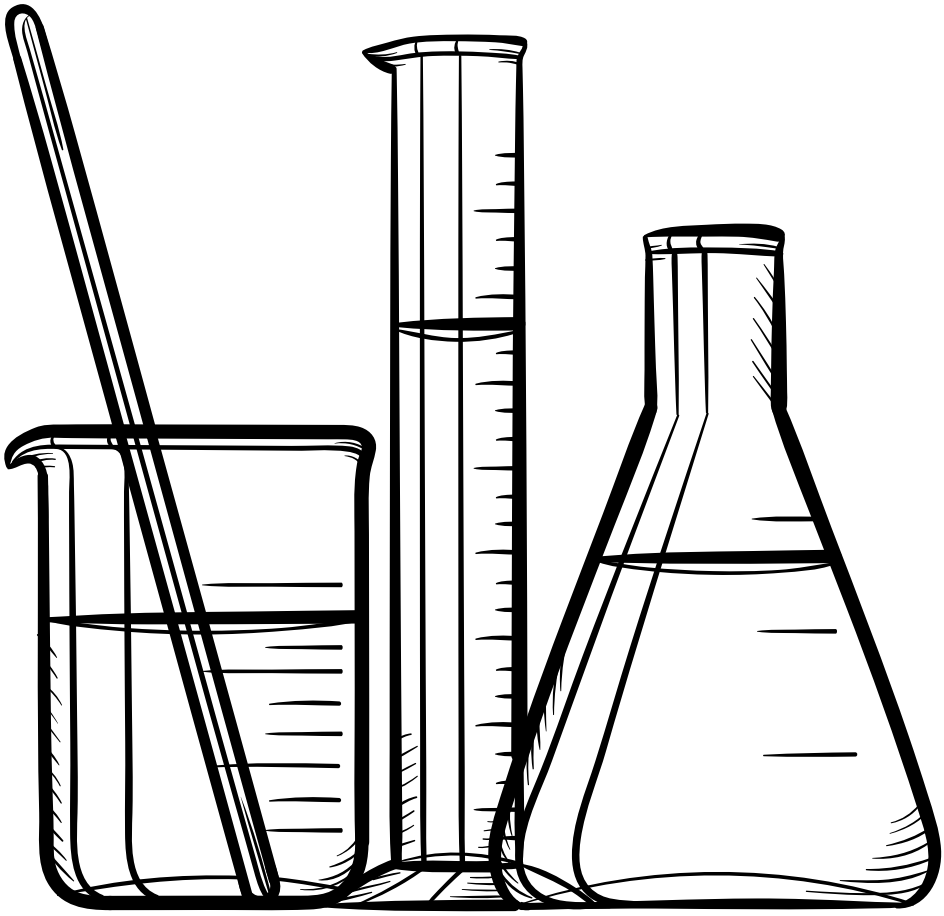


BIOCHEMICZNE MARKERY CHORÓB CYWILIZACYJNYCH

Zakład Higieny, Epidemiologii i Ergonomii

Wydział Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

BIOCHEMICZNE MARKERY CHORÓB CYWILIZACYJNYCH

Monografia naukowa dla studentów uczelni medycznych

Mateusz Maciejczyk

Edyta Gołaś

Małgorzata Żendzian-Piotrowska

Białystok 2025

Recenzenci

Justyna Dorf

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Małgorzata Knaś-Dawidziuk

Katedra Nauk o Zdrowiu
Akademia Łomżyńska

Elżbieta Supruniuk

Zakład Fizjologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ISBN – 978-83-68268-94-2

Wydanie II poprawione

Białystok 2025

SPIS TREŚCI

1. REGULAMIN BHP……5

2. WSTĘP……7

3. BIOMARKERY CHORÓB UKŁADU KRĄŻENIA……9

3.1. TRIACYLOGLICEROLE……10

3.2. CHOLESTEROL CAŁKOWITY……14

3.3. CHOLESTEROL HDL……18

3.4. CHOLESTEROL LDL……21

3.5. LIPAZA……25

3.6. KREATYNINA……28

3.7. MOCZNIK……32

3.8. KWAS MOCZOWY……35

4. BIOMARKERY CHORÓB METABOLICZNYCH……39

4.1. GLUKOZA……40

4.2. HEMOGLOBINA GLIKOWANA……45

4.3. FRUKTOZAMINA……48

5. BIOMARKERY CHORÓB PRZEWODU POKARMOWEGO……51

5.1. AMINOTRANSFERAZA ASPARAGINIANOWA……52

5.2. AMINOTRANSFERAZA ALANINOWA……56

5.3. GAMMA-GLUTAMYLOTRANSFERAZA……60

5.4. KINAZA KREATYNOWA……64

5.5. FOSFATAZA ZASADOWA……68

5.6. DEHYDROGENAZA MLECZANOWA……72

5.7. α-AMYLAZA……..……**76**

6. INNE BIOMARKERY…….….….**81**

6.1. BIAŁKO CAŁKOWITE……....….**82**

6.2. ALBUMINA……..…...**87**

6.3. BILIRUBINA……..….**90**

6.4. MAGNEZ……...……..…**94**

6.5. WAPŃ……**98**

6.6. FOSFOR……..……**103**

6.7. ŻELAZO……..….**107**

7. SPIS WARTOŚCI REFERENCYJNYCH……**111**

7.1. BIOMARKERY CHORÓB UKŁADU KRĄŻENIA…… **112**

7.2. BIOMARKERY CHORÓB METABOLICZNYCH……..……..**115**

7.3. BIOMARJERY CHORÓB UKŁADU POKARMOWEGO…….……...**116**

7.4. INNE BIOMARKERY……..**118**

8. WZÓR SPRAWOZDANIA……...**121**

9. LITERATURA PODSTAWOWA…….……**126**

10. LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA…….….**127**

1. REGULAMIN BHP

Studentom zabrania się:

- spożywania posiłków i napojów oraz palenia tytoniu w sali ćwiczeń
- przeprowadzania jakichkolwiek doświadczeń niezwiązanych z tematyką ćwiczeń
- wnoszenia i wynoszenia jakichkolwiek odczynników z sali i do sali ćwiczeń
- wynoszenia z dygestorium stężonych kwasów i zasad
- samodzielnego zapalania palników gazowych/spirytusowych

