	prawidłowa tolerancja glukozy
	140- 199 mg/dL (7.8- 11.0 mmol/L)	nieprawidłowa tolerancja glukozy
	≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L)	cukrzyca

11.5.1. Doustny test tolerancji glukozy

Protokół przeprowadzenia DTTG obejmuje pobranie wyjściowej próbki krwi żyłnej rano (pacjent musi być na czczo 8-14 godz. po spożyciu ostatniego posiłku, po przespanej nocy). Pacjent wypija 250-300 ml roztworu zawierającego 75g glukozy w ciągu 5 min. (dzieci 1.75 g/ kg m.c., nie więcej jak 75g). Drugą próbkę krwi pobiera się w 120 min. po podaniu glukozy. Pacjent powinien przebywać w miejscu wykonywania testu i pozostawać w spoczynku. W celu ustalenia etiologicznego rozpoznania i podczas obserwacji leczenia cukrzycy wykonuje się szereg dodatkowych, badań laboratoryjnych (patrz niżej).

11.5.2. Badania przesiewowe w kierunku cukrzycy

Ze względu na dużą częstość występowania cukrzycy należy dokonać jak najwcześniejszej identyfikacji osób z tej grupy ryzyka. Badanie przesiewowe polega na dwukrotnym wykonaniu oznaczenia glukozy na czczo lub doustnego testu tolerancji glukozy. Badanie tego typu powinno być przeprowadzone u **wszystkich** ludzi powyżej 45 roku życia, a w szczególności ze wskaźnikiem

masy ciała (BMI) $>25 \text{ kg/m}^2$. W przypadku prawidłowego wyniku badanie powinno być powtarzane co 3 lata.

Badanie należy przeprowadzić w młodszym wieku i wykonywać częściej u osób z:

- BMI $>25 \text{ kg/m}^2$
- posiadających krewnych 1-stopnia z cukrzycą,
- niską aktywnością fizyczną,
- uprzednio zidentyfikowanych jako mających IFG lub IGT,
- pochodzeniem azjatyckim lub afro-karaibskim,
- zespołem wielotorbielowatych jajników,
- nadciśnieniem ($>140/90 \text{ mmHg}$)
- dyslipidemią i cholesterolem HDL $<0.9 \text{ mmol/L}$ lub triglicerydami $>2.8 \text{ mmol/L}$,
- przebytą cukrzycą ciężarnych lub rodzących dziecko o wadze powyżej 4 kg,
- obecną chorobą naczyń.

11.5.3. Cukrzyca typu 1

Rozpoznawanie cukrzycy typu 1 obejmuje:

- dokładny wywiad, badanie glikemii
- wykrywanie przeciwciał: przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego, przeciw fosfatazie tyrozynowej IA-2/ICA-512, przeciw wyspowym (cytoplazmatycznym i powierzchniowym) oraz przeciwciał przeciw własnej insulinie
- oznaczanie peptydu C
- oznaczanie genotypu HLA

Początek choroby występujący w dzieciństwie jest najczęściej ostry z szybkim narastaniem objawów. Do typowych objawów należą: wzmożone pragnienie, wielomocz, chudnięcie, pomimo nadmiernego łaknienia oraz osłabienie. W części przypadków może występować remisja. Często rozwija się kwasica ketonowa (30%), znaczna hiperglikemia (90%), w krańcowych przypadkach - śpiączka. Wymaga natychmiastowego leczenia insuliną, a nieleczona prowadzi do zgonu.

Podstawowym mechanizmem patogenetycznym powodującym powstawanie cukrzycy typu 1 i cukrzycy typu LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults) jest zniszczenie komórek beta wysp Langerhansa trzustki w wyniku toczącego się procesu autoimmunologicznego. Laboratoryjnymi markerami tego procesu są autoprzeciwciała skierowane przeciwko różnym strukturom wysp trzustkowych. Przeciwciała te pojawiają się we krwi jeszcze przed wystąpieniem klinicznych objawów cukrzycy i utrzymują się przez kilka do kilkunastu lat jej

trwania. Cukrzyca ujawnia się zwykle z chwilą zniszczenia przez nie 80-90% komórek beta.

Do oznaczanych obecnie przeciwciał należą:

- A. Przeciwciała przeciw wyspom (Islet Cells Autoantibodies, ICA) skierowane przeciwko kilku cytoplazmatycznym antygenom komórek beta wyspek trzustki. Są obecne u około 80% chorych na cukrzycę typu 1 w chwili rozpoznania choroby, następnie stopniowo zanikają proporcjonalnie do czasu trwania choroby. ICA wykrywane są mikroskopową metodą immunofluorescencji pośredniej na podstawie ich reakcji z nieutrwalonymi zamrożonymi skrawkami trzustki. Wyniki wyrażane są w umownych jednostkach JDF (Juvenile Diabetes Foundation). Dodatni wynik badania ICA większy niż 20 j. JDF oznacza duże prawdopodobieństwo rozwoju cukrzycy typu 1 w ciągu 5 lat. ICA wykrywa się również w innych chorobach autoimmunologicznych takich jak choroba trzewna, choroby tarczycy czy stany zapalne wątroby.
- B. Przeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (anty GAD), występują u 70-80% chorych na cukrzycę typu 1. Utrzymują się przez wiele lat po rozpoznaniu choroby, czego nie obserwuje się w przypadku ICA. Antygenem, przeciwko któremu skierowana jest reakcja immunologiczna jest dekarboksylaza kwasu glutaminowego (GAD), enzym charakterystyczny dla komórek beta trzustki i neuronów GABA-ergicznych mózgu. Przeciwciała te stanowią wcześnie pojawiający się marker cukrzycy typu 1. Oznaczanie poziomu przeciwciał anty GAD jest niezwykle pomocne w diagnostyce cukrzycy typu 1 u osób dorosłych. Oznacza się je metodami immunoprecypitacji ze znakowanym [^{32}S] rekombinowanym antygenem GAD.
- C. Przeciwciała przeciw fosfatazom tyrozynowym IA-2 oraz IA-2beta (phogrin) wykrywane są odpowiednio w 55-75% oraz 30-50% przypadków cukrzycy typu 1 w chwili jej rozpoznania.
- D. Autoprzeciwciała przeciwko insulinie (Insulin Auto-Antibody, IAA) stwierdza się je w momencie rozpoznania pierwszych objawów klinicznych u 90% dzieci poniżej 5 roku życia, u 70% w wieku 5-10 lat i 50% dzieci starszych. U dorosłych występują one w niskich mianach w 10-20% przypadków cukrzycy. Oznaczane są metodami immunochemicznymi. W odróżnieniu od IAA, przeciwciała przeciwko egzogennej insulinie pojawiające się w osoczu w przebiegu leczenia są przeciwinśulinowymi przeciwciałami odpornościowymi (IA).
- E. Stężenie peptydu C odzwierciedla czynność wydzielniczą komórek beta trzustki u chorych na cukrzycę. Oznaczenia te wykonuje się w celu:
 - różnicowania cukrzycy typu 1 i 2.
 - oszacowania rezerwy czynnościowej komórek beta
 - ustalenia czasu rozpoczęcia insulinoterapii u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych preparatami doustnymi

- oceny możliwości przerwania insulinoterapii wdrożonej u chorych na cukrzycę typu 2

Peptyd C wydzielają się w ilościach równomolarnych z insuliną do krwi żyły wrotnej. U osób zdrowych jego stężenie w surowicy na czczo wynosi więcej niż 0,4 µg/L, które po dożylnym podaniu glukagonu zwiększa się 3 - 5 krotnie. Peptyd ten jest bardziej odporny na proteolizę niż insulina i dlatego nadaje się do wykrywania resztkowych aktywności komórek beta. W cukrzycy typu 1 stężenie peptydu na czczo w surowicy jest mniejsze niż 0,2 µg/L i po dożylnym podaniu glukagonu pozostaje mniejsze niż 0,5 µg/L. W cukrzycy typu 2 odpowiednie wartości są wyższe.

Badania rodzinne wykazują silny związek niektórych genów z prawdopodobieństwem wystąpienia cukrzycy. Ryzyko zachorowania na cukrzycę w populacjach europejskich wynosi 0.2 - 0.4%, natomiast u krewnych chorych na cukrzycę jest ono 15 razy wyższe. W kodowanie predyspozycji do cukrzycy najbardziej zaangażowany jest znajdujący się w chromosomie 6 region 6p21 HLA (Human Leukocyte Antigen). Genetyczna predyspozycja do cukrzycy związana jest z allelami genów DRB1*04 i DRB1*03 i DQB1, oraz allelem genu DQB1*0302 oraz DQA1*0301. Najwyższe ryzyko wiąże się z haplotypem DRB1*04- DQA1*0301- DQB1*0302. Są również allele genów wywierające działanie ochronne (negatywnie skorelowane z cukrzycą) takie jak DRB1*15 czy DRB1*0602.

11.5.4. Cukrzyca typu 2

Częstość występowania cukrzycy typu 2 zwiększa się z wiekiem. W badaniu klinicznym wywiad i badanie przedmiotowe powinny szczegółowo uwzględnić czynniki ryzyka cukrzycy typu 2, takie jak ocena otyłości, obecność nadciśnienia, niedokrwiennej chorób serca i naczyń. Należy wykonać badanie okulistyczne, w celu zdiagnozowania możliwej obecności zespołu polimetabolicznego i innych chorób skojarzonych lub współistniejących. Typowe dolegliwości, to: nadmierne pragnienie, wielomocz, paradontoza, grzybice skóry i błon śluzowych, zaburzenia akomodacji wzroku, retinopatia, brak tętna na tętnicach grzbietowych stóp itp.

Rodzinne występowanie cukrzycy typu 2 jest silnie zaznaczone. Współczynnik zgodności dla bliźniąt wynosi 90%. Zachorowania na cukrzycę typu 2 w populacjach Afro-Karaibskich, Południowo-Azjatyckich, Indian-Pima w Arizonie, mieszkańców wysp Pacyfiku, są dwukrotnie częstsze niż wśród Europejczyków.

Do badań laboratoryjnych służących do diagnozowania chorych na cukrzycę typu 2 zaliczamy:

- badanie zaburzeń regulacji glikemii - hiperglikemia na czczo, oraz doustny test obciążenia glukozą
- oznaczenie poziomu insuliny na czczo

- oznaczenie stężenia peptydu C na czczo i w 6 min po obciążeniu 1 mg glukagonu, w celu ustalenia niedoboru insuliny endogennej
- zbadanie wydalania albuminy z moczem (tzw. „mikroalbuminuria)

Do oceny stanu i monitorowania leczenia pacjenta z cukrzycą powinny być używane oznaczenia parametrów lipidowych, stężenie Na/K, poziomu glikowanej hemoglobiny we krwi i poziomu fruktozaminy (glikowanej albuminy) w surowicy oraz wskaźników funkcji nerek.

11.5.5. Cukrzyca ciążowa

Jest to różnego stopnia upośledzenie tolerancji glukozy, powstające lub rozpoznawane po raz pierwszy w okresie ciąży. Jej rozwojowi sprzyja wzrost poziomu hormonów glikogennych. Może to być również rozpoczynająca się cukrzyca typu 2, istniejąca przed ciążą nierozpoznana cukrzyca typu 1 o powolnym początku (MODY). Zaburzenie występuje u 1-3% ciężarnych i przeważnie ustępuje po porodzie. Jednak u 30% kobiet po 3-5 latach ujawnia się cukrzyca typu 1 lub 2.

Podział cukrzycy ciężarnych:

1. Cukrzyca ciążowa – (GDM, Gestational Diabetes Mellitus) -

to różnego stopnia zaburzenia tolerancji glukozy lub cukrzyca które po raz pierwszy wystąpiły, bądź zostały rozpoznane podczas ciąży:

- **G1**- po raz pierwszy rozpoznana podczas ciąży, nieprawidłowa tolerancja glukozy z normoglikemią w warunkach przestrzegania diety;
- **G2**- hiperglikemia na czczo i poposiłkowa, konieczne leczenie dietą i insuliną

2. Cukrzyca przedciążowa (PGDM, Pregestational Diabetes Mellitus), jeżeli zachorowanie na cukrzycę nastąpiło przed zajściem w ciążę.

W celu rozpoznania cukrzycy u kobiet w ciąży wykonuje się dwustopniowy schemat wykrywania GDM, który obejmuje test przesiewowy i diagnostyczny.

A. Test diagnostyczny cukrzycy ciążowej:

Wstępne oznaczenie stężenia glukozy we krwi należy wykonać na początku ciąży przy pierwszej wizycie u ginekologa w celu wykrycia bezobjawowej cukrzycy przedciążowej.

Początek ciąży - glikemia na czczo:

< 95 mg/dL wynik prawidłowy

95-125 mg/dL wynik nieprawidłowy; należy wykonać doustny test tolerancji glukozy (75g glukozy-2h)

≥ 140 mg/dL - cukrzyca ciążowa

<140 mg/dL po 2 godzinach - wynik prawidłowy – jednak

w 24-28 tygodniu ciąży należy wykonać test przesiewowy

≥126 mg/dL przy dwukrotnym badaniu – cukrzyca ciążowa

B. Test przesiewowy

Badanie wykonuje się między 24 a 28 tygodniem ciąży. Pacjentka nie musi być na czczo, wypija roztwór zawierający 50 g glukozy. Pomiaru stężenia glukozy dokonuje się jednorazowo po 1 godzinie od momentu podania glukozy. Interpretacja wyników:

- < 140 mg/dL wartość prawidłowa, nie wymaga dalszej diagnostyki
- 140 - 200 mg/dL wartość nieprawidłowa, należy wykonać doustny test tolerancji glukozy (75 g glukozy - 2h)
 - < 140 mg/dL wynik prawidłowy
 - ≥ 140 mg/dL cukrzyca ciążowa
- ≥ 200 mg/dL cukrzyca ciążowa

Ciężarne z cukrzycą wymagają intensywnego nadzoru i leczenia, gdyż ich płody są zagrożone makrosomią oraz wielu innymi zaburzeniami rozwojowymi.

11.5.6. Monitorowanie leczenia cukrzycy**A. Oznaczanie glikemii w celu monitorowania leczenia cukrzycy**

Cukrzyca stanowi przykład choroby, w której współpraca lekarza i pacjenta oraz aktywna postawa chorego stanowią bezwzględny warunek skutecznej terapii. Codziennych oznaczeń stężenia glukozy we krwi pacjent dokonuje samodzielnie przy użyciu glukometru. Urządzenia tego typu działają w oparciu o metody „suchej chemii”, przy użyciu pasków testowych stanowiących podłoże dla wszystkich odczynników biorących udział w reakcjach z glukozą. Nowsze rozwiązania posługują się selektywnymi mikroelektrodami wbudowanymi w jednorazowe minikomory pomiarowe. Pacjent powinien być przeszkolony w zakresie obsługi glukometrów w placówce służby zdrowia, w której się leczy.