Studentom nakazuje się:

- podczas przebywania w sali ćwiczeń nosić adekwatną odzież ochronną
- natychmiast zawiadomić asystenta o zdarzeniu mogącym zagrozić zdrowiu i życiu studentów, a w razie zagrożenia pożarowego natychmiast zawiadomić asystenta, a następnie w razie potrzeby także straż pożarną
- pracować wyłącznie pod wyciągiem, jeżeli w czasie pracy mogą wydzielać się lotne substancje toksyczne
- zachować szczególną ostrożność podczas rozcieńczania stężonych kwasów oraz ogrzewania cieczy
- natychmiast usunąć rozlany kwas lub zasadę przez wielokrotne zbieranie, w rękawicach ochronnych, zmoczoną ścierką
- utrzymywać przydzielone miejsce pracy i otoczenie w czystości
- usuwać odpady stałe, roztwory soli metali ciężkich i substancje organiczne do odpowiednich pojemników
- myć ręce przed opuszczeniem laboratorium

NIEPRZESTRZEGANIE POWYŻSZYCH ZASAD MOŻE SPOWODOWAĆ ZAGROŻENIE DLA ZDROWIA, A NAWET ŻYCIA I STWORZYĆ NIEBEZPIECZEŃSTWO DLA OTOCZENIA!

2. WSTĘP

Choroby cywilizacyjne to niezakaźne choroby przewlekłe powszechnie występujące w populacji. Zaliczamy do nich choroby układu sercowo-naczyniowego (nadciśnienie tętnicze, chorobę niedokrwienną serca, zawał serca, udar mózgu), otyłość, cukrzycę, choroby przewodu pokarmowego, choroby psychiatryczne oraz nowotwory. Szacuje się, że choroby cywilizacyjne są główną przyczyną niepełnosprawności oraz odpowiadają za ponad 80% wszystkich zgonów na świecie. W ich patogenezie kluczową rolę odgrywają styl życia oraz czynniki środowiskowe, w tym niska aktywność fizyczna, niezbilansowana dieta, stosowanie używek, stres oraz zanieczyszczenie środowiska (wody, powietrza i gleby). Dlatego też niezbędne jest opracowanie biomarkerów pozwalających na wczesne wykrywanie chorób cywilizacyjnych, co zapewni ich właściwe leczenie.

Zgodnie z definicją *National Institute of Health* **biomarker** to „cecha, która daje się obiektywnie zmierzyć i może być zastosowana w ocenie fizjologicznych procesów biologicznych, procesów patologicznych lub odpowiedzi organizmu na działania terapeutyczne". Biomarker mierzony daną metodą analityczną powinien charakteryzować się dużą dokładnością (zgodność między wartością rzeczywistą a wynikiem pomiaru), precyzją (zgodność między pojedynczymi wynikami dla wielu niezależnych oznaczeń biomarkera), powtarzalnością (precyzja oznaczeń wykonanych w krótkim odstępie czasu, przez tego samego analityka i w tych samych warunkach), odtwarzalnością (stopień zgodności wyników uzyskanych pomiarów w zmienionych warunkach pomiarowych), czułością (najmniejsza różnica w zawartości biomarkera, jaka może być stwierdzona za pomocą danej metody analitycznej), selektywnością (stopień, w jakim dana metoda analityczna może być stosowana do oznaczenia biomarkera w obecności innych składników próby bez wystąpienia interferencji) oraz specyficznością (100% selektywność).

Markery biologiczne służą jako swoisty wyznacznik ciągu zdarzeń „ekspozycja-choroba", a ich znaczenie we współczesnej medycynie jest ogromne. Nie dziwi więc, że biomarkery wykorzystywane są w prewencji, diagnostyce oraz leczeniu chorób cywilizacyjnych. W praktyce klinicznej najczęściej stosuje się **biomarkery efektu (skutków)**, czyli biochemiczne, fizjologiczne (czynnościowe) lub strukturalne zmiany zachodzące wewnątrz organizmu, które wskazują na możliwość wystąpienia uszkodzeń (zmiany subkliniczne) lub już świadczą o chorobie (zmiany kliniczne).

3. BIOMARKERY CHORÓB UKŁADU KRĄŻENIA

3.1. TRIACYLOGLICEROLE

➢ Podstawy biochemiczne

Acyloglicerole to estry glicerolu i kwasów tłuszczowych pochodzące z pokarmu lub syntetyzowane w wątrobie. W cząsteczkach **triacyloglicerolі (TAG)** przy pierwszym atomie węgla C_1 występuje zwykle kwas tłuszczowy nasycony, przy C_2 – kwas nienasycony, a przy C_3 – równie często kwas tłuszczowy nasycony, jak i nienasycony.

TAG są magazynowane w tkance tłuszczowej stanowiąc **podstawowe źródło energii** dla organizmu człowieka. We krwi TAG występują głównie w postaci połączeń z chylomikronami lub lipoproteinami o bardzo małej gęstości (ang. *very low density lipoproteins*; VLDL).

Oznaczanie stężenia TAG w surowicy jest przydatne w profilaktyce i monitorowaniu chorób metabolicznych, chorób układu sercowo-naczyniowego oraz do oceny funkcjonowania wątroby. Ocenę przeprowadza się po 12-14 h głodzeniu. W medycynie, często zamiast TAG używa się niepoprawnej chemicznie nazwy triglicerydy (trójglicerydy, TG).

➢ Wartości referencyjne

Surowica	
< 150 mg/dl (1,7 mmol/l) [mg/dl] = [mmol/l] x 88,5	
≤ 150 mg/dl (1,7 mmol/l)	wartości niskie
150-199 mg/dl (1,70-2,25 mmol/l)	wysokie prawidłowe
200-499 mg/dl (2,26-5,64 mmol/l)	wysokie
> 500 mg/dl (> 5,56 mmol/l)	bardzo wysokie

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie TAG w surowicy może świadczyć o:

- nadmiernej podaży TAG w pokarmach
- nasilonej syntezie TAG w wątrobie
  - wrodzona hiperlipoproteinemia
  - cukrzyca
  - zespół nerczycowy
  - przewlekła niewydolność nerek
  - dna moczanowa
  - alkoholizm
- zmniejszonym spalaniu TAG
  - niedoczynność tarczycy

- dyslipidemii aterogennej
- zespole chylomikronemii

Obniżone stężenie TAG w surowicy może świadczyć o:

- zmniejszonej podaży TAG w pokarmach
- niedożywieniu i wyniszczeniu
- utracie TAG z kałem
    - zespół wadliwego trawienia i wchłaniania
    - przewlekłe zapalenie trzustki
    - cholestaza
- zaburzonej syntezie TAG w wątrobie
    - uszkodzenia hepatocytów
- wzmożonym spalaniu TAG
    - nadczynność tarczycy

Ocena stężenia TAG zestawem *BioSystems®*

Odczynniki	• **odczynnik A** (*4-chlorofenol 6 mmol/l, chlorek magnezu 5 mmol/l, lipaza > 100 U/l, kinaza glicerolowa > 1,5 U/ml, oksydaza 3-fosfoglicerynowa > 4 U/ml, peroksydaza > 0,8 U/ml, 4-aminoantypiryna 0,75 mmol/l, ATP 0,9 mol/l, pH 7,0*) • **standard** (*glicerol odpowiadający trioleinie 200 mg/dl (2,26 mmo/l*))
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Stężenie TAG** w próbkach surowicy ocenia się kolorymetryczną metodą enzymatyczną. TAG obecne we krwi poddaje się hydrolizie enzymatycznej w obecności lipazy, a następnie oznacza się pośrednio zawartość glicerolu poprzez pomiar ilości uwolnionego nadtlenku wodoru. $\text{TAG} + 3\,H_2O \xrightarrow{\text{lipaza}} \text{glicerol} + 3 \text{ kwasy tłuszczowe}$ $\text{glicerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{kinaza glicerolowa}} \text{glicerolo-3-fosforan} + \text{ADP}$ $\text{glicerolo-3-fosforan} + O_2 \xrightarrow{\text{oksydaza 3-fosfoglicerolowa}} \text{dihydroksyaceton-P} + H_2O_2$ $2\,H_2O_2 + \text{4-aminoantypiryna} + \text{fenol} \xrightarrow{\text{peroksydaza}} \text{chinonoimina} + 4\,H_2O$ W ostatniej reakcji powstaje czerwono zabarwiona chinonoimina, której natężenie barwy przy 500 nm jest wprost proporcjonalne do stężenia TAG w badanej próbie.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do trzech oznaczonych kuwet: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 10 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 10 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 10 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 15 minut w temperaturze pokojowej lub przez 5 minut w temperaturze 37°C 5. Zarejestrować absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 500 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie TAG** w próbie badanej obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$ Jeśli do kalibracji użyto standardu triacylogliceroli: $C_{\text{próby}} = \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times 200$ (mg/dl TAG) $C_{\text{próby}} = \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times 2{,}26$ (mmol/l TAG)

Interferencje	Bilirubina
Zagadnienia do opracowania	1. Budowa i właściwości acyloglicerolі ze szczególnym uwzględnieniem triacyloglicerolі 2. Synteza triacyloglicerolі 3. Rozpad triacyloglicerolі 4. Rozpad tłuszczów pokarmowych 5. Patogeneza otyłości
Pytania kontrolne	1. Omów proces resyntezy i reestryfikacji TAG 2. Omów rolę chylomikronów w metabolizmie TAG 3. Opisz regulację rozkładu TAG w komórce 4. Porównaj syntezę i rozkład TAG 5. Omów zaburzenia gospodarki lipidowej leżące u podłoża otyłości 6. Omów udział TAG w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

3.2. CHOLESTEROL CAŁKOWITY

➢ Podstawy biochemiczne

Cholesterol jest pochodną cyklopentanoperhydrofenantrenu. Należy do steroli – alkoholi posiadających grupę hydroksylową przy trzecim atomie węgla C_3 oraz łańcuch boczny zawierający 8-10 atomów węgla przy C_{17}. Chociaż **grupa -OH** nadaje cząsteczce **słaby charakter hydrofilowy**, w postaci zestryfikowanej cholesterol nie posiada już takich właściwości.

Synteza cholesterolu jest procesem wieloetapowym zachodzącym w **cytosolu** oraz **siateczce endoplazmatycznej**. Czynnikiem ograniczającym tempo syntezy cholesterolu jest głównie reduktaza β-hydroksy-β-metyloglutarylo~S-CoA (HMG~S-CoA). Inhibitory kompetycyjne HMG~S-CoA (statyny) wykorzystywane są w farmakologicznym leczeniu hipercholesterolemii.

Cholesterol jest składnikiem strukturalnym błon komórkowych, prekursorem kwasów żółciowych, hormonów steroidowych oraz witaminy D. W komórkach krwi cholesterol występuje w stanie wolnym, natomiast w osoczu – głównie w formie zestryfikowanej. Około 50-75% cholesterolu całkowitego związane jest z frakcją LDL (ang. *low density lipoproteins*), 20-35% z frakcją HDL (ang. *high density lipoproteins*), a niespełna 5% z frakcją VLDL (ang. *very low density lipoproteins*).

Ocena stężenia cholesterolu w surowicy jest przydatna w profilaktyce i monitorowaniu chorób układu sercowo-naczyniowego oraz do oceny funkcjonowania wątroby. Pomiar przeprowadza się po 12-14 h głodzeniu.

➢ Wartości referencyjne

Surowica	
114-190 mg/dl (3,0-4,9 mmol/l) [mg/dl] = [mmol/l] x 38,5	
≤ 200 mg/dl (5,2 mmol/l)	wartości pożądane
200-239/dl (5,2-6,21 mmol/l)	graniczne/wysokie
≥ 240 mg/dl (> 6,24 mmol/l)	wysokie

Wyżej podane wartości referencyjne zostały zaproponowane przez *Amerykański Narodowy Program Edukacji Cholesterolowej* do oceny zagrożenia chorobami wieńcowymi.