Pacjent powinien dążyć do uzyskania stanu glikemii jak najbardziej zbliżonego do normy.

Oznaczanie glikemii w celu monitorowania leczenia i oceny wyrównania metabolicznego cukrzycy wykonuje się w pełnej krwi włośniczkowej. Glukoza jest szybko transportowana przez błonę komórkową do wnętrza erytrocytów przez niezależny od insuliny transporter GLUT1 (K_m 1-2 mmol/L). Jednakże jej stężenie w erytrocytach jest niższe niż w osoczu wskutek przemiany do glukozo-6-fosforanu. Dlatego glukometry dają zwykle niższe wartości glikemii niż analizatory laboratoryjne mierzące poziom tego metabolitu w osoczu. Oznaczenia glukozy wykonuje się w porach dnia zależnych od aktywności chorego i przyjmowanych posiłków, kiedy oczekuje się skrajnych wartości glikemii w ciągu doby.

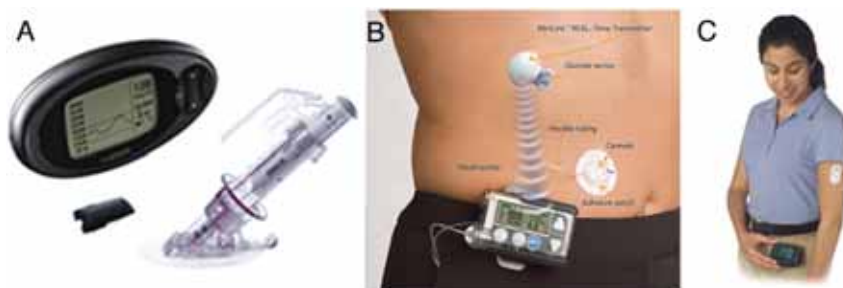
Dobowy profil glikemii obejmuje oznaczenia glukozy:

- rano na czczo,
- przed każdym głównym posiłkiem,
- 120 min po każdym głównym posiłku,
- przed snem,

- godz. 24.00,
- godz. 3.30.

Pacjent samodzielnie kontrolujący glikemię powinien prowadzić dokumentację prowadzonych pomiarów. Poza tym, jakość oznaczenia przy użyciu glukometru powinna być systematycznie kontrolowana co pół roku w placówce służby zdrowia, w której jest on leczony.

Możliwy jest ciągły pomiar poziomu glukozy za pomocą podskórnych mikrosensorów działających samodzielnie lub w sprzężeniu z pompą insulinową (ryc.11.1). Mierzą one poziom glukozy w płynie śródmiąższowym.



Ryc. 11.1 Monitorowanie glikemii w czasie rzeczywistym (A), czujnik samodzielny (B) połączony przewodowo, lub (C) połączony zdalnie z pompą insulinową)

Wprowadzenie ciągłego monitoringu glukozy jest szczególnie ważne u dzieci z cukrzycą; obniża poziom hemoglobiny A_{1c} średnio o 1% (patrz niżej) i zapobiega występowaniu epizodów hipoglikemii (11.6).

B. Oznaczanie hemoglobiny glikowanej (GHB, HbA_{1c}, glikohemoglobina)

Najlepszym wskaźnikiem odzwierciedlającym średnie stężenie glukozy we krwi w okresie 8-12 tygodni poprzedzającym oznaczenie jest hemoglobina glikowana. Glikacja jest procesem nieenzymatycznego przyłączania się cząsteczek glukozy do wolnych grup aminowych N-końcowej waliny łańcucha beta globiny. Szybkość procesu glikacji hemoglobiny jest proporcjonalna do średniego stężenia glukozy w czasie, w którym była ona ekspozycja na podwyższone stężenia glukozy. Znaczącej glikacji ulegają białka długo znajdujące się w ustroju (hemoglobina, albumina, kolagen). Stanowi to podstawę retrospektywnego monitorowania średniej glikemii u pacjenta. Hemoglobina glikowana składa się z kilku frakcji różniących się lokalizacją glikowanej grupy aminowej oraz rodzajem monosacharydu wchodzącego z nią w reakcję. Dlatego rozróżniamy HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c}. Diagnostycznie najważniejsze jest oznaczanie HbA_{1c}, której prawidłowy poziom wynosi 4-6% hemoglobiny całkowitej.

Tabela 11.3. Związek między odsetkami HbA_{1c} a średnim stężeniem glukozy w osoczu

HbA _{1c} (%)	Średnie stężenie glukozy w osoczu	
	mg/dL	mmol/L
6	135	7,5
7	170	9,4
8	205	11,4
9	240	13,3
10	275	15,3
11	310	17,2
12	345	19,2

Przy przeciętnym okresie przeżycia erytrocytów równym 120 dni, odsetek HbA_{1c} odzwierciedla średnie stężenie glukozy we krwi w nieco krótszym okresie (8-12 tygodni). Liczne badania potwierdziły tę zależność i stworzyły podstawy do prostego przeliczenia odsetka hemoglobiny glikowanej na średnie stężenie glukozy (tab. 11.3.).

Poziom HbA_{1c} u chorych na cukrzycę powinien być rutynowo kontrolowany co 3 miesiące, a u pacjentów ze stabilnym przebiegiem choroby i dobrym wyrównaniem metabolicznym co pół roku.

Materiałem do oznaczania glikowanej hemoglobiny jest pełna krew żylna pobrana do próbek z EDTA lub heparyną, albo krew włosniczkowa pobrana do specjalnych heparynizowanych kapilar i próbek zawierających odczynnik hemolizujący. Pacjent nie wymaga żadnego przygotowania przed pobraniem materiału, nie musi być na czczo, chociaż w próbkach lipemicznych wyniki oznaczeń mogą być zawyżone.

Czynniki zakłócające oznaczenie HbA_{1c}:

- w niedokrwistości hemolitycznej - skrócenie okresu życia erytrocytów, powoduje zmniejszenie odsetkowej zawartości glikowanej formy HbA₁;
- obecność we krwi nietrwałego prekursora glikohemoglobiny (formy aldiminowej, nazywanej pre-HbA₁). U osób zdrowych forma ta stanowi 5-8% całkowitej puli hemoglobiny HbA₁, a u chorych na cukrzycę odsetek ten może wynosić do 30%. W związku z tym obserwuje się zawyżone wyniki;
- hemoglobinopatie - zwiększona zawartość hemoglobiny płodowej HbF, lub genetycznych wariantów hemoglobiny takich jak HbS lub HbC;
- chemiczne modyfikacje cząsteczek hemoglobiny powstającej pod wpływem leków, przewlekłego spożywania alkoholu lub w przebiegu mocznicy powodują uzyskiwanie wyników fałszywie zawyżonych.

C. Oznaczanie fruktozaminy

Pośród glikowanych białek osocza zastosowanie diagnostyczne jako retrospektywny wskaźnik glikemii znalazła glikowana albumina. Glikowaną albuminę oznacza się jako fruktozaminę. Jest to ketoaminowa forma białka powstająca po przegrupowaniu cząsteczki utworzonej po reakcji glukozy z grupą aminową reszt lizynowych. Okres półtrwania albuminy wynosi około 14-20 dni. W

związku z tym stężenie fruktozaminy odzwierciedla średnie stężenie glukozy we krwi w czasie około 2 tygodni przed oznaczeniem.

Oznaczanie fruktozaminy powinno się wykonywać:

- w przypadku trudności oznaczania HbA_{1c}
- u kobiet ciężarnych chorych na cukrzycę,
- u pacjentów z niestabilnym przebiegiem choroby,
- po wprowadzeniu istotnych zmian w leczeniu.

Zakres wartości referencyjnych dla fruktozaminy wynosi 2.0-2.8 mmol/L.

D. Mikroalbuminuria*

Mikroalbuminurię (AER- Albumin Excretion Rate) definiuje się jako wydalanie z moczem albuminy z szybkością pomiędzy 20-200 µg/min (30-300 mg/24godz), stwierdzone 2 lub 3 krotnie w ciągu 6 miesięcy w próbce moczu ze zbiórki nocnej lub 24-godzinnej. Badanie to wprowadzono w celu wypełnienia luki pomiędzy górną granicą prawidłowego wydalania albuminy, a progiem czułości powszechnie stosowanej paskowej metody (Albustix) wykrywania białka (albuminy) w moczu, wynoszącym 200 mg/L.

Mikroalbuminuria jest wczesnym objawem nefropatii cukrzycowej. Stwierdza się ją często u chorych z cukrzycą typu 2 już w momencie rozpoznania choroby. Badanie powinno być traktowane jako przesiewowe u wszystkich chorych na cukrzycę typu 1 począwszy od 5 roku choroby, a u chorych na cukrzycę typu 2 z chwilą rozpoznania. Badanie powinno wykonywać się okresowo, co 6 miesięcy, a przy dobrej kontroli glikemii - co 12 miesięcy.

*Laboratorium oznaczając białko w moczu podczas badania ogólnego moczu wykrywa je w stężeniach powyżej 200 mg/L. Dlatego przy kontroli stanu nerek u pacjenta z cukrzycą należy dodatkowo zlecić oznaczenie „mikroalbuminurii”.

11.5.7. Ostre powikłania cukrzycy

Do ostrych powikłań zaliczamy ciężkie stany kliniczne takie, jak:

- kwasica i śpiączka ketonowa
- hipermolarna śpiączka nieketonowa
- kwasica i śpiączka mleczanowa

A. Patogeneza i badania laboratoryjne w kwasicy i śpiączce ketonowej

Hiperglikemia we krwi wywołuje bardzo znaczną diurezę osmotyczną, która powoduje utratę dużych ilości wody i elektrolitów. Wskutek tego pacjenci łatwo ulegają odwodnieniu. Dochodzi do zagęszczenia krwi, spadku ciśnienia tętniczego, a w krańcowych przypadkach do wstrząsu oligowolemicznego.

Zmniejszenie przepływu krwi przez mózg i nerki przejawia się zaburzeniami świadomości oraz skąpomoczem ze zwiększeniem „ciał azotowych” (mocznik, kreatynina, kwas moczowy) we krwi. Przy bezwzględny niedoborze insuliny, zwiększa się degradacja białek i uwalnianie aminokwasów do krwi. Wzrasta we

krwi stężenie aminokwasów glukogennych (18 aminokwasów, w tym alanina, seryna, glicyna, kwas glutaminowy i asparaginowy), które dostarczają łańcuchów węglowych w procesie glukoneogenezy. Zwiększa się wydalanie mocznika i kreatyniny (azot pozabiałkowy) z moczem, powstaje ujemny bilans azotowy oraz chudnięcie.

Niedobór insuliny jest również przyczyną zaburzeń metabolizmu tłuszczów. Dochodzi do wielokrotnego zwiększenia lipolizy i uwalniania z tkanki tłuszczowej kwasów tłuszczowych, których stężenie we krwi znacznie wzrasta. W procesie beta-oksydacji ulegają one niepełnemu katabolizmowi w wątrobie do acetoctanu, który jest redukowany do beta-hydroksymaślanu. Źródłem ketokwasów są również aminokwasy ketogenne, głównie leucyna i lizyna. Gromadząc się we krwi jako silne kwasy prowadzą one do rozwoju kwasicy metabolicznej-ketonowej, ze zwiększoną luką anionową i hipochloremią. Znaczna część acetoctanu ulega spontanicznej dekarboksylacji do acetonu, który wydalanany jest z moczem i powietrzem wydychanym. Ketokwasy są zużywane przez mózg, dla którego są one wspomagającym substratem energetycznym. Buforowanie kwasicy przez tkanki prowadzi do hiperkalemii z ujemnym bilansem potasowym, jeżeli funkcja nerek jest zachowana.

Tabela 11.4. Laboratoryjne kryteria diagnostyczne cukrzycowej kwasicy ketonowej

Parametr	Łagodna	Umiarkowana	Ciężka
glukoza w osoczu mg/dL mmol/L	>250 >13,9	>250 >13,9	≥ 400 ≥ 22,2
pH krwi tętniczej	7.25- 7.30	7.00-7.24	<7,00
stężenie HCO ₃ ⁻ w surowicy mmol/L	15-18	10-15	<10
ciała ketonowe w moczu	obecne	obecne	obecne
ciała ketonowe w surowicy	obecne	obecne	obecne
osmolalność surowicy, mOsm/kg	zmienna	zmienna	zmienna, zwiększona
luka anionowa mmol/L	>10	>12	>12
zaburzenia świadomości u pacjenta	przytomny	przytomny, zdezorientowany	śpiączka

Spośród czynników zwiększających ryzyko wystąpienia kwasicy i śpiączki ketonowej u cukrzyków do najważniejszych należą:

- zakażenia bakteryjne lub wirusowe 50%
- przerwanie lub błędy insulinoterapii 15%
- opóźnione rozpoznanie cukrzycy 8%

- ostre choroby niezakaźne (zawał serca, udar mózgu) 7%
- czynniki nieustalone 20%

B. Hiperosmolarne stany hiperglikemiczne

Stan ten, dawniej nazywany hiperosmolarną nieketonową śpiączką hiperglikemiczną, rozwija się najczęściej u osób w wieku podeszłym z cukrzycą typu 2. Względny niedobór insuliny powoduje upośledzoną utylizację glukozy w tkankach obwodowych mimo równoczesnego zwiększenia uwalniania glukozy z wątroby. Ograniczona ilość insuliny u chorych na cukrzycę typu 2 jest nadal wystarczająca do zahamowania lipolizy w tkance tłuszczowej i syntezy ketokwasów.

Tab. 11.5. Kryteria diagnostyczne nieketonowej śpiączki hiperosmolarnej

Parametr		Stężenie
stężenie glukozy w osoczu	mg/dL	>600
	mmol/L	>33,3
pH		>7,30
stężenie wodorowęglanów w surowicy	mmol/L	>15
ciała ketonowe w moczu		nieobecne lub ślad
ciała ketonowe w surowicy		nieobecne lub ślad
efektywna osmolalność surowicy	mOsm/kg wody	>320
zaburzenia świadomości, gdy osmolalność przekracza 380 mOsm/kg wody		śpiączka

Diureza osmotyczna wywołana ogromną hiperglikemią może osiągnąć maksymalną objętość rzędu 5-8 L/24godz. W wyniku odwodnienia dochodzi do zmniejszenia przepływu krwi przez nerki i przesączania kłębuszkowego. Wówczas obserwuje się podwyższone stężenie mocznika/ kreatyniny we krwi, które ustępuje po uzupełnieniu niedoboru wody. We wszystkich przypadkach molalność surowicy jest bardzo wysoka. Równowaga kwasowo zasadowa jest prawidłowa.