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy może świadczyć o:

- wzmożonej wrodzonej biosyntezie cholesterolu
  - hipercholesterolemia rodzinna
  - hipercholesterolemia wielogenowa
  - rodzinny defekt apoproteiny B-100
- wzmożonej nabytej biosyntezie cholesterolu
  - zespół nerczycowy
  - przewlekła niewydolności nerek
  - alkoholizm
- upośledzonych przemianach biochemicznych cholesterolu
  - niedoczynność tarczycy
  - choroby wątroby przebiegające z cholestazą
- nadmiernej podaży cholesterolu w pokarmach

Obniżone stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy może świadczyć o:

- niedożywieniu i wyniszczeniu
- upośledzeniu wchłaniania cholesterolu z przewodu pokarmowego
  - zespół wadliwego trawienia i wchłaniania
- niedostatecznej syntezie cholesterolu
  - wrodzony defekt biosyntezy cholesterolu
  - zaawansowana marskość i inne ciężkie uszkodzenia miąższu wątroby
- zwiększonym obrocie metabolicznym cholesterolu
  - nadczynność tarczycy
- sepsie

Ocena stężenia cholesterolu całkowitego zestawem *BioSystems®*

Odczynniki	• **odczynnik A** (*cholan sodu 0,5 mmol/l, fenol 28 mmol/l, esteraza cholesterolowa > 0,2 U/ml, oksydaza cholesterolowa > 0,1 U/ml, peroksydaza > 0,8 U/ml, 4-aminoantypiryna 0,5 mmol/l, pH 7,0*) • **standard** (*cholesterol 200 mg/dl*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Stężenie cholesterolu całkowitego** w próbkach surowicy ocenia się kolorymetryczną metodą enzymatyczną. W wyniku sprzężonych reakcji cholesterol tworzy barwny kompleks z 4-aminoantypiryną i fenolem. Powstaje czerwono zabarwiona chinonoimina, której natężenie barwy przy 500 nm jest wprost proporcjonalne do stężenia cholesterolu całkowitego w badanej próbce. $\text{estry cholesterolu} + H_2O \xrightarrow{\text{esteraza cholesterolowa}} \text{cholesterol} + \text{kwasy tłuszczowe}$ $\text{cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{oksydaza cholesterolowa}} \text{cholest-4-en-3-on} + H_2O_2$ $2H_2O_2 + \text{4-aminoantypiryna} + \text{fenol} \xrightarrow{\text{peroksydaza}} \text{chinonoimina} + 4\,H_2O$
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do trzech oznaczonych kuwet: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 10 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 10 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 10 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 5 minut w temperaturze 37°C 5. Zarejestrować absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 500 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie cholesterolu całkowitego** w próbie badanej obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = C \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$ Jeżeli do kalibracji użyto załączonego standardu cholesterolu: $\frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times 200 = \frac{\text{mg}}{\text{dl}}$ cholesterolu $\frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times 5{,}18 = \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ cholesterolu
Interferencje	Bilirubina, hemoglobina
Zagadnienia do opracowania	1. Budowa chemiczna cholesterolu 2. Właściwości biologiczne cholesterolu 3. Regulacja syntezy cholesterolu

4. Rozkład cholesterolu
5. Znaczenie kliniczne oceny stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy
6. Budowa i właściwości lipoprotein osocza
7. Powstawanie i metabolizm lipoprotein
8. Zaburzenia przemiany lipoprotein
9. Budowa i właściwości kwasów żółciowych
10. Synteza oraz wydalanie kwasów żółciowych

Pytania kontrolne

1. Omów rolę cholesterolu w regulacji płynności błon komórkowych
2. Dokończ zdania dotyczące biosyntezy cholesterolu:
   a) Źródłem atomów węgla w cząsteczce cholesterolu jest…
   b) Źródłem atomów wodoru w cząsteczce cholesterolu jest…
   c) Źródłem energii biologicznej w procesach biosyntezy cholesterolu jest…
3. Omów proces biosyntezy cholesterolu. Które etapy zachodzą w cytozolu, a które w siateczce endoplazmatycznej?
4. Omów mechanizmy samoregulacji syntezy cholesterolu
5. Omów mechanizm działania statyn
6. Omów podłoże oraz obraz kliniczny choroby tangierskiej
7. Omów jednostki chorobowe związane z niedoborem acylotransferazy lecytyna:cholesterol
8. Omów rolę LDL w powstawaniu blaszki miażdżycowej
9. Opisz podłoże biochemiczne oraz obraz kliniczny pierwotnych zaburzeń metabolizmu lipidów związanych ze zwiększoną produkcją LDL i VLDL
10. Opisz podłoże biochemiczne oraz obraz kliniczny wtórnych zaburzeń metabolizmu lipidów związanych ze zwiększoną produkcją LDL i VLDL
11. Opisz powstawanie i działanie biologiczne hormonów steroidowych
12. Omów udział cholesterolu całkowitego w patogenezie chorób cywilizacyjnych

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

3.3. CHOLESTEROL HDL

➢ Podstawy biochemiczne

Lipoproteiny są kulistymi kompleksami lipidów oraz białek (apoprotein) występującymi w osoczu. Spośród wszystkich lipoprotein, **lipoproteiny o dużej gęstości** (ang. *high density lipoproteins*; **HDL**) wykazują najmniejszą średnicę, zawierają najmniej lipidów oraz najwięcej apoprotein. Wykazano, że apoproteina A-I (apo A-I) stanowi 70% apoprotein HDL. Cząsteczki HDL są syntetyzowane w wątrobie oraz w ścianie jelita, a następnie uwalniane do krążenia drogą egzocytozy.

HDL są krążącym magazynem apo C-II i apo E. Uczestniczą w wychwycie niezestryfikowanego cholesterolu, w estryfikacji cholesterolu oraz w transporcie zwrotnym cholesterolu. Cholesterol zawarty w HDL ma działanie przeciwmiażdżycowe, przez co określany jest jako „**dobry cholesterol**".

Ocena stężenia HDL w surowicy jest przydatna w profilaktyce i monitorowaniu chorób układu sercowo-naczyniowego oraz do oceny funkcjonowania wątroby. Pomiar przeprowadza się po 12-14 h głodzeniu.

➢ Wartości referencyjne

Surowica	
> 45 mg/dl (1,2 mmol/l)	kobiety
> 40 mg/dl (1 mmol/l)	mężczyźni
[mg/dl] = [mmol/l] x 38,5	
≤ 35 mg/dl (0,91 mmol/l)	wysokie ryzyko
> 60 mg/dl (> 1,56 mmol/l)	niskie ryzyko

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

Podane wyżej wartości graniczne służą do różnicowania osób o niskim i wysokim ryzyku wystąpienia choroby wieńcowej.

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Obniżone stężenie cholesterolu HDL w surowicy może świadczyć o:

- dyslipidemii aterogennej
- rodzinnej hipoalfalipoproteinemiai (niedobór apo A-I)
- chorobie tangierskiej (niedobór wewnątrzkomórkowego białka przenoszącego estry cholesterolu, ABC1)
- rodzinnym niedoborze acylotransferazy lecytyna:cholesterol
- chorobie rybich oczu (częściowy niedobór acylotransferazy lecytyna:cholesterol)

Ocena stężenia cholesterolu HDL zestawem *BioSystems*®

Odczynniki

- **odczynnik A** (*bufor MES 100 mmol/l, polimery, 4-aminoantypiryna 0,5 mmol/l, detergent, pH 6,5*)
- **odczynnik B** (*bufor MES 50 mmol/l, esteraza cholesterolowa 1,0 U/ml, peroksydaza 1,0 U/ml, oksydaza cholesterolowa 0,5 U/ml, N-etylo-N-(2-hydroksy-3-sulfopropylo)-3-metyloanilina (TOOS) 4,5 mmol/l, detergent, pH 5,5*)
- **standard** (*cholesterol 200 mg/dl*)

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

Gotowy do użycia

Zasada metody

Ocena **stężenia HDL** w próbkach surowicy przebiega w dwóch etapach. W pierwszym z nich następuje oddzielenie HDL od pozostałych lipoprotein krwi (VLDL i LDL), a następnie ocenia się stężenie cholesterolu w uzyskanej frakcji za pomocą kolorymetrycznej metody enzymatycznej. Detergent obecny w odczynniku B rozpuszcza cholesterol pochodzący z HDL. Następnie, w wyniku sprzężonych reakcji cholesterol tworzy barwny kompleks z 4-aminoantypiryną i fenolem. Powstaje czerwono zabarwiona chinonoimina, której natężenie barwy przy 500 nm jest wprost proporcjonalne do stężenia HDL w badanej próbce.

$$\text{estry cholesterolu} + H_2O \xrightarrow{\text{esteraza cholesterolowa}} \text{cholesterol} + \text{kwasy tłuszczowe}$$

$$\text{cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{oksydaza cholesterolowa}} \text{cholest-4-en-3-on} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{4-aminoantypiryna} + \text{fenol} \xrightarrow{\text{peroksydaza}} \text{chinonoimina} + 4\,H_2O$$

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **odczynniki** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C)
2. Odpipetować do dwóch oznaczonych kuwet:

a) **Próba ślepa**: 750 µl **odczynnika A** i 7 µl **wody destylowanej**

b) **Próba badana**: 750 µl **odczynnika A** i 7 µl **próby**

3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety
4. Inkubować kuwety przez 5 minut, a następnie zarejestrować absorbancję (A1) próby badanej przy długości fali 535 nm wobec wody destylowanej
5. Odpipetować do kuwet **a)** oraz **b)** po 250 µl **odczynnika B**
6. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety
7. Inkubować kuwety przez 5 minut w temperaturze pokojowej
8. Zarejestrować absorbancję (A2) próby badanej przy długości fali 500 nm wobec próby ślepej

Obliczenia

Stężenie HDL w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$C_{\text{Próby}} = \frac{(A_2 - 0{,}75 \times A_1)_{\text{Próby}} - (A_2 - 0{,}75 \times A_1)_{\text{Próby ślepej}}}{(A_2 - 0{,}75 \times A_1)_{\text{Standardu}} - (A_2 - 0{,}75 \times A_1)_{\text{Próby ślepej}}} \times C_{\text{Standardu}}$$

Interferencje	Kwas askorbinowy
Zagadnienia do opracowania	1. Budowa i właściwości lipoprotein osocza 2. Powstawanie i metabolizm lipoprotein 3. Zaburzenia przemiany lipoprotein 4. Znaczenie kliniczne oceny stężenia HDL w surowicy
Pytania kontrolne	1. Omów powstawanie i metabolizm HDL 2. Omów rolę HDL w chorobach sercowo-naczyniowych 3. Opisz podłoże oraz obraz kliniczny choroby tangierskiej 4. Omów jednostki chorobowe związane z niedoborem acylotransferazylecytyna:cholesterol 5. Omów udział HDL w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

3.4. CHOLESTEROL LDL

➢ Podstawy biochemiczne

Lipoproteiny o małej gęstości (ang. *low density lipoproteins*; **LDL**) zawierają mniej triacyloglicerolu (TAG) niż ich prekursory – lipoproteiny o bardzo małej gęstości (ang. *very low density lipoproteins*; VLDL). Posiadają za to więcej cholesterolu i jego estrów. Wykazano, że w LDL znajduje się ponad 70% cholesterolu osocza. Cholesterol zawarty w LDL i VLDL ma działanie promiażdżycowe („**zły cholesterol**”).

Ocena stężenia LDL w surowicy jest przydatna w profilaktyce i monitorowaniu chorób układu sercowo-naczyniowego oraz do oceny funkcjonowania wątroby. Pomiar przeprowadza się po 12-14 h głodzeniu.

Stężenie LDL (LDL-C) w surowicy można ocenić metodą enzymatyczną lub też wyliczyć ze wzoru:

LDL-C = stężenie cholesterolu całkowitego - stężenie VLDL-C - stężenie HDL-C

Stężenie VLDL-C należy wyliczyć ze wzoru:

stężenie VLDL-C = stężenie TAG / 5

➢ Wartości referencyjne

Prawidłowe stężenie cholesterolu LDL zależy od ryzyka sercowo-naczyniowego.