Narastające odwodnienie hipertoniczne powoduje zaburzenia neurologiczne, a nawet całkowitą utratę przytomności powstaje wtedy kliniczny obraz nieketonowej śpiączki hiperosmolarnej.

C. Kwasica mleczanowa

Stanowi ciężkie, obarczone dużą śmiertelnością zaburzenie metaboliczne w cukrzycy. Przyspieszenie utleniania kwasów tłuszczowych i redukcja acetooctanu powodują względny niedobór NAD, który utrudnia utlenianie mleczanu i zwiększa jego akumulację. Współistniejące z cukrzycą mikro i makroangiopatia powodują niedotlenienie tkanek obwodowych i dalszy wzrost stężenia mleczanu. Również stosowane leki (fenformina) nasilają kwasicę mleczanową poprzez hamowanie glukoneogenezy.

Badania laboratoryjne wykazują:

- glikemia prawidłowa lub umiarkowanie podwyższona
- obniżone pH krwi, stężenie zasad krwi $< 10 \text{ mmol/L}$,
- luka anionowa $> 16 \text{ mmol/L}$,
- kwas mlekowy w surowicy $>> 5 \text{ mmol/L}$,
- Na w surowicy krwi - nie zmienia się,
- K w surowicy – wzrasta,
- ketokwasy w surowicy – norma.

11.5.8. Przewlekłe powikłania cukrzycy

Nadmierna glikacja białek śródbłonna naczyń krwionośnych i białek podścieliska, przewlekły stan zapalny oraz dyslipoproteinemia towarzyszące cukrzycy powodują rozwój makro i mikroangiopatii. Zgrubienie i uszkodzenia strukturalne błony podstawnej naczyń włosowatych kłębków nerkowych i siatkówki oka są przyczyną rozwoju glomerulopatii i retinopatii cukrzycowej.

A. Nefropatia cukrzycowa

Jest drugą po ostrym zapaleniu kłębków nerkowych przyczyną schyłkowej niedomogi nerek (25-35% przypadków), która wymaga dializoterapii i przeszczepienia nerki. Rozwija się ona u 30-35% chorych z cukrzycą typu 1. Ze względu na utajony rozwój cukrzycy typu 2 uchwycenie początku nefropatii w tym zespole chorobowym jest utrudnione.

Badania laboratoryjne odgrywają istotną rolę w obserwacji poszczególnych stadiów cukrzycowego uszkodzenia nerek (ryc. 11.2).

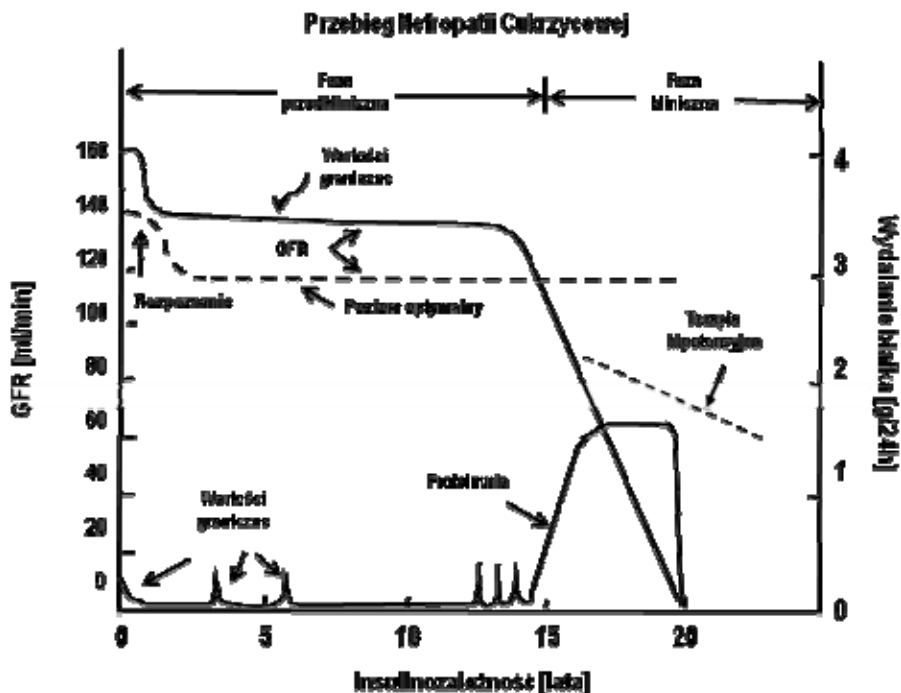
W pierwszym okresie dochodzi do hipertrofii nerek ze zwiększeniem objętości kłębków nerkowych i wzrostu filtracji kłębkowej o 20-50%, mierzonej za pomocą klirensu endogennej kreatyniny, bez mikroalbuminurii, która może pojawiać się przejściowo zarówno w warunkach spoczynkowych jak i podczas wysiłku (11.5.6.d.) (ryc. 11.2). W tym stadium zmiany są odwracalne.

W drugim okresie następuje uszkodzenie i pogrubienie błony podstawnej kapilar kłębków nerkowych z utrzymującą się hiperfiltracją i okazjonalnie pojawiającą się mikroalbuminurią. W tym stadium, właściwa kontrola glikemii, może znacznie przedłużyć okres prawidłowej funkcji kłębków nerkowych. Ciśnienie krwi pozostaje prawidłowe –wzrost 1 mm Hg/rok.

Trzecie stadium to wczesna nefropatia cukrzycowa ze stopniowo narastającą trwałą mikroalbuminurią do 300 mg/dobę; towarzyszy jej nadciśnienie wzrastające w tempie 3 mmHg/rok oraz obniżenie filtracji kłębkowej. Włączenie skutecznego leczenia antyhipertensyjnego, spowalnia narastanie uszkodzenia kłębków nerkowych (ryc. 11.2).

Czwarte stadium to pełnoobjawowa nefropatia cukrzycowa (u 35% pacjentów - po 15-25 latach) z jawnym białkomoczem, przechodzącym w zespół nerczycowy przy dobowej utracie białka powyżej 3.5 g/dobę. W tym okresie filtracja kłębkowa zmniejsza się średnio o 10 ml/min/rok przy wysokim nadciśnieniu.

Postęp choroby można zahamować obniżając ciśnienie krwi do wartości 135/85 mm Hg (ryc. 11.2).



Ryc. 11.2 Wpływ leczenia na rozwój nefropatii cukrzycowej

W piątym stadium, po 25-30 latach choroby, występuje szkliwienie kłębuszków oraz znaczny spadek filtracji kłębkowej, z obniżeniem wydalania białka z moczem i rozwojem pełnoobjawowej niewydolności nerek – mocznicy, z wysokimi, narastającymi szybko stężeniami mocznika, kreatyniny i fosforanów w surowicy i nieorganiczną kwasicią metaboliczną. W tym stadium pacjent musi być dializowany i przygotowywany do przeszczepienia nerki.

B. Retinopatia cukrzycowa

Rozwija się u 25% chorych na cukrzycę po 20-25 latach jej trwania. Cukrzyca jest przyczyną 20% wszystkich noworozpoznawanych przypadków retinopatii. Rozpoznanie retinopatii opiera się wyłącznie na badaniach okulistycznych.

11.5.9. Zespół polimetaboliczny.

Zespół polimetaboliczny jest czynnikiem znacznego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2, jak również znacznie pogarsza jej przebieg. Jest on związany z otyłością typu androidalnego i związanym z nią przewlekłym stanem zapalnym, sta-

nowiącym podłoże rozwoju dla zmian naczyniowych. Charakteryzuje się mnogością zaburzeń metabolicznych i postaci klinicznych. Do osiowych zaburzeń w tym zespole zalicza się:

- wywiad rodzinny o występowaniu cukrzycy typu 2, nadciśnienia, zawału serca i udarów mózgu w rodzinie;
- otyłość brzuszna i hiperleptynemia;
- nadciśnienie tętnicze ($>140/90$ mm Hg);
- narastająca nietolerancja glukozy prowadząca do jawnej cukrzycy;
- dyslipidemia: cholesterol całkowity >250 mg/dL (>6.5 mmol/L), cholesterol HDL <35 mg/dL (<0.9 mmol/L), triglicerydy >200 mg/dL (>2.3 mmol/L);
- kwas moczowy >8.0 mg/dL (>476 μ mol/L);
- fibrynogen >3.0 g/L
- albuminuria >20 mg/L
- hiperinsulinemia, hiperproinsulinemia

Taki fenotyp jest związany z opornością tkanek, głównie mięśni szkieletowych, na insulinę, która doprowadza do nietolerancji glukozy, a następnie do cukrzycy typu 2.

11.6. Hipoglikemia u osób z cukrzycą

Jako hipoglikemię określamy stężenie glukozy we krwi pełnej <40 mg/dL (2.2 mmol/L) lub glikemię w osoczu <45 mg/dL (2.5 mmol/L). Towarzyszą jej objawy kliniczne w postaci zlewnych potów, stanów lękowych, uczucie głodu, nudności, drżenia ciała, osłabienie, palpacji serca, nerwowości, które ustępują po podaniu glukozy. Ten zespół objawów nosi nazwę Triady Whipple'a.

Przyczyny hipoglikemii u chorych na cukrzycę:

- najczęstszą przyczyną jest przedawkowanie insuliny lub pochodnych sulfonilomocznika,
- interakcja z innymi lekami obniżającymi glikemię,
- znaczny wysiłek fizyczny,
- spożycie alkoholu (alkohol hamuje glukoneogenezę i nasila działanie doustnych leków hamujących glukoneogenezę).

11.6.1. Neuroglikopenia

Glukoza jest podstawowym i jedynym źródłem energii dla ośrodkowego układu nerwowego. Ketokwasy i mleczan chociaż są zużywane przez mózg nie są w stanie samodzielnie podtrzymać jego metabolizmu energetycznego. Wszelkie zaburzenia w dostawie glukozy do mózgu wywołujące ostre, podostre i przewlekłe zaburzenia funkcji mózgu noszą nazwę neuroglikopenii. Obok wymienionych wyżej objawów ostrych ujawniają się zmiany podostre w postaci

bólów głowy, rozdrażnienia, zaburzeń koncentracji, splątania, zaburzeń koordynacji ruchowej, drgawek, senności i śpiączki. Nawracające przewlekłe stany hipoglikemiczne, powodują ogniskowe uszkodzenia mózgu prowadzące do zespołów psychoorganicznych: zmian osobowości, ubytków pamięci, psychoz depresyjnych i demencji. Cukrzyca stanowi również jeden z czynników zwiększonego ryzyka zachorowania na chorobę Alzheimera. Ustalono, że dobre leczenie insuliną nie powinno powodować u pacjenta więcej niż jednego incydentu hipoglikemii, bez utraty przytomności, w ciągu 3-5 lat. Hipoglikemia u dzieci łatwiej niż u dorosłych wywołuje powstanie trwałych zmian psychoneurologicznych.

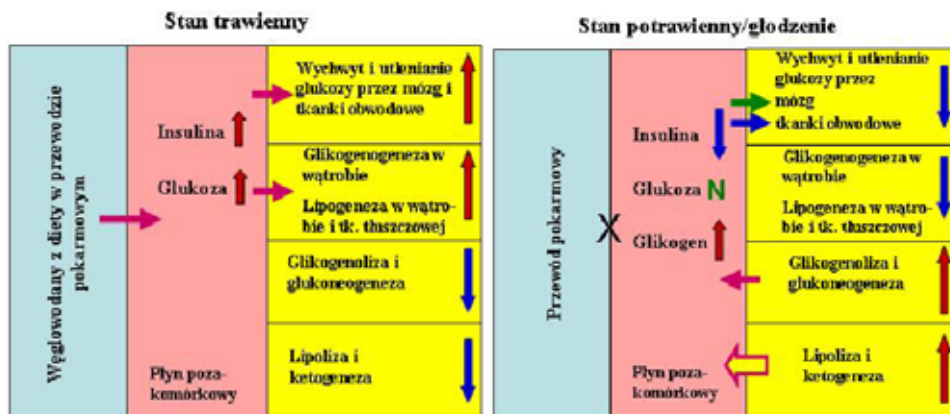
12. HIPOGLIKEMIA

Andrzej Szutowicz

12.1. Mechanizmy hipoglikemii

U zdrowych osób względnie stały poziom glukozy w płynie pozakomórkowym jest utrzymywany dzięki równowadze między jej zużyciem przez tkanki do produkcji energii i procesów syntezy, a jej dostarczaniem z przewodu pokarmowego w stanie trawiennym i syntezą w procesach glukoneogenezy i glikogenolizy w stanie potrawiennym (ryc. 12.1). W stanie trawiennym, glukoza znajdująca się w przewodzie pokarmowym jest transportowana do płynu pozakomórkowego przez obecny w nabłonku jelitowym transporter GLUT2. Wzrost stężenia glukozy powoduje jej zwiększony transport do komórek insulino-niezależnych oraz stymuluje wydzielanie insuliny z komórek beta wysepek trzustki (ryc. 12.1). Hormon ten stymuluje glikogenogenezę w wątrobie i mięśniach szkieletowych oraz lipogenezę w wątrobie i tkance tłuszczowej hamując wydzielanie glukagonu oraz procesy glukoneogenezy, glikogenolizy oraz lipolizy i ketogenezy.

W stanie potrawiennym prawidłowa glikemia w płynie pozakomórkowym jest utrzymywana dzięki zahamowaniu wydzielania insuliny i wzrostowi poziomu glukagonu. Dochodzi do aktywacji glikogenolizy w tkankach oraz glukoneogenezy w wątrobie i korze nerek. W tych warunkach mózg zużywa 20% syntetyzowanej glukozy oraz 20% pochłanianego tlenu. Tkanki obwodowe zmniejszają zużycie glukozy, a zwiększają utlenianie kwasów tłuszczowych. Niskie stężenie insuliny i wzrost szybkości utleniania kwasów tłuszczowych zwiększają syntezę acetooctanu w wątrobie. Stąd w stanach głodu, szczególnie u dzieci, może pojawiać się ketonemia przy prawidłowym lub obniżonym poziomie glukozy w płynie pozakomórkowym (ryc. 12.1).



Ryc. 12.1. Homeostaza glukozy w stanie trawiennym i potrawiennym

Nadmierna aktywacja zużycia glukozy przez tkanki, zahamowanie lub niedostateczna synteza glukozy w tkankach glukoneogenetycznych (wątroba i kora nerek) mogą powodować stany hipoglikemii (tab. 12.1).

Podobne działanie ma nieodpowiednio wysokie w stosunku do aktualnej glikemii wydzielanie insuliny lub peptydów o podobnym działaniu. Kryteria laboratoryjne i kliniczne rozpoznawania hipoglikemii zostały opisane w rozdziale 11.

Hipoglikemia wywołuje szereg reakcji kompensacyjnych w postaci:

- zależnego od aktywacji receptorów alfa-adrenergicznych zahamowania wydzielania insuliny i zwiększenia przepływu krwi przez mózg (skórcz naczyń obwodowych),
- zależnej od aktywacji receptorów beta-adrenergicznych stymulacji glikogenolizy, wydzielania glukagonu, aktywacji lipolizy, zwiększenia wyrzutu krwi przez serce (zwiększenie przepływu krwi przez mózg), inhibicji zużycia glukozy przez mięśnie,
- zależnego od aktywacji układu parasympatycznego wzrostu wydzielania soku żołądkowego i śliny.

Zaburzenia tych mechanizmów mogą powodować hipoglikemię lub pogłębiać istniejące stany hipoglikemiczne.

12.2. Klasyfikacja stanów hipoglikemii

Tabela 12.1. Klasyfikacja kliniczna stanów hipoglikemicznych

Rodzaj hipoglikemii	Przyczyna
Bez współistniejących chorób	Insulinoma Celowe przyjęcie leków hipoglikemizujących (insulina, pochodne sulfonilomocznika, repaglinid itp.) Leki, używki: alkohol etylowy, chinina
Efekt uboczny leczenia chorób	Cukrzyca: insulina, pochodne sulfonilomocznika, repaglinid (najczęstsza przyczyna hipoglikemii) Choroby autoimmunizacyjne: leki zawierające grupy sulfhydrylowe (captopril, carbimazol, D-pencillamina), hydrazyna, interferon-alfa, isoniazyd, prokainamid. Choroby wymagające leczenia: beta-blokerami, dysopiramidem i w.w. lekami Błędy w przepisywaniu, wydawaniu i przyjmowaniu leków
Wywołana przez różne choroby	Przewlekła niewydolność nerek Zastoinowa niewydolność serca Ciężka niewydolność wątroby Endokrynopatie: panhipopituitaryzm, choroba Addison'a, izolowane niedobory hormonu wzrostu lub hormonu adrenokortykotropowego, niedoczynność tarczycy Sepsa Anorexia nervosa lub głódzenie

Rodzaj hipoglikemii	Przyczyna
	Choroby autoimmunizacyjne: łysienie plackowate, trombocytopenia autoimmunologiczna, ch.Hashimoto, pierwotna marskość żółciowa, toczeń trzewny układowy, zespół Sjögrena, ch. Graves-Basedov'a, reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie wielomięśniowe. Nowotwory pozawysepkowe: guzy tkanki łącznej (fibroblastoma, włókniaki, włókniako-mięsaki, histiocytoma, mesotelioma rhabdomiosarcoma, guzy mezenhymalne przepony, trzustki i otrzewnej Guzy pochodzenia nabłonkowego: gruczolakoraki, raki przewodu pokarmowego, płuc i stercza, hepatoma, guz chromochłonny nadnerczy, guz Willmsa Nowotwory układu krwiotwórczego: przewlekła białaczka mielocytarna, limfoma, szpiczak mnogi Apudoma: rakowiaki Choroby genetycznie uwarunkowane: niektóre glikogenozy, galaktozemia, nietolerancjafruktozy, choroba syropu kłownego, tyrozynoz, kwasica propionianowa, defekty utleniania kwasów tłuszczowych*, metabolizmu karnityny, zespół Reye'a itp.

*Do bardzo rzadkich zespołów niedoboru glukozy należą wrodzone defekty transporterów glukozy. Wykryty pod koniec XX wieku niedobór transportera GLUT 1 w komórkach bariery krew-mózg powoduje ciężkie zaburzenia rozwojowe mózgu przy prawidłowym stężeniu glukozy we krwi, lecz bardzo niskim jej stężeniu (25 mg/dL) w płynie mózgowo-rdzeniowym. Prawidłowy poziom glukozy w płynie mózgowo-rdzeniowym odpowiada 2/3 jej stężenia we krwi.

12.3. Diagnostyka laboratoryjna hipoglikemii

Objawy kliniczne hipoglikemii pojawiają się przy poziomie glukozy w osoczu <45 mg/dL (<2.5 mmol/L); za krytyczne, wymagające natychmiastowej dożylniej infuzji glikozy uważa się jej stężenie w osoczu <25 mg/dL (<1.3 mmol/L). Należy zaznaczyć, że wielu pacjentów z wrodzonymi i przewlekłymi stanami hipoglikemicznymi dobrze znosi te niedobory.

Poziom glukozy we krwi należy do tzw. parametrów krytycznych spełniających kluczową rolę w diagnozowaniu przyczyn utraty przytomności u pacjentów przyjmowanych na oddziały ratunkowe. Dlatego też glukometry powinny stanowić wyposażenie tych oddziałów. Ich sprawność techniczna powinna być utrzymywana przez zespół szpitalnego laboratorium, do którego obowiązków należy również odpowiednie szkolenie personelu medycznego. Wykonanie badania przyłożkowego nie zwalnia od późniejszej weryfikacji wyniku w laboratorium w trybie pilnym.

Wykonanie oznaczenia glukozy ułatwia rozpoznanie przyczyn utraty przytomności wg schematu „COMA” (tab. 12.2).

Tabela 12.2. Glikemia a rozpoznanie różnicowe stanów utraty przytomności

Przyczyna	Postępowanie diagnostyczne
Cerebral	Badanie fizykalne i obrazowe. Przewlekła hipoglikemia może być przyczyną padaczki, zmian ogniskowych i neurodegeneracyjnych w mózgu.
Overdose	Badanie fizykalne i pomiar stężenia narkotyków i innych związków toksycznych we krwi i w moczu.
Metabolic	Śpiączka hiperglikemiczna lub hipoglikemiczna głównie u niemowląt w przebiegu cukrzycy: u niemowląt i dzieci, choroby genetycznie uwarunkowane (tab.12.1)
Alcohol	Wysoki poziom etanolu we krwi nie wyklucza współistniejącej hipoglikemii jako przyczyny pogłębiającej ten stan.

Najczęstsza przyczyną hipoglikemii wśród dorosłych jest celowe bądź przypadkowe przedawkowanie insuliny i/lub doustnych leków hipoglikemizujących przy leczeniu cukrzycy (patrz rozdział 11.7). W przypadku celowego podawania nadmiernych dawek insuliny konieczne jest wykonanie jednoczesnego oznaczenia C-peptydu i insuliny w surowicy, stwierdza się wówczas hiperinsulinemię przy nieodpowiednio niskim poziomie C-peptydu.

12.3.1. Hipoglikemie w pediatrii

W pediatrii ciężka hipoglikemia, wywołana przedawkowaniem insuliny jest przyczyną 4% zgonów wśród dzieci chorych na cukrzycę. Częstość występowania hipoglikemii wśród noworodków z prawidłową wagą urodzeniową wynosi 0.5%. U wcześniaków częstość tych incydentów jest większa. Szczególna skłonność dzieci do występowania hipoglikemii wynika z 3 razy szybszego niż u dorosłych metabolizmu glukozy w stanie potrawiennym. Sprzyja temu również mała masa mięśniowa oraz niski poziom glukagonu we krwi.

Jedną z przyczyn hipoglikemii u noworodków jest przejściowy hiperinsulinizm spowodowany źle kontrolowaną cukrzycą typu 1 u matki. Kilkadziesiąt chorób genetycznie uwarunkowanych może powodować trwałą hipoglikemię (tab. 12.1). Jedną z takich chorób jest rzadki (1:100.000 urodzeń) niedobór dehydrogenazy długo łańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA, który występuje z dużą częstością (1:16.000 urodzeń) w populacji kaszubskiej. U dzieci dotkniętych tą wadą występuje hipoglikemia potrawienna, prowadząca szybko do śmiertelnych uszkodzeń mózgu i mięśnia sercowego. Można temu zapobiec poprzez regularne, częste, bogate w glukozę posiłki, które utrzymują jej stężenie na poziomie 11 mmol/L.

12.3.2. Hipoglikemia nowotworowa

Jest związana z łagodnymi wyspiakami komórek-beta trzustki (Insulinoma) lub z guzami pochodzenia mezenchymalnego zwykle rozwijającymi się poza-otrzewnowo (tab. 12.1) W pierwszym przypadku hipoglikemia powstaje w wyniku niekontrolowanego, niezależnego od poziomu glikemii wydzielania insuliny. Guzy te są rzadkie; zachorowalność na nie wynosi 4 przypadki na milion. W stanie potrawiennym stosunek poziomu insuliny (U/mL) do glukozy w osoczu (mg/dL) jest >0.3 . Podwyższony jest również poziom peptydu C. Guzy mogą wydzielać insulinę okresowo. Wówczas w celu wykrycia hiperinsulinemii stosuje się test prowokacji 72 godzinnym głodzeniem, który w przypadku insulinoma może spowodować paradoksalny wyrzut insuliny.

W przypadku guzów poza wysepkowych hipoglikemię powodują peptydy o budowie zupełnie różnej od insuliny, nie reagujące z przeciwciałami przeciw insulinie. Guzy te najczęściej wydzielają niekompletnie uformowany insulinopodobny czynnik wzrostu-2 (IGF-2). U tych chorych na czczo przy istniejącej hipoglikemii poziom insuliny jest niski, a stosunek [insulina]/[glukoza] <0.3 . Peptyd ten hamuje wydzielanie hormonu wzrostu oraz insuliny i C-peptydu.

12.3.3. Hipoglikemia alkoholowa

Najważniejszym czynnikiem powodującym hipoglikemię po spożyciu etanolu jest zahamowanie przez ten związek, występującej w okresie potrawiennym, glukoneogenezy. Jest to spowodowane wzrostem stężenia NADH w wątrobie wskutek utleniania etanolu przez dehydrogenazy alkoholową i aldehydową. Występuje ona najczęściej u ludzi między 20-40 rokiem życia, w okresie 6-36 godz po spożyciu średnio-dużych do dużych dawek etanolu. U dzieci może wystąpić nawet po spożyciu małych dawek etanolu. Glikemia jest zwykle poniżej 2.2 mmol/L z towarzyszącą kwasicią mleczanową i ketonową (głównie z nagromadzenia beta-hydroksymaślanu) wskutek wysokiego stężenia tkankowego NADH. Hipoglikemia może być głęboka u alkoholików z marskością wątroby. Alkohol znacznie nasila również hipoglikemizujący efekt insuliny prowadząc do fatalnych następstw. Interakcja alkoholu z pochodnymi sulfonilomocznika jest słabsza.

12.3.4. Inne przypadki hipoglikemii

Szereg chorób (tab. 12.1) może u części pacjentów wywoływać stany hipoglikemii. Stanowią one wówczas element składowy innych zmian parametrów laboratoryjnych służących rozpoznaniu konkretnej choroby. Dla przykładu w zaawansowanej marskości wątroby hipoglikemia potrawienna będzie kojarzyła się z hiperbilirubinemią, hipoalbuminemią, hipergammaproteinemią, wydłużeniem czasu protrombinowego oraz deficytem szeregu białek układu krzepnięcia.

13. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

Tadeusz Pawelczyk

Poznanie sekwencji ludzkiego genomu oraz stały rozwój metod analizy kwasów nukleinowych powodują, że diagnostyka molekularna jest najbardziej dynamicznie rozwijającą się dziedziną medycyny laboratoryjnej. Obecnie techniki biologii molekularnej wykorzystywane są do diagnostyki chorób dziedzicznych, niektórych chorób nowotworowych, chorób infekcyjnych, monitorowania terapii czy analizy śladów biologicznych w ponad 1000 różnych testach genetycznych.

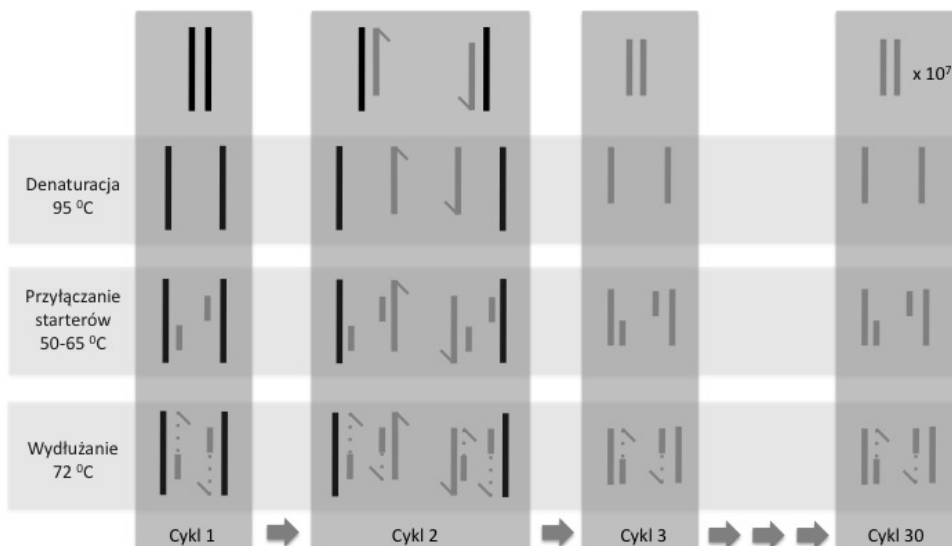
13.1. Podstawowe metody analizy kwasów nukleinowych

Osiągnięcie odpowiedniej czułości poza specyficznością jest jednym z kluczowych czynników w aplikacjach klinicznych analizy kwasów nukleinowych. W tym celu stosuje się różne techniki amplifikacji, które pozwalają zwiększyć ilość analizowanego materiału, bądź prowadzą do zwiększenia sygnału odpowiedniej sondy.