Surowica	
[mg/dl] = [mmol/l] x 38,5	
≤ 100 mg/dl (2,59 mmol/l)	wartości optymalne
100-129 mg/dl (2,59-3,34 mmol/l)	prawie optymalne
130-159 mg/dl (3,37-4,12 mmol/l)	umiarkowane
160-189 mg/dl (4,14-4,90 mmol/l)	wysokie
≥ 190 mg/dl (4,92 mmol/l)	bardzo wysokie

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie cholesterolu LDL w surowicy może świadczyć o:

- rodzinnym defekcie apo B-100
- niedoczynności tarczycy
- zespole nerczycowym
- przewlekłej chorobie nerek

- chorobach wątroby
- stosowaniu niektórych leków (np. glukokortykoidy, progestageny)

Obniżone stężenie cholesterolu LDL w surowicy krwi może świadczyć o:

- nadczynności tarczycy
- chorobach wątroby
- sepsie
- wyniszczeniu

Ocena stężenia cholesterolu LDL zestawem *BioSystems*®

Odczynniki

- **odczynnik A** (*bufor MES > 30 mmol/l, esteraza cholesterolowa < 1,5 u/ml, oksydaza cholesterolowa < 1,5 U/ml, 4-aminoantypiryna 0,5 mmol/l, oksydaza askorbinianowa < 3,0 U/l, peroksydaza > 1 U/ml, detergent, pH 6,3*)
- **odczynnik B** (*bufor MES > 30 mmol/l, N,N-bis(4-sulfobutylo)-m-toluidyna 1 mmol/l, detergent, pH 6,3*)
- **standard** (*cholesterol 200 mg/dl*)

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

Gotowy do użycia.

Zasada metody

Ocena **stężenia LDL** w próbkach surowicy przebiega w dwóch etapach W pierwszym z nich następuje oddzielenie LDL od pozostałych lipoprotein krwi (HDL), a następnie ocenia się stężenie cholesterolu w uzyskanej frakcji za pomocą kolorymetrycznej metody enzymatycznej. Detergent obecny w odczynniku B rozpuszcza cholesterol pochodzący z LDL. Następnie, w wyniku sprzężonych reakcji cholesterol tworzy barwny kompleks z 4-aminoantypiryną i fenolem. Powstaje czerwono zabarwiona chinonoimina, której natężenie barwy przy 500 nm jest wprost proporcjonalne do stężenia LDL w badanej próbce.

$$\text{estry cholesterolu} + H_2O \xrightarrow{\text{esteraza cholesterolowa}} \text{cholesterol} + \text{kwasy tłuszczowe}$$

$$\text{cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{oksydaza cholesterolowa}} \text{cholest-4-en-3-on} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{4-aminoantypiryna} + \text{fenol} \xrightarrow{\text{peroksydaza}} \text{chinonoimina} + 4\,H_2O$$

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **odczynniki** i spektrofotometr do temperatury 37°C
2. Odpipetować do dwóch oznaczonych kuwet:
   a) **Próba ślepa**: 750 µl **odczynnika A** i 7 µl **wody destylowanej**
   b) **Próba badana**: 750 µl **odczynnika B** i 7 µl **próby badanej**
3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety
4. Inkubować kuwety przez 5 minut w temperaturze 37°C
5. Zarejestrować absorbancję (A1) próby badanej przy długości fali 500 nm wobec wody destylowanej
6. Odpipetować do kuwet **a)** oraz **b)** po 250 µl **odczynnika B**
7. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety
8. Inkubować kuwety przez 5 minut w temperaturze 37°C
9. Zarejestrować absorbancję (A2) próby badanej przy długości fali 500 nm wobec próby ślepej

Obliczenia

Stężenie LDL w próbie badanej obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$C_{\text{Próby}} = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{Próby}}}{(A_2 - A_1)_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$$

Interferencje

Kwas askorbinowy

Zagadnienia do opracowania	1. Budowa i właściwości lipoprotein osocza 2. Powstawanie i metabolizm lipoprotein 3. Zaburzenia przemiany lipoprotein 4. Znaczenie kliniczne oceny stężenia LDL w surowicy
Pytania kontrolne	1. Omów powstawanie i metabolizm LDL 2. Omów rolę LDL w powstawaniu blaszki miażdżycowej 3. Opisz podłoże biochemiczne oraz obraz kliniczny pierwotnych zaburzeń metabolizmu lipidów związanych ze zwiększoną produkcją LDL i VLDL 4. Opisz podłoże biochemiczne oraz obraz kliniczny wtórnych zaburzeń metabolizmu lipidów związanych ze zwiększoną produkcją LDL i VLDL 5. Omów udział LDL w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

3.5. LIPAZA

➢ Podstawy biochemiczne

Lipaza trzustkowa (EC 3.1.1.3) należy do enzymów ekskrecyjnych trzustki. Działając na triacyloglicerole (TAG) odłącza kwasy tłuszczowe przy C_1 i C_3 glicerolu – produktami reakcji hydrolizy jest mieszanina 2-monoacylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych. Lipaza stanowi ok. **2-3% białka całkowitego trzustki**, przez co enzym ten jest bardzo wydajny katalitycznie.

Większość lipazy we krwi jest pochodzenia trzustkowego. Gradient stężeń trzustka-surowica wynosi nawet 20 000 : 1, a pozostała część enzymu we krwi pochodzi z gruczołów ślinowych, żołądka, jelit oraz płuc. Z uwagi na małą masę cząsteczkową, lipaza ulega całkowitej reabsorpcji w kanalikach nerkowych i nie występuje w moczu.

Lipaza językowa i żołądkowa hydrolizuje głównie TAG zawierające kwasy tłuszczowe o krótkiej lub średniej długości łańcucha (< 12 at. C). Występują one w tłuszczach mleka, przez co lipaza językowa i żołądkowa odgrywa ważną rolę w **trawieniu lipidów** u niemowląt. Niewielkie ilości lipazy powstają także w jelitach.

Znaczenie diagnostyczne lipazy jest podobne jak α-amylazy z wyłączeniem chorób ślinianek. Lipaza wykazuje natomiast większą swoistość narządową w odniesieniu do trzustki.