13.1.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Obecnie najczęściej stosowaną techniką pozwalającą w relatywnie krótkim czasie zwiększyć ilość materiału do badania (DNA lub cDNA) jest reakcja łańcuchowa polimerazy. W metodzie tej analizowany fragment DNA zostaje wielokrotnie syntetyzowany przez polimerazę DNA w odpowiednim roztworze buforowym zawierającym parę starterów i deoksynukleotydy. Niezbędnym warunkiem do zastosowania tej metody jest znajomość sekwencji położonych na obu końcach analizowanego fragmentu DNA, która umożliwia zaprojektowanie oligonukleotydowych starterów. Sekwencja jednego z tych oligonukleotydów jest komplementarna do początkowego fragmentu, a drugiego do końcowego fragmentu powielanego odcinka DNA (ryc. 13.1). Oligonukleotydowe startery po hybrydyzacji do odpowiednich nici DNA stanowią miejsce przyłączenia polimerazy DNA, która syntetyzuje nową nić DNA na odcinku leżącym między dwoma starterami. Z uwagi na to, iż DNA tworzy dwuniciową strukturę niezbędne jest rozdzielenie obydwu nici tak, aby startery mogły hybrydyzować z odpowiednimi sekwencjami. W tym celu DNA poddaje się denaturacji termicznej. Podczas ochładzania mieszaniny reakcyjnej następuje hybrydyzacja starterów i synteza brakującej nici DNA. Z uwagi na wysokie temperatury stosowane podczas tej metody do reakcji stosuje się polimerazy DNA wyizolowane z bakterii termofilnych zachowujących aktywność w wysokich temperaturach. Reakcja PCR prowadzona jest w urządzeniach umożliwiających precyzyjne i szybkie zmiany temperatury mieszaniny reakcyjnej. Typowa reakcja PCR składa

się z 25-35 cykli temperaturowych. Jeden cykl temperaturowy składa się z trzech kilkunastosekundowych etapów. W pierwszym etapie temperatura wzrasta do 95°C i następuje denaturacja DNA.



Ryc. 13.1. Schemat łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Kolorem czarnym oznaczono genomowe DNA, a kolorem szarym powstające fragmenty DNA. Pierwszy fragment DNA o żądanej wielkości powstaje w drugim cyklu reakcji, a od 3 cyklu dochodzi do jego amplifikacji. Ilość tych fragmentów DNA w każdym kolejnym cyklu reakcji ulega podwojeniu. Podczas reakcji PCR powstaje również niewielka ilość fragmentów dłuższych ograniczonych z jednej strony sekwencją startera tak jak to ma miejsce w cyklu pierwszym (odcinki zakończone półgrotami). Dla przejrzystości schematu powstawanie tych fragmentów pokazane jest tylko dla cyklu 1 i 2.

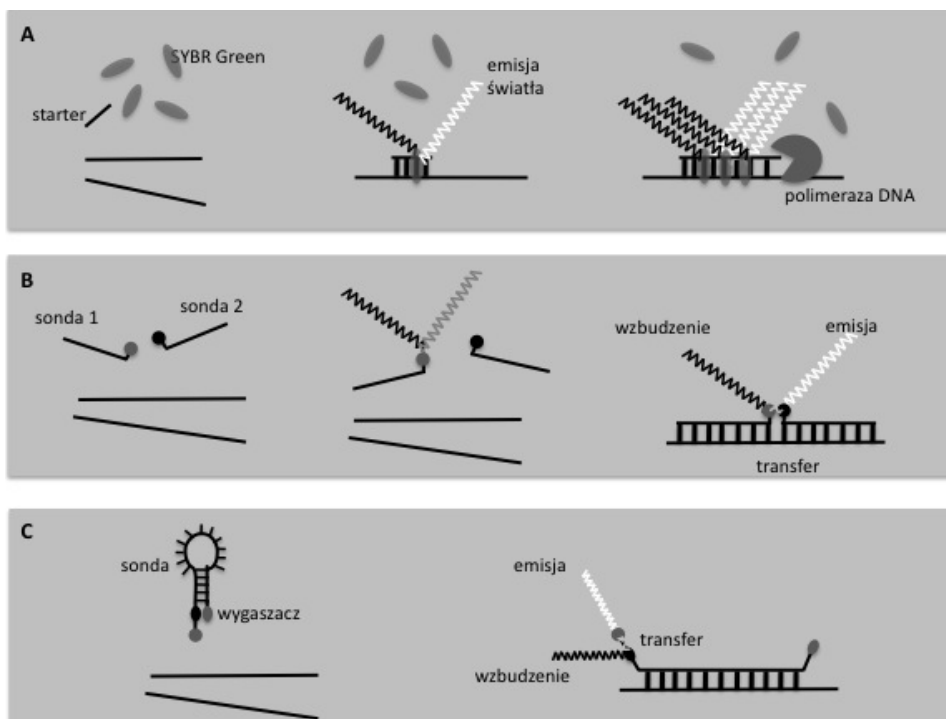
W drugim etapie temperatura zostaje obniżona do 50-65°C (zależnie od sekwencji starterów) i następuje przyłączanie starterów. W trzecim etapie w temperaturze 72 °C następuje wydłużanie nici DNA. Jeżeli wydajność każdego cyklu jest optymalna to ilość amplifikowanej sekwencji ulega podwojeniu. Przy 30 cyklach otrzymuje się zatem $\sim 10^7$ kopii amplifikowanego fragmentu DNA. Trzeba pamiętać, że wykładniczy przyrost produktu reakcji ma miejsce tylko do pewnego momentu po którym osiąga plateau (35-40 cykli).

Reakcję PCR można również wykorzystać do powielania fragmentów RNA po uprzednim przekształceniu do cDNA w reakcji z udziałem odwrotnej transkryptazy. Niektóre termostabilne polimerazy DNA (polimeraza *Tth*) posiadają również aktywność odwrotnej transkryptazy dlatego możliwe jest przeprowadzenie w jednej próbówce obydwu reakcji. Poza amplifikacją materiału na którym prowadzi się dalsze analizy reakcja PCR jest również wykorzystywana jako narzędzie analityczne. Ze względu na dużą czułość reakcję PCR stosuje się do identyfikacji patogennych mikroorganizmów oraz do wykrywania niektórych

mutacji. Przy zastosowaniu odpowiednich starterów stosunkowo łatwo i z wystarczającą czułością reakcję PCR można wykorzystać do wykrywania obecności genów fuzyjnych. Przykładem takiej analizy jest wykrywanie genu fuzyjnego *BCR-ABL* u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową. Wadą metod opartych na klasycznej reakcji PCR jest możliwość otrzymania tylko wyniku jakościowego. Ponadto w niektórych przypadkach ze względu na sekwencję analizowanego fragmentu DNA nie ma możliwości zaprojektowania wystarczająco specyficznych starterów, co eliminuje zastosowanie tej techniki analizy.

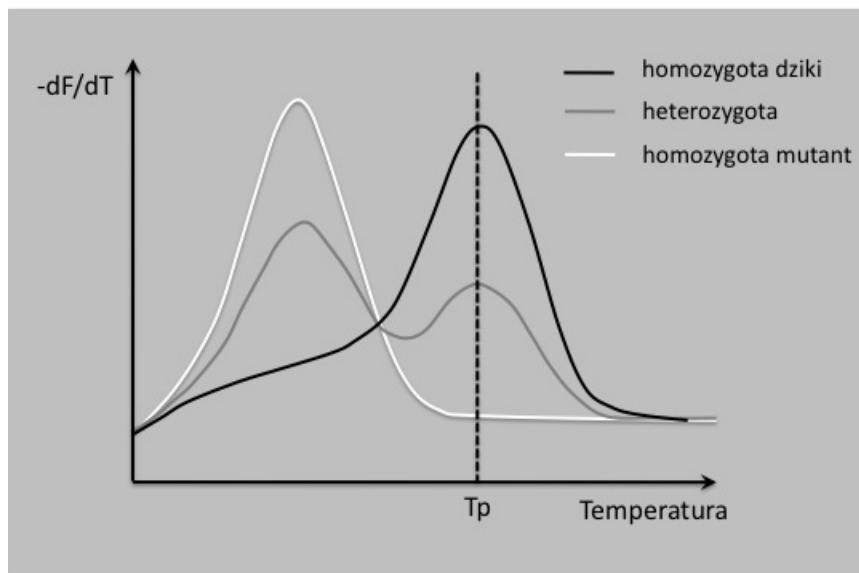
13.1.2. PCR w czasie rzeczywistym

Niektóre mankamenty klasycznej reakcji PCR zostały wyeliminowane przez zastosowanie nowej generacji sprzętu, który pozwala na monitorowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym. Ponadto zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym bardzo upraszcza analizę poprzez eliminację niektórych etapów niezbędnych w przypadku klasycznej reakcji PCR (elektroforetyczny rozdział produktów) oraz skrócenie czasu samej reakcji (30-40 minut). Największą zaletą tego typu analizy jest możliwość określenia wyjściowej ilości powielanej matrycy, a co za tym idzie uzyskanie wyników ilościowych. Dlatego PCR w czasie rzeczywistym może być wykorzystywany w monitorowaniu skuteczności zastosowanej terapii, która polega na eliminacji komórek zawierających zmieniony materiał genetyczny bądź ma na celu zniszczenie patogennych mikroorganizmów. Urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym posiadają źródło światła o odpowiedniej długości fali za pomocą którego wzbudzona zostaje fluorescencja odpowiedniej sondy oraz detektor, który odczytuje tę fluorescencję. Odpowiedni program komputerowy steruje pracą urządzenia i przetwarza dane. Mieszanina reakcyjna poza komponentami obecnymi w klasycznym PCR zawiera dodatkowo związek, który emituje fluorescencję po związaniu się z syntetyzowanym DNA. W ten sposób przyrostowi ilości DNA towarzyszy wzrost fluorescencji. W PCR w czasie rzeczywistym stosowane są również bardziej wyrafinowane sondy oligonukleotydowe, które emitują światło po związaniu się z DNA (ryc. 13.2). Sondy te mogą być tak dobrane, że hybrydują do ściśle określonych sekwencji np. miejsca z mutacją. W takim przypadku brak mutacji w analizowanym materiale będzie się manifestował brakiem świecenia. Aparaty do PCR w czasie rzeczywistym wyposażone są w źródła emitujące światło o różnych długościach fali dlatego możliwe jest stosowanie w jednej próbówce reakcyjnej kilku sond rozpoznających różne mutacje. Można również amplifikować jednocześnie kilka różnych sekwencji DNA stosując kilka par starterów. Inną zaletą PCR w czasie rzeczywistym jest możliwości wykrywania nieznanych mutacji. Jest to możliwe dzięki ciągłemu pomiarowi temperatury topnienia syntetyzowanego fragmentu DNA. Zmiana nawet jednej zasady powoduje zmianę temperatury, w której podwójna nić dysocjuje (ryc. 13.3). Analizując otrzymane wyniki można stwierdzić, czy dany materiał pochodzi od osoby z mutacją w jednym czy dwu allelach.



Ryc. 13.2 Przykład systemów detekcji stosowanych w PCR w czasie rzeczywistym. A, związek SYBR Green ma powinowactwo do sparowanych zasad. Po związaniu się do podwójnej nici DNA pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali ulega wzbudzeniu emitując fluorescencję. Ilość emitowanej fluorescencji jest proporcjonalna do ilości związanego barwnika i do ilości amplifikowanego DNA. B, system detekcji z wykorzystaniem zjawiska rezonansowe przeniesienia energii fluorescencji (FRET). W układzie tym znajdują się dwie sondy, z których jedna zawiera cząsteczkę (donor) zdolną przekazać energię wzbudzenia na inną cząsteczkę (akceptor) znajdującą się na drugiej sondzie bez emisji światła (fotonu). Aby zjawisko FRET zaszło obie cząsteczki muszą znaleźć się odpowiednio blisko siebie co zachodzi tylko wtedy gdy obie sondy są komplementarne do badanej sekwencji. Zmiana jednej zasady w obrębie miejsca kontaktu obu sond uniemożliwia transfer energii i cząsteczka akceptora nie zostaje wzbudzona do świecenia. C, system detekcji z wykorzystaniem sond oligonukleotydowych tak zaprojektowanych, że w formie niezwiązanej z DNA przyjmują kształt spinki. Sondy te na jednym końcu zawierają cząsteczkę wzbudzającą oraz fluorochrom, a na drugim końcu cząsteczkę wygaszacza. W formie niezwiązanej z DNA wygaszacz i wzbudzaczn znajdują się blisko siebie uniemożliwiając wzbudzenie fluorescencji. Dzięki odpowiedniej energii parowania zasad w sondzie, może ona zmienić swoją konformację jedynie w przypadku hybrydyzacji z 100% komplementarną sekwencją co skutkuje emisją fluorescencji. Ze względu na dużą specyficzność hybrydyzacji sondy tego typu nadają się do wykrywania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP)

Poza PCR istnieje szereg innych technik powielania fragmentów kwasów nukleinowych takich jak: łańcuchowa reakcja ligazy (LCR), system amplifikacji z użyciem odwrotnej transkryptazy i RNA polimerazy (TAS), amplifikacja z przemieszczeniem nici (SDA) oraz wiele innych, lecz żadna z tych technik nie znalazła dotychczas tak powszechnego zastosowania jak reakcja PCR.

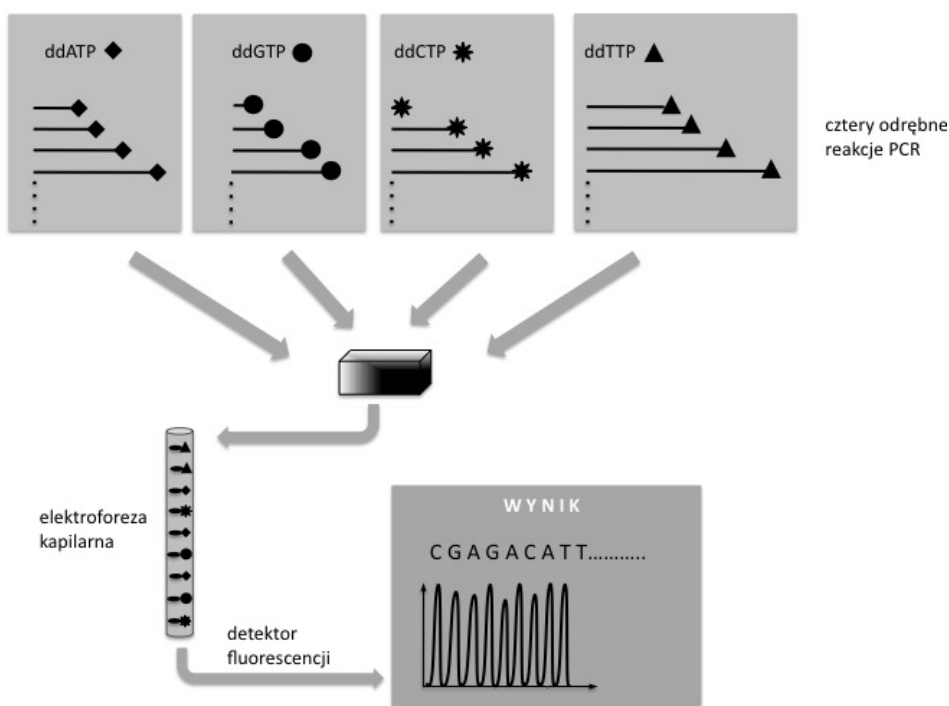


Ryc. 13.3 Analiza amplifikowanego produktu za pomocą temperatury topnienia (T_p) w aparacie do PCR w czasie rzeczywistym

13.1.3. Sekwencjonowanie DNA

Szereg chorób związanych jest z występowaniem kilku różnych mutacji w obrębie jednego genu lub są to mutacje dotąd nieznane. Technika z wyboru wykorzystywaną do wykrywania nieznanych mutacji jest sekwencjonowanie całego genu lub fragmentów kodujących (eksony). Stosowana obecnie w laboratoriach analitycznych metoda sekwencjonowania oparta jest na metodzie Sangera przy zastosowaniu zautomatyzowanych procedur, opartych na fluorescencyjnym znakowaniu DNA i odpowiednich systemach detekcji. W metodzie tej analizowany fragment DNA zostaje powielony techniką PCR z zastosowaniem dideoksynukleozydotrifosforanów (ddNTP) znakowanych fluoroforem. Dideoksynukleotydy stanowią tylko niewielki procent stężenia deoksynukleotydów i służą jako znaczniki. Każdy z ddNTP jest znakowany związkiem emitującym światło fluorescencyjne o innym kolorze. W momencie wbudowania ddNTP wydłużanie nici DNA zostaje zatrzymane, co w efekcie powoduje powstanie mieszaniny różnej długości fragmentów zakończonych związkiem emitującym światło o

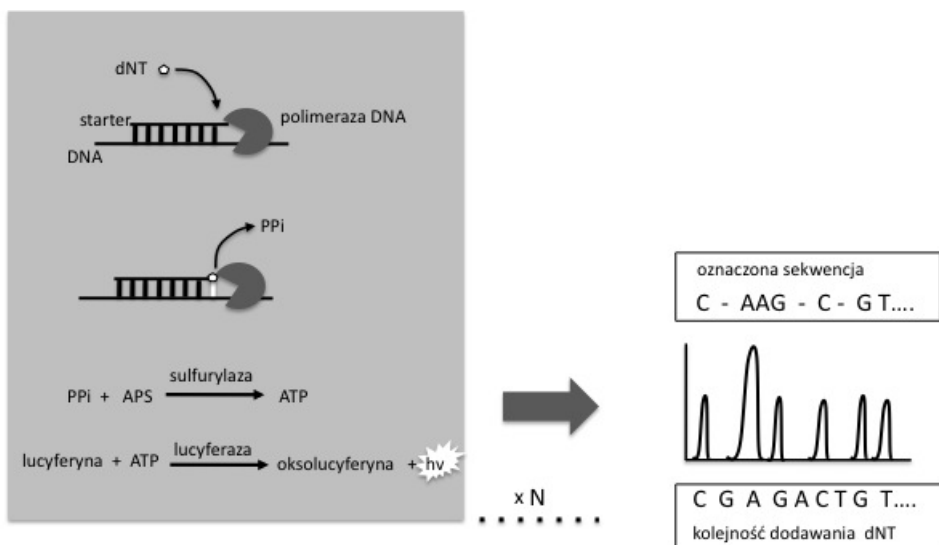
kolorze przypisanym konkretnej zasadzie. I tak wszystkie łańcuchy zakończone wbudowaniem ddATP będą świeciły np. kolorem niebieskim, ddGTP na żółto, ddTTP na czerwono, a ddCTP na zielono. Następnie fragmenty te rozdzielane są elektroforetycznie w kapilarach sekwencyjnych. Szybkość migracji zsintetyzowanych fragmentów zależy od wielkości w taki sposób, że najszybciej migruje fragment najkrótszy. Rozdzielane fragmenty przechodząc przez kapilarę trafiają na wiązkę światła laserowego, która wzbudza świecenie fluoroforu, a detektor odczytuje kolor światła (ryc. 13.4). Program komputerowy przypisuje każdemu kolorowi odpowiedni nukleotyd i przedstawia sekwencję analizowanego fragmentu w postaci szeregu kolorowych pików opisanych symbolem nukleotydu.



Ryc. 13.4. Zasada zautomatyzowanego sekwencjonowania DNA oparta na metodzie Sangera. Sekwencjonowany fragment DNA poddany jest amplifikacji w zmodyfikowanej reakcji PCR. Mieszanina reakcyjna zawiera niewielką ilość dideoksy nukleotydów (ddNT). Jednocześnie prowadzone są cztery odrębne reakcje zawierające po jednym rodzaju znakowanego ddNT. Produkty tych reakcji są łączone i poddane elektroforezie kapilarnej.

Inną metodą sekwencjonowania stosowaną do analizy dużej liczby krótkich fragmentów DNA jest pirosekwencjonowanie. W metodzie tej poza oligonukleotydowym starterem hybrydującym do pojedynczej nici DNA w środowisku reakcyjnym obecne są polimeraza DNA, sulfurylaza ATP, lucyferaza, apyryaza

oraz lucyferyna i adenozynofosfosiarczan (APS). Deoksynukleotydy dodawane są do mieszaniny reakcyjnej pojedynczo. Jeżeli dodany nukleotyd nie jest komplementarny i nie może zostać wbudowany zostaje zdegradowany przez apyrazę do monofosforanu. Wbudowaniu deoksynukleotydu w powstającą nić DNA towarzyszy uwolnienie pirofosforanu (PPi), który przy udziale APS jest przemieniany do ATP przez sulfurylaze ATP. Powstający ATP zużywany jest w reakcji utlenienia lucyferyny do oksolucyferyny czemu towarzyszy emisja światła (ryc. 13.5). Ilość kwantów emitowanego światła jest proporcjonalna do ilości wbudowanego deoksynukleotydu. Cały proces jest całkowicie zautomatyzowany, a w aparacie jednocześnie w sposób niezależny może być analizowane kilkadziesiąt próbek.



Ryc. 13.5. Zasada pirosekwencjonowania DNA. Do sekwencjonowania używa się jednoniciowych fragmentów DNA. Do mieszaniny reakcyjnej dodawane są deoksynukleotydy (dNT) pojedynczo. Po zakończeniu wszystkich etapów zaznaczonych szarym polem dodawany jest kolejny rodzaj nukleotydu i wszystkie etapy są powtarzane. Operację dodawania kolejnych nukleotydów prowadzi się tyle razy ile zasad liczy analizowany fragment DNA. Kiedy w sekwencji DNA zdarzają się takie same zasady dodany dNT wbudowywany jest w obie pozycje z wytworzeniem podwójnej porcji kwantu światła (hv), a na końcowym wyniku obserwuje się pik podwójnej wysokości.

Pirosekwencjonowanie stosowane jest do wykrywania mutacji i polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), genotypowania wirusów i bakterii oraz badaniach mitochondrialnego DNA.

13.1.4. Mapowanie restrykcyjne

Wiele z obecnie stosowanych metod analizy DNA wykorzystuje enzymy restrykcyjne. Enzymy tnące DNA (endonukleazy) izoluje się z bakterii. Dotychczas opisano ponad 400 różnych endonukleaz. Poszczególne nukleazy rozpoznają swoiste sekwencje 4-8 nukleotydów w obrębie których przecinają DNA. Dany fragment DNA można scharakteryzować za pomocą rozmieszczenia miejsc rozpoznawanych przez jeden lub kilka enzymów restrykcyjnych. Rozmieszczenie tych miejsc tworzy tzw. mapę restrykcyjną. Jeżeli w wyniku mutacji dojdzie w jakimś obszarze DNA do zaniku lub utworzenia miejsca restrykcyjnego to po trawieniu tego fragmentu DNA enzymami restrykcyjnymi i rozdziale elektroforetycznym produktów trawienia obserwuje się zmiany wielkości trawionych fragmentów.

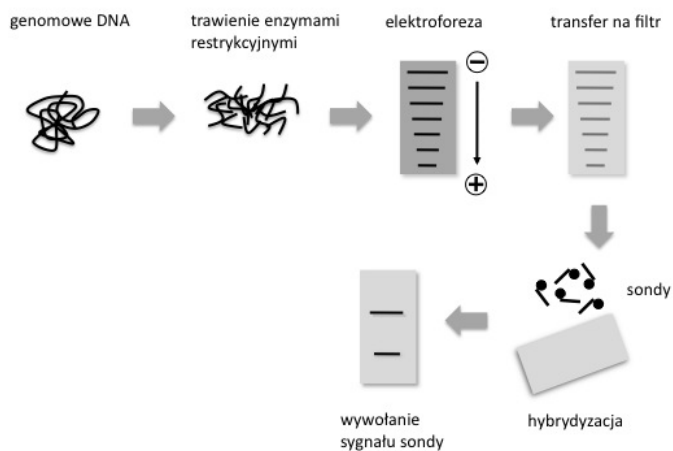
W praktyce analizowany fragment DNA jest powielany w reakcji PCR, a następnie analizowany za pomocą enzymów restrykcyjnych. Jest to tania i stosunkowo prosta metoda analizy polimorfizmu DNA. Sekwencja DNA u poszczególnych osób różni się co powoduje, że dane miejsce restrykcyjne może być obecne na jednym chromosomie, a może go brakować na drugim. W takim przypadku po trawieniu odpowiednią endonukleazą obserwuje się różne długości fragmentów restrykcyjnych (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, RFLP). Metoda PCR/RFLP wykorzystywana jest w badaniach przesiewowych, przy wykrywaniu określonych mutacji i zmian polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych.

13.1.5. Hybrydyzacja metodą Southerna

Stosowanie sond hybrydujących z wybraną sekwencją DNA jest jedną najstarszych metod badania DNA i nadal niezastąpioną w niektórych analizach zwłaszcza w diagnostyce chorób dziedzicznych warunkowanych zmianami ilości powtórzeń określonych sekwencji trinukleotydowych, np. w chorobie Huntingtona, zespole łamliwego chromosomu X czy dystrofii miotonicznej.

Analiza polega na trawieniu wyizolowanego DNA jednym lub kilkoma enzymami restrykcyjnymi i rozdziale otrzymanych fragmentów DNA za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Następnie rozdzielone fragmenty przenoszone są na błonę nylonową lub nitrocelulozową i poddane alkalicznej denaturacji (dysocjacja podwójnej nici DNA). Tak spreparowane DNA jest poddane działaniu podwyższonej temperatury ($\sim 80^{\circ}\text{C}$) lub ekspozowane na promieniowanie UV, co powoduje trwałe związanie nici DNA z błoną. Następnie błona jest inkubowana z roztworem zawierającym sondę oligonukleotydową komplementarną do badanej sekwencji. Sonda jest wyznakowana za pomocą ^{32}P co umożliwia otrzymanie obrazu na kliszy rentgenowskiej (ryc. 13.6). Metodą wypierającą pomału analizy oparte o hybrydyzację Southerna jest zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond (MLPA). Technika ta polega na ligacji specyficz-

nych sond i ich amplifikacji. Metoda ta pozwala na ocenę liczby kopii eksonów, identyfikację delecji lub duplikacji fragmentów genów.



Ryc. 13.6 Zasada hybrydyzacji Southerna. Sondy użyte do hybrydyzacji mogą być wyznakowane znacznikami fluorescencyjnymi lub radioaktywnymi najczęściej ^{32}P

13.2. Techniki stosowane w badaniach przesiewowych

Wiele procedur wstępnej oceny czy w badanym materiale genetycznym obecne są zmiany w sekwencji nukleotydowej bazuje na obserwacji ruchliwości elektroforetycznej analizowanych fragmentów kwasów nukleinowych i porównaniu jej z ruchliwością fragmentu wzorcowego o niezmięnionej sekwencji nukleotydowej. W tym celu stosuje się różne techniki elektroforetyczne. Wspólnym etapem tych analiz jest powielenie analizowanego fragmentu w reakcji PCR. Amplifikowany fragment DNA jest następnie poddany elektroforezie na żelu poliakrylamidowym w warunkach pozwalających zachować natywną strukturę DNA lub w warunkach denaturujących.

Analiza za pomocą elektroforezy w gradiencie denaturującym (DGGE) bazuje na zależnej od składu nukleotydowego zdolności denaturacji DNA w gradiencie czynnika denaturującego (temperatura, związek chemiczny). Stężenie czynnika denaturującego niezbędne do denaturacji całkowicie komplementarnych nici DNA jest inne, niż stężenie wymagane do denaturacji nici zawierających niesparowane w wyniku wystąpienia mutacji zasady.

Elektroforeza w natywnych warunkach polega na wychwyceniu różnic w szybkości migracji fragmentów DNA. Wystąpienie mutacji powoduje, że cząsteczka DNA posiada niesparowane zasady i taki heterodupleks przyjmuje nieco inną konformację przestrzenną w porównaniu do homodupleksu (struktura dwuniciowa w pełni komplementarna). Zazwyczaj wystąpienie pojedynczej mutacji jest wystarczające do zaobserwowania zmiany w ruchliwości elektroforetycznej na żelu poliakrylamidowym w natywnych warunkach.

Do stwierdzenia obecności mutacji w określonym fragmencie DNA wykorzystuje się również badanie polimorfizmu konformacji jednoniciowego DNA (SSCP). Metoda ta oparta jest na zmianie konformacji pojedynczej nici DNA w wyniku mutacji co prowadzi do zmiany ruchliwości elektroforetycznej w natywnym żelu poliakrylamidowym.