➢ Wartości referencyjne

Surowica
13-60 U/l (0,22-1,00 µkat/l)

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższona aktywność lipazy w surowicy może świadczyć o:

- zapaleniu trzustki
- niedrożność jelit
- perforacji wrzodu dwunastnicy i zapalenie otrzewnej
- niedrożności przewodu trzustkowego

Ocena aktywności lipazy zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*bufor Tris 40 mmol/l, kolipaza 1 mg/l, deoksycholan mmol/l, taurodesoksykolatan 7,0 mmol/l, pH 8*) • **odczynnik B** (*bufor winianowy 15 mmol/l, ester (6'-metylorezorufiny) kwasu 1,2-O-dialuril-rac-glicerol-3- glutarowego 0,7 mmol/l, jony wapnia 1 mmol/l, pH 4*) • **standard** (*standard lipazy*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Aktywność** (stężenie katalityczne) **lipazy** w próbkach surowicy ocenia się kolorymetryczną metodą enzymatyczną. Lipaza katalizuje hydrolizę syntetycznego substratu (ester 6-metylo-rezorufinowy kwasu 1,2-O-dilaurylo-glicerolo-3-glutarowego), w wyniku której otrzymuje się 1,2-O-dilaurylo-glicerol i nietrwały produkt przejściowy – kwas glutarowy-(6-metylorezorufina). W roztworze zasadowym dochodzi do spontanicznego rozkładu produktu na kwas glutarowy i metylorezorufinę. ester 6-metylo-rezorufinowy kwasu 1,2-O-dilaurylo-glicerolo-3-glutarowego $\xrightarrow{\text{lipaza}}$ 1,2-O-dilaurylo-glicerol + kwas glutarowy-(6-metylorezorufina) kwas glutarowy-(6-metylorezorufina) $\xrightarrow{H_2O}$ kwas glutarowy + metylorezorufina Szybkość powstawania metylorezorufiny mierzona przy długości fali 560 nm jest wprost proporcjonalna do aktywności lipazy w badanej próbie.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **odczynniki** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do dwóch oznaczonych kuwet: a) **Standard**: 1000 µl **odczynnika A** i 10 µl **standardu** b) **Próba badana**: 1000 µl **odczynnika A** i 10 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 1 minutę w temperaturze pokojowej 5. Odpipetować do kuwet **a)** oraz **b)** po 200 µl **odczynnika B** 6. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 7. Inkubować kuwety przez 3 minuty w temperaturze pokojowej 8. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) przy długości fali 560 nm i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych 9. Obliczyć różnicę absorbancji pomiędzy kolejnymi pomiarami oraz średnią różnic absorbancji na minutę (ΔA/min)
Obliczenia	**Stężenie katalityczne lipazy** obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $\text{Aktywność lipazy [U/l]} = \frac{\Delta A/\min_{\text{Próby}}}{\Delta A/\min_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$

Interferencje	Hemoliza
Zagadnienia do opracowania	1. Trawienie tłuszczów pokarmowych 2. Mechanizmy regulujące trawienie tłuszczów
Pytania kontrolne	1. Porównaj działanie lipazy językowej/żołądkowej oraz lipazy trzustkowej 2. W jaki sposób kolipaza umożliwia trawienie tłuszczów? 3. Porównaj trawienie tłuszczów pokarmowych u osób zdrowych i u osób z niewydolnością trzustki 4. Omów regulację trawienia tłuszczów za pomocą hormonów przewodu pokarmowego 5. Omów mechanizmy działania oraz zastosowanie blokerów lipazy żołądkowej i trzustkowej w praktyce klinicznej 6. Omów udział lipazy w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

3.6. KREATYNINA

➢ Podstawy biochemiczne

Kreatynina (gr. *kreas*, mięso) powstaje w wyniku przemian biochemicznych kreatyny – związku azotowego znajdującego się głównie w mięśniach szkieletowych i ścięgnach. Kreatyna wytwarzana jest w wątrobie w reakcji transamidynacji glicyny z udziałem argininy (przeniesienie grupy amidynowej), a następnie metylacji powstałego guanidynooctanu za pomocą S-adenozylometioniny. Fizjologiczna rola kreatyny polega na wiązaniu reszty fosforanowej pochodzącej z ATP – powstaje fosfokreatyna warunkująca czynność skurczową mięśni (rezerwuar energii). Reszta fosforanowa z ATP zostaje następnie przeniesiona na kreatynę (w spoczynku), tworząc fosfokreatynę i ADP oraz odtwarza ATP, przenosząc fosforan z fosfokreatyny na ADP (w okresie wzmożonej czynności skurczowej mięśni). Reakcje te katalizuje kinaza kreatynowa (CK). Fosfokreatyna niewykorzystana do celów energetycznych ulega nieenzymatycznej cyklizacji z odłączeniem fosforanu nieorganicznego. Powstaje kreatynina. Produkt ten nie ulega dalszej biotransformacji i w tej formie zostaje wydalany wraz z moczem.

Kreatynina jest ważnym wskaźnikiem diagnostycznym funkcji nerek. Związek ten **nie ulega absorpcji zwrotnej w kanalikach nerkowych** i jest wydalany drogą przesączania kłębuszkowego. Kreatynina obecna w surowicy jest głównie metabolitem mięśni szkieletowych. Znaczny wzrost jej stężenia we krwi obserwuje się przy spadku przesączenia kłębuszkowego dopiero o ponad 50%. Podwyższone stężenie kreatyny w surowicy jest natomiast wynikiem pierwotnego (dystrofia mięśniowa) lub wtórnego (nadczynność tarczycy, zespół Cushinga) uszkodzenia mięśni szkieletowych.

Stężenie kreatyniny w surowicy wykorzystywane jest do obliczenia wskaźnika filtracji kłębuszkowej (ang. *glomerular fliltration rate*, GFR). GFR to część krwi przepływająca przez nerki, która ulega przefiltrowaniu przez kłębuszki obu nerek. GFR wynosi około 10% objętości krwi przepływającej przez nerki, czyli około 80–120 ml/min. W praktyce klinicznej, GFR podaje się w przeliczeniu na pole powierzchni ciała i wynosi prawidłowo ≥ 90 ml/min/1,73 m^2.