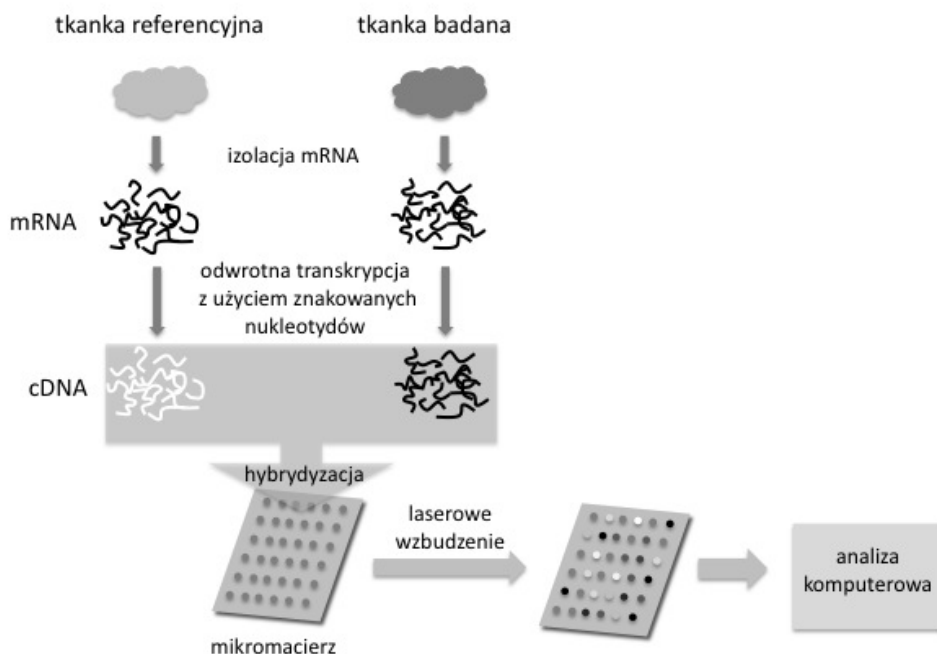
W badaniach przesiewowych używane są często enzymy restrykcyjne, gdyż wystąpienie mutacji może prowadzić do zaniku lub powstania nowego miejsca cięcia. Do poszukiwania znanej mutacji o której wiadomo, że wpływa na rodzaj i rozmieszczenie miejsc restrykcyjnych stosowana jest często metoda PCR/RFLP. W metodzie tej po amplifikacji badanego fragmentu DNA trawi się go określonym enzymem restrykcyjnym i wielkość otrzymanych fragmentów ocenia się po rozdziale elektroforetycznym. Odmianą tej metody jest technika generowania nowego miejsca restrykcyjnego (RG-PCR) w oparciu o zmiany będące następstwem mutacji. W metodzie RG-PCR (ang. restriction-site generating PCR) amplifikuje się badany fragment DNA ze starterem tak zaprojektowanym aby w miejscu wystąpienia mutacji wygenerować miejsce rozpoznawane przez jeden z enzymów restrykcyjnych.

13.2.1. Mikromacierze DNA

Każda komórka ludzka (z wyjątkiem komórek pozbawionych jąder) posiada kompletny materiał genetyczny, lecz nie wszystkie geny ulegają ekspresji w każdej komórce. Ponadto poziom ekspresji genów zależy od wielu czynników o charakterze ogólnoustrojowym lub lokalnym. Od dawna wiadomo, że stan metaboliczny czy działanie czynników wzrostu zmieniają poziom ekspresji pewnych grup genów. Bodźce odbierane przez komórkę w stanach chorobowych ulegają zmianom co prowadzi również do zmian w poziomie ekspresji genów. Kompleksowa obserwacja poziomu ekspresji dużej grupy genów może zatem posłużyć do wyodrębnienia zmian charakterystycznych dla konkretnego stanu patologicznego. Obraz zmian w kilkunastu do kilkudziesięciu genach tworzy tzw. sygnaturę danej jednostki chorobowej. Obecnie tego typu analizy mają zastosowanie głównie w chorobach nowotworowych. W oparciu o obserwowane zmiany można wyodrębnić pacjentów, u których określona terapia okazuje się skuteczna jak i osoby, u których nie odniesie skutku.

Techniką pozwalającą analizować zmiany w wielu genach jednocześnie, jak również badać poziom ekspresji dużych grup genów, są mikromacierze DNA. Mikromacierz jest to zbiór fragmentów DNA związanych w sposób uporządko-

wany z podłożem (płytką szklaną lub plastikową). Obecnie większość używanych mikromacierzy zawiera sondy oligonukleotydowe komplementarne do badanych sekwencji. Ilość sond na jednej płytce różni się w zależności od przeznaczenia. Mikromacierze o niskiej gęstości zawierają od kilkudziesięciu do kilkunastu tysięcy oligonukleotydów umieszczonych na powierzchni kilku cm². Mikromacierze wysokiej gęstości na powierzchni o zbliżonej wielkości zawierają kilkaset tysięcy do prawie dwóch milionów sond. Badanie z wykorzystaniem mikromacierzy składa się z kilku etapów (ryc. 13.7).



Ryc. 13.7 Etapy analizy ekspresji grupy genów za pomocą mikromacierzy DNA

W pierwszym etapie zostaje wyizolowany materiał genetyczny, który ma być analizowany. Następnie, w zależności od rodzaju badania jest on odpowiednio preparowany. W przypadku badania poziomu ekspresji genów wyizolowane RNA zostaje przekształcone w reakcji odwrotnej transkrypcji do cDNA. W reakcji tej stosowane są nukleotydy wyznakowane znacznikiem fluorescencyjnym świecącym określonym kolorem. Najczęściej do wyznakowania materiału wyizolowanego z tkanki patologicznej stosuje się kolor czerwony. Do analizy potrzebny jest również materiał referencyjny, czyli w tym przypadku cDNA pochodzące z takiej samej tkanki ale zdrowej, który zostaje wyznakowany np. kolorem zielonym. Otrzymane dwie pule wyznakowanego cDNA zostają zmieszane i poddane hybrydyzacji z mikromacierzą. Następnie mikromacierz zostaje odczytana w czytniku laserowym, a otrzymane dane przetworzone przez pro-

gram komputerowy. Obraz z czytnika składa się ze zbioru kolorowych punktów. Niektóre są zielone lub czerwone, a inne w kolorach pośrednich. Punkty świecące na zielono oznaczają sondy dla genów, których ekspresja w tkance patologicznej jest obniżona, natomiast sondy świecące na czerwono wskazują geny, których ekspresja uległa zwiększeniu w stosunku do tkanki normalnej. Interpretacja otrzymanych danych opiera się na analizie prowadzonej z zastosowaniem odpowiednich programów komputerowych.

Poza analizą ekspresji genów mikromacierze obecnie wykorzystywane są do genotypowania polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP), jednoczesnej analizy dużej liczby mutacji punktowych oraz wykrywania mikrodelekcji i mikroduplikacji.

13.3. Postępowanie z materiałem do badań molekularnych

DNA jest cząsteczką stosunkowo trwałą, dlatego materiał biologiczny pobrany do badań DNA nie wymaga specjalnych warunków przechowywania. W związku z tym, że każda komórka organizmu posiada taką samą informację genetyczną najczęściej DNA do badań izolowany jest z leukocytów krwi obwodowej. W tym celu kilka mililitrów krwi obwodowej pobiera się do probówki zawierającej EDTA o pH 8 i po szczelnym zamknięciu dobrze miesza. Należy pamiętać, że niektóre związki są silnymi inhibitorami polimerazy DNA. Należy do nich heparyna oraz hem, dlatego należy unikać hemolizy krwinek czerwonych oraz stosowania heparyny jako antykoagulantu. Pełną krew można przechowywać w temperaturze 4°C, lecz w okresie 48 godzin powinny zostać z niej wyizolowane leukocyty. Osad leukocytów, z których izolowane jest DNA można przechowywać w -80°C przez wiele miesięcy. W przypadku badań w kierunku chorób dziedzicznych częstą praktyką jest pobranie kropli krwi na bibułę, która po wysuszeniu może być przetrzymywana w temperaturze pokojowej przez kilka dni. DNA do badań można również izolować z materiału archiwalnego tj. tkanek przechowywanych w bloczkach parafinowych lub formalinie. Specjalne środki ostrożności należy zachować przy pobieraniu materiału na badania wirusologiczne lub bakteriologiczne. W takim przypadku materiał, którym może być krew lub inne płyny ustrojowe należy pobierać przy zachowaniu sterylności. Pobrany materiał w sterylnych pojemnikach musi być przechowywany w stanie zamrożonym. Ze względu na bardzo wysoką czułość reakcji PCR, która coraz częściej stanowi podstawowy element procedur analitycznych, należy szczególną uwagę zwracać na niebezpieczeństwo kontaminacji badanego materiału. Przy nieprzestrzeganiu odpowiednich procedur może się zdarzyć, że złuszczone naskórek obecny w drobinach kurzu może być źródłem kontaminacji np. wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV).

RNA jest cząsteczką bardzo nietrwałą, szybko ulegającą degradacji dlatego przy pobieraniu i przechowywaniu materiału, z którego ma być izolowane RNA należy przestrzegać odpowiednich procedur. Nietrwałość RNA w znacznej mie-

rze wynika z podatności na degradację przez RNazy. Enzymy te są z kolei bardzo trwałymi białkami enzymatycznymi obecnymi powszechnie w naszym otoczeniu. Znajduje się we wszystkich wydzielinach ustrojowych, dlatego pot z ludzkich rąk jest przyczyną obecności tego enzymu na meblach i naczyniach laboratoryjnych. Aby zabezpieczyć RNA przed degradacją należy pobraną tkankę zamrozić w ciekłym azocie. Przyjmuje się, że materiał na badanie RNA powinien zostać zamrożony w czasie 20 minut od pobrania. Wyjątkiem jest krew, którą można przechowywać w 4°C przez okres 48 godzin. Najlepszym sposobem przechowywania zamrożonej tkanki jest trzymanie jej w specjalnych pojemnikach z ciekłym azotem, lecz jest to kłopotliwe i wymaga stałych dostaw ciekłego azotu. W praktyce tkanki przeznaczone na badanie RNA przechowywane są w -80°C. Alternatywą dla mrożenia jest umieszczenie pobranego materiału w specjalnym płynie zabezpieczającym RNA przed degradacją. Zabezpieczoną w ten sposób tkankę można przechowywać w temperaturze pokojowej przez kilka dni lub w 4°C przez kilka tygodni. Od strony finansowej jest to jednak rozwiązanie znacznie kosztowniejsze w przypadku przechowywania dużych fragmentów tkanki.

13.4. Wybrane zastosowania diagnostyki molekularnej w medycynie

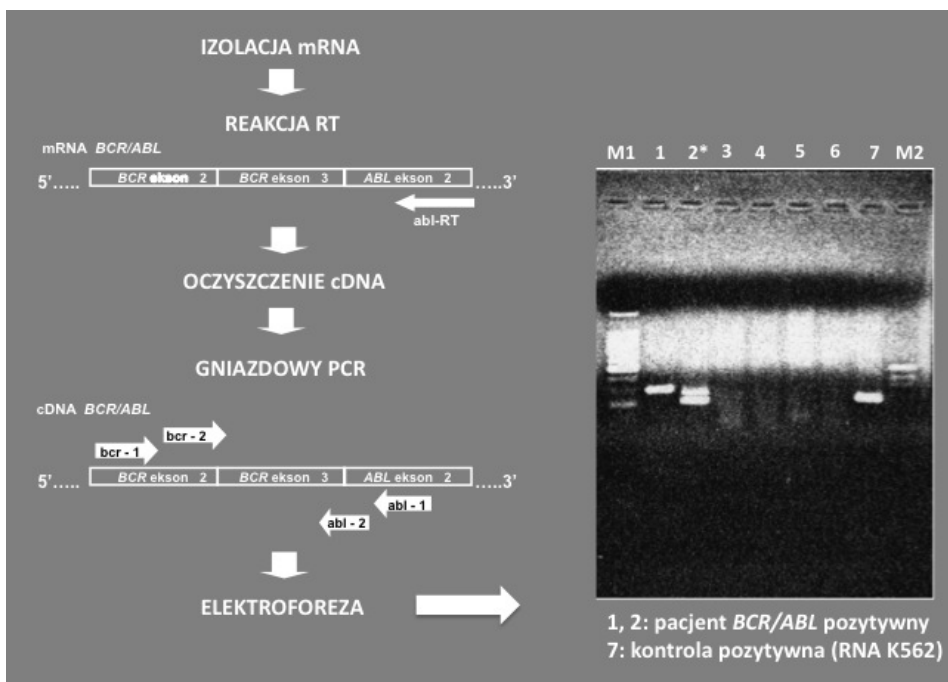
Jak dotąd diagnostyka molekularna najczęściej stosowana jest w diagnostyce chorób dziedzicznych, niektórych chorób nowotworowych, chorób infekcyjnych, w medycynie sądowej przy identyfikacji śladów biologicznych i ustalaniu stopnia pokrewieństwa oraz w badaniach prognostycznych i monitorowaniu terapii.

Rozrosty nowotworowe układu kwiotwórczego stanowią dużą grupę chorób o różnych objawach i różnym przebiegu klinicznym stwarzając duży problem diagnostyczny. Identyfikacja specyficznych zaburzeń chromosomalnych występujących w pewnym procencie poszczególnych chorób przyczynia się wybitnie do lepszego zdiagnozowania i pozwala na optymalizację terapii (tab. 13.1). Translokacja t(9;22) prowadząca do powstania tzw. chromosomu Filadelfia jest cechą charakterystyczną przewlekłej białaczki szpikowej (PBSz). Zmianę tą wykrywa się również w pewnym procencie ostrych białaczek limfoblastycznych (20-50% dorosłych i 2-10% dzieci) oraz rzadko w złośliwych chłoniakach i szpiczakach. Translokacja t(9;22) powoduje powstanie dwóch genów fuzyjnych, z których jeden *BCR-ABL* jest zlokalizowany na chromosomie 22 oraz genu *ABL-BCR* zlokalizowanego na chromosomie 9. Gen *BCR-ABL* koduje konstytutywnie aktywną kinazę tyrozynową, która determinuje rozrost komórek białaczkowych. Z uwagi na to, że istnieje kilka miejsc przełamania w obrębie genu *ABL* i *BCR* mamy do czynienia z powstaniem różnej wielkości transkryptów.

Tabela 13.1. Niektóre zmiany chromosomalne w białaczkach i chłoniakach oraz ich związek z przebiegiem choroby

Zmiana chromosomalna	Zmiana w obszarze genu	Choroba	Cechy kliniczne	Częstość występowania
chłoniaki				
t(14;18)(q32;q21)	<i>BCL2/IGH</i>	choniak grudkowy	łagodny przebieg	~85%
t(2;18)(p12;q21)	<i>IGK/BCL2</i>	chłoniak grudkowy	łagodny przebieg	<5%
t(3;14)(q27;q32)	<i>BCL6/IGH</i>	chłoniak grudkowy	łagodny przebieg	~10%
t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL1/IGH</i>	chłoniak z komórek płaszcza	agresywny	>90%
t(11;18)(p21;q21)	<i>API2/MLT</i>	chłoniak strefy brzeżnej z komórek B	łagodny przebieg	50%
t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC/IGH</i>	chłoniak Burkita	bardzo złośliwy	75%
t(2;8)(p12;q24)	<i>MYC/IGK</i>	chłoniak Burkita	bardzo złośliwy	15%
t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC/IGL</i>	chłoniak Burkita	bardzo złośliwy	10%
t(3;14)(q27;q32)	<i>BCL6/IGH</i>	rozlany chłoniak z komórek B	agresywny	~30%
białaczki				
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	przewlekła białaczka szpikowa	dobre rokowanie	95%
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	pre-B ostra białaczka limfoblastyczna	słabe rokowanie	5-20%
t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A/PBX</i>	pre-B ostra białaczka limfoblastyczna	słaba odpowiedź na antymetaboliety	3-6%
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML/RARA</i>	ostra białaczka szpikowa	koagulopatia, dobra odpowiedź na kwas retinowy	75 (75% w ALL M3)
t(11;17)(q23;q21)	<i>PLZF/RARA</i>	ostra białaczka szpikowa	koagulopatia, słaba odpowiedź na kwas retinowy	~1%
t(5;17)(q32;q21)	<i>NPM/RARA</i>	ostra białaczka szpikowa	koagulopatia, słaba odp. na kwas retinowy	~1%

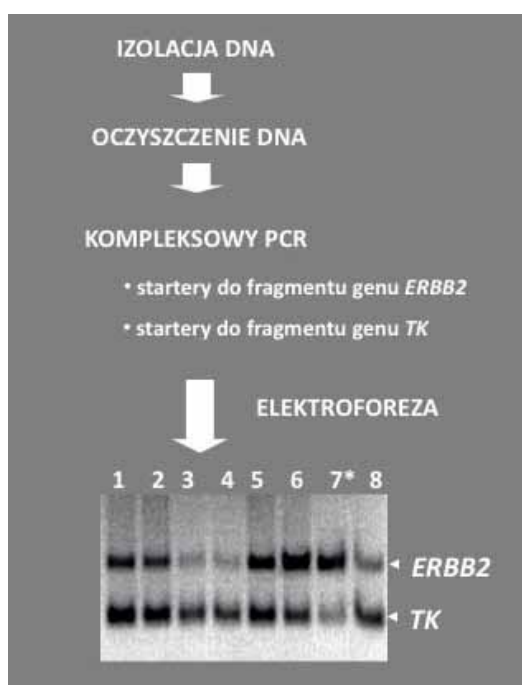
Wykrywanie obecności tych transkryptów jest podstawą diagnostyki pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego. Obserwując dynamikę zmian ilościowych i jakościowych można wnioskować o remisji lub zagrożeniu wznową. Przy czym pod terminem remisja kryją się trzy różne stany: remisja hematologiczna, czyli stan bez objawów klinicznych, remisja cytogenetyczna kiedy za pomocą metod cytogenetycznych nie udaje się wykryć komórek zawierających chromosom Filadelfia oraz remisja molekularna tj. stan, w którym u pacjenta nie można wykryć transkryptu fuzyjnego *BCR-ABL*. Metodą jakościową stosowaną do wykrywania obecności transkryptu *BCR-ABL* jest reakcja gniazdowego PCR, która pozwala z dostateczną czułością wykryć jego obecność (ryc. 13.8). Metodą ilościowej oceny poziomu transkryptu *BCR-ABL* jest PCR w czasie rzeczywistym. Analiza zmian ilościowych jest pomocna w ocenie skuteczności leczenia interferonem lub inhibitorem kinazy tyrozynowej (imatinib).



Ryc. 13.8. Detekcja transkryptu genu fuzyjnego BCR-ABL u chorych z PBSz metodą PCR gniazdowego. Analizowany fragment cDNA jest amplifikowany dwóokrotnie, najpier z parą starterów *bcr-1* i *abl-1* a następnie z parą starterów *bcr-2* i *abl-2*. (*), u pacjenta nr. 2 widać obecność dwóch form transkryptu fuzyjnego *BCR/ABL*

W odróżnieniu od nowotworów układu krwiotwórczego, w nowotworach litych przeważnie brak jest uznanych powszechnie korelacji między określoną zmianą genetyczną a przebiegiem choroby. Tylko w niektórych nowotworach

obserwuje się zależność między wystąpieniem konkretnej mutacji, a przebiegiem choroby lecz są to mniej liczne przypadki. Wykazano, że zaburzenia w obrębie genu *ERBB2* w raku sutka korelują z naturą nowotworu. Gen *ERBB2* leży na chromosomie 17 i koduje białko recetorowe z rodziny receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGF). Białko to nie posiada domeny wiążącej ligand, lecz rozpoznaje inne receptory związane z EGF tworząc heterodimery co skutkuje wzmocnieniem sygnału przekazywanego do komórki. W 14% raków sutka obserwuje się nadekspresję *ERBB2*, a w 20% ma miejsce aplifikacja tego genu. Wykazano, że nadekspresja *ERBB2* związana jest z większą agresywnością nowotworu. Nowotwory z nadekspresją *ERBB2* są odporne na leczenie tamoxifenem, lecz poddają się terapii z trastuzumabem (Herceptin).

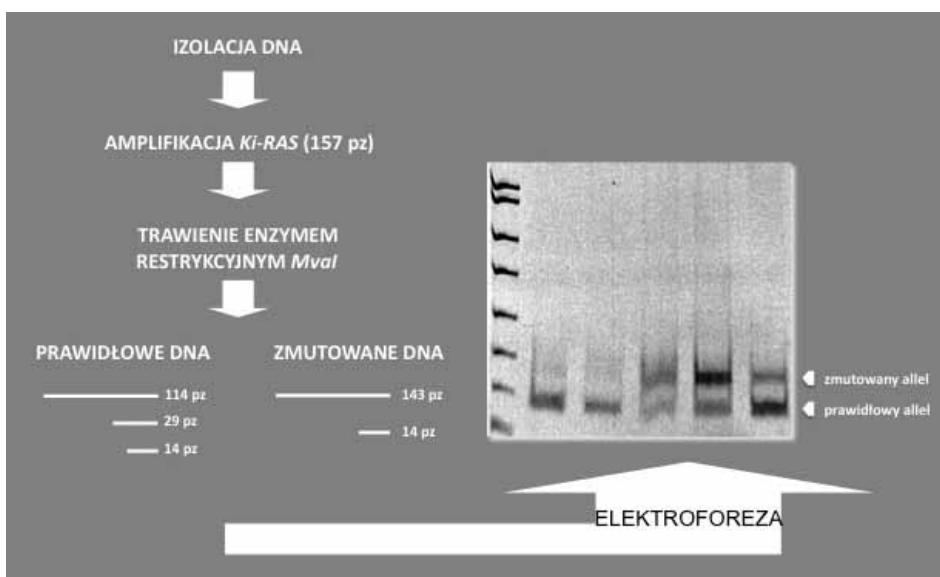


Ryc. 13.9. Detekcja amplifikacji *ERBB2* za pomocą PCR kompleksowego. Dla uniknięcia wpływu poliploidii na wynik analizy gen referencyjny (*TK*) jest tak wybrany, aby leżał na tym samym chromosomie co gen badany, w tym przypadku jest to chromosom 17. Oba fragmenty genów są amplifikowane w tej samej próbówce. Detekcja amplifikacji opiera się na analizie densytometrycznej rozdzielonych produktów PCR. Na prezentowanym przykładzie amplifikacja *ERBB2* jest widoczna u pacjenta nr. 7

Z kolei wystąpienie amplifikacji *ERBB2* koreluje z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych, krótszym przeżyciem pacjentów oraz obniżoną odpowiedzią na chemioterapię. Metodą referencyjną wykrywania nadekspresji i am-

plikacji *ERBB2* jest PCR w czasie rzeczywistym. Analizę ilości białka ERBB2 w tkankach rakowych prowadzi się również metodami immunohistochemicznymi. Stosunkowo tanią i prostą metodą przesiewową wykrywania amplifikacji *ERBB2* jest PCR kompleksowy z genem referencyjnym (ryc. 13.9).

Jedną z najczęściej występujących mutacji w tkankach rakowych jest mutacja w kodonie 12 genu *Ki-RAS*. Jest to cecha charakterystyczna dla ~90% gruczolakoraków trzustki. Zmiany tej nie obserwuje się w przewlekłym zapaleniu trzustki. Również w raku jelita grubego mutacja *Ki-RAS* występuje szczególnie często, bo wykrywa się ją w ~35% przypadków. Obecność tej mutacji związana jest z gorszym rokowaniem. Do wykrywania mutacji *Ki-RAS* służy PCR w czasie rzeczywistym lub metoda PCR/RFLP (ryc.13.10).



Ryc. 13.10. Schemat analizy występowania mutacji w kodonie 12 genu *Ki-RAS* metodą RG-PCR. W przedstawionej metodzie fragment genu *Ki-RAS* amplifikowany jest ze starterami zawierającymi miejsce restrykcyjne dla enzymu *MvaI*. W wyniku reakcji PCR z DNA dzikim powstaje fragment DNA zawierający dwa miejsca cięcia dla enzymu *MvaI*. Wystąpienie mutacji powoduje zanik jednego miejsca co po trawieniu enzymem *MvaI* objawia się powstaniem dłuższego fragmentu DNA (143 pz). Fragmenty 29 pz i 14 pz ze względu na mały rozmiar wychodzą z żelu.

Dla większości chorób nowotworowych znacznie lepszym narzędziem diagnostycznym od analizy pojedynczej zmiany genetycznej jest identyfikacja zmian w wielu genach jednocześnie. Analiza poziomu ekspresji grupy wybranych genów za pomocą mikromacierzy DNA pozwala zebrać dane charakteryzujące naturę nowotworu tzw. sygnaturę. Za pomocą sygnatury możliwa jest pre-

cyzyjna klasyfikacja raków, określenie rokowania, oraz ocena prawdopodobnej odpowiedzi na leczenie adjuwantowe. W chwili obecnej najbardziej rozwinięte są mikromacierze DNA dedykowane diagnostyce raka sutka. Okazuje się, że analiza poziomu ekspresji 11 genów (*CDH1*, *CTSB*, *BIRC5*, *TP11*, *SPRY1*, *ACYA14*, *TFAP2B*, *TSP-4*, *SSP-1*, *HLA-G*, *CHC1*) pozwala rozróżnić raki zrazikowe od przewodowych. Ocena stopnia zaawansowania raków sutka bazuje na ocenie histologicznej indeksu mitotycznego, polimorfizmu jądra oraz stopnia zróżnicowania. Analizy takie są w znacznej mierze subiektywne i mogą się różnić w zależności od doświadczenia patologa. W obrębie raków średnio zróżnicowanych (G2) obserwuje się duży odsetek przypadków o niepomyślnym przebiegu, lecz za pomocą analizy histologicznej grupy tej nie udaje się wyodrębnić. Pewny postęp w tej dziedzinie stanowią mikromacierze DNA za pomocą których udało się wyodrębnić grupę genów (*UBE2C*, *KPNA2*, *TPX2*, *FOXMI*, *STK6*, *CCNA2*, *BIRC5* i *MYBL2*), których poziom ekspresji tworzy sygnaturę pomocną w klasyfikacji raków. Ponadto w oparciu o utworzony tzw. indeks stopnia ekspresji genowej możliwe stało się wyodrębnienie w grupie raków G2 przypadków o dobrym i niepomyślnym rokowaniu w stosunku do których niezbędne jest wdrożenie leczenia adjuwantowego. Dużym osiągnięciem jest również identyfikacja grupy genów, których analiza ekspresji pozwala na ocenę odpowiedzi na określone leki. W najbliższych latach można spodziewać się pojawienia nowych systemów diagnostyki nowotworów litych opartych o mikromacierze DNA.

Choroby genetyczne będące następstwem wzrostu liczby powtórzeń trinuikleotydowych (tab. 13.2) stanowią duży problem diagnostyczny. W niektórych przypadkach osoba nie wykazująca objawów może być nosicielem zwiększonej liczby powtórzeń tzw. premutacji, która w następnym pokoleniu może przekształcić się w pełną mutację. Sytuację taką spotyka się u osób z zespołem łamliwego chromosomu X (Fra X). Choroba ta rozwija się w wyniku zwiększenia się liczby powtórzeń sekwencji CGG w obrębie genu *FMRI* leżącego na chromosomie X. Prawidłowa liczba powtórzeń sekwencji CGG wynosi 6-50, lecz nawet wzrost liczby powtórzeń do 200 (premutacja) nie objawia się cechami klinicznymi pełnej mutacji. Przekształcenie premutacji w pełną mutację następuje wyłącznie w trakcie rozwoju zarodka. Fra X dziedziczy się jako cecha dominująca sprzężona z chromosomem X. Mężczyźni mający pełną mutację wykazują cechy upośledzenia umysłowego i są nieplodni, natomiast kobiety nosicielki pełnej mutacji mają 50% ryzyko wystąpienia objawów klinicznych o różnym natężeniu. Do wykrywania zróżnicowanej liczby powtórzeń sekwencji CGG używa się hybrydyzacji Southerna lub reakcji PCR z nukleotydami znakowanymi znacznikiem radioaktywnym lub fluorescencyjnym.

Choroba Huntingtona jest chorobą degeneracyjną mózgu związaną z wystąpieniem zwiększonej liczby powtórzeń sekwencji CAG w obrębie genu *HD* umiejscowionego na chromosomie 4. Choroba dziedziczona jest autosomalnie dominująco. Prawidłowa liczba powtórzeń CAG wynosi 0-26, natomiast zmutowany allel zawiera 36-121 powtórzeń tego trinukleotydu. Objawy klinicz-

ne choroby z reguły występują późno w 40-50 roku życia i manifestują się utratą koordynacji funkcji ruchowych i zmianami psychicznymi. Bardzo często osoby chore przed wystąpieniem objawów mają już potomstwo, którym przekazują mutację. Testy diagnostyczne oparte na metodzie hybrydyzacji Southerna lub reakcji PCR umożliwiają wykrycie zwiększonej liczby powtórzeń CAG.

Tabela 13.2. Choroby rozwijające się w wyniku zwiększonej liczby powtórzeń trinukleotydowych

Choroba	Gen	Chromosom	Trinukleotyd	Prawidłowa liczba	Mutacja	Częstość występowania
Zespół łamliwego chromosomu X	<i>FMR1</i>	Xq27.3	(CGG) _n	6-50	52-500	1 : 5 000
Dystrofia miotoniczna	<i>DMPK</i>	19q13.2	(CTG) _n	5-37	50-500	1 : 8 000
Choroba Huntingtona	<i>HD</i>	4p16.3	(CAG) _n	0-26	36-121	1 : 10 000
Atrofia rdzeniowo-opuszkowa	<i>SBMA</i>	Xq11-12	(CAG) _n	11-31	36-65	<1 : 50 000

Przedstawione powyżej przykłady zastosowań diagnostyki molekularnej stanowią tylko niewielki wycinek dynamicznie rozwijającej się dziedziny analizy. Ze względu na ograniczoność miejsca nie przedstawiono szeregu istotnych zastosowań metod biologii molekularnej w medycynie sądowej, diagnostyce chorób infekcyjnych i inwazyjnych, chorobach mitochondrialnych czy farmakogenetyce. Pominęto również aspekty etyczne stosowania testów genetycznych zwłaszcza w przypadkach chorób dla których nieznana jest skuteczna terapia. Po te i inne zagadnienia odsyłam czytelników do piśmiennictwa uzupełniającego.