➢ Wartości referencyjne

Surowica		
	0,6-1,3 mg/dl (53-115 µmol/l) [mg/dl] = [µmol/l]/88	
	Metoda Jaffé'go bez kompensacji	Metoda Jaffé'go z kompensacją
mężczyźni	**0,9-1,3 mg/dl (80-115 µmol/l)**	**0,7-1,2 mg/dl (62-106 µmol/l)**
kobiety	**0,6-1,1 mg/dl (53-97 µmol/l)**	**0,5-0,9 mg/dl (44-80 µmol/l)**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie kreatyniny w surowicy (kreatyninemia) świadczy o upośledzeniu funkcji wydalniczej nerek (ostrej lub przewlekłej niewydolności nerek)

Obniżone stężenie kreatyniny w surowicy może świadczyć o:

- odwodnieniu
- niedożywieniu
- chorobach prowadzących do zaniku mięśni
  - dystrofia mięśniowa
- małej masie mięśni szkieletowych (np. po amputacji kończyn)
- chorobach wątroby
- ciąży

Ocena stężenia kreatyniny zestawem *BioSystems*®

Odczynniki

- **odczynnik A** (*wodorotlenek sodu 0,4 mol/l*)
- **odczynnik B** (*kwas pikrynowy 25 mmol/l*)
- **standard** (*kreatynina 2 mg/dl*)

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

1. Do kuwety odpipetować równe objętości **odczynnika A** i **odczynnika B**
2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety

Zasada metody

Stężenie kreatyniny w próbkach surowicy ocenia się kolorymetryczną metodą Jaffe'go. Metoda polega na reakcji kreatyniny z kwasem pikrynowym w środowisku zasadowym, co powoduje powstanie barwnego kompleksu o maksimum absorpcji przy długości fali 500 nm. Reakcja Jaffe'go jest niespecyficzna. W celu ograniczenia wpływu innych białek krwi na wynik badania, mierzy się szybkość tworzenia wspomnianego kompleksu w krótkich okresach początkowych. Wynik badania jest dodatkowo korygowany poprzez odjęcie stałej wartości (tzw. metoda Jaffé'go z kompensacją).

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury 37°C
2. Odpipetować do dwóch oznaczonych kuwet:
   a) **Standard**: 1000 µl **OR** i 100 µl **standardu**
   b) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 100 µl **próby**
3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety
4. Umieścić kuwety w spektrofotometrze i rozpocząć pomiar czasu
5. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) standardu wobec próby ślepej przy długości fali 500 nm i wykonać kolejny pomiar (A2) po upływie 90 sekund <u>od wymieszania **OR** z próbą/standardem</u>

Obliczenia

Stężenie kreatyniny w próbie badanej obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$C_{\text{Próby}} = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{Próby}}}{(A_2 - A_1)_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}} \times \text{współczynnik rozcieńczenia próby}$$

Jeżeli do kalibracji użyto dostarczonego standardu kreatyniny:

	Metoda Jaffé'go bez kompensacji	Metoda Jaffé'go z kompensacją
$\frac{(A_2 - A_1)_{\text{Próby}}}{(A_2 - A_1)_{\text{Standardu}}}$	**× 2 = mg/dl** **× 177 = µmol/l**	**× 2-0,37 = mg/dl** **× 177-33 = µmol/l**

Interferencje

Lipemia, hemoliza, hiperbilirubinemia, związki redukujące

Zagadnienia do opracowania

1. Przemiany argininy i glicyny
2. Właściwości, metabolizm oraz znaczenie biologiczne kreatyny, fosfokreatyny i kreatyniny
3. Znaczenie kliniczne oceny stężenia kreatyniny we krwi i moczu
4. Podstawy fizjologiczne filtracji kłębuszkowej

	5. Znaczenie kliniczne GFR
Pytania kontrolne	1. Omów udział kreatyny w metabolizmie energetycznym mięśni szkieletowych 2. Omów czynniki wpływające na wielkość filtracji kłębuszkowej 3. Omów znaczenie kliniczne oceny stężenia kreatyniny we krwi oraz wskaźnika filtracji kłębuszkowej 4. Omów udział kreatyniny w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

3.7. MOCZNIK

➢ Podstawy biochemiczne

Mocznik (ang. *urea*; diamid kwasu węglowego, karbamid; $CO(NH_2)_2$) jest głównym produktem metabolizmu białek u organizmów ureotelicznych. Powstaje z amoniaku i dwutlenku węgla w reakcjach cyklu mocznikowego (ornitynowego). Bilans tego cyklu przedstawia równanie:

NH_3 + CO_2 + asparaginian + 3 ATP → mocznik + fumaran + 2 ADP + 2 Pi + AMP + PPi

Choć przy jednym obrocie cyklu zużywane są 3 cząsteczki ATP, to rozpad jednej z nich do AMP i PPi jest równoważny rozpadowi dwóch cząsteczek ATP do ADP i Pi. Dlatego też **synteza 1 cząsteczki mocznika zużywa 4 cząsteczki ATP**.

Wytwarzanie mocznika w wątrobie jest procesem ciągłym – jest to możliwe dzięki mechanizmowi aktywacji allosterycznej i indukcji substratowej oraz odtwarzaniu ornityny.

Stężenie mocznika w surowicy zależy od podaży białek z dietą, rozpadu endogennych białek oraz czynności wydalniczej nerek. Znaczny wzrost stężenia mocznika we krwi obserwuje się przy spadku przesączenia kłębuszkowego o ponad 50%.

➢ Wartości referencyjne

Surowica
15-40 mg/dl (2,5-6,7 mmol/l) [mg/dl] = [mmol/l]/0,166
azot mocznika (BUN, *blood urea nitrogen*) 7-18,8 mg/dl (5-13,4 mmol/l) **[mg/dl] = [mmol/l]/0,36**

Stężenie mocznika w okresie noworodkowym jest niższe, a u osób po 60 roku życia wyższe niż u dorosłych. Stężenie jest również nieco wyższe u mężczyzn niż u kobiet.

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie mocznika w surowicy świadczy o upośledzonej czynności wydalniczej nerek

Obniżone stężenie mocznika w surowicy może świadczyć o:

- niedożywieniu
- zespole złego wchłaniania i trawienia
- chorobach wątroby
- ciąży

Ocena stężenia mocznika zestawem *BioSystems*®

Odczynniki

- **odczynnik A** (*TRIS 100 mmol/l, α-ketoglutaran 5,6 mmol/l, ureaza > 140 U/ml, dehydrogenaza glutaminianowa > 140 U/ml, glikol etylenowy 220 g/l, azydek sodu 0,95 g/l, pH 8,0*)
- **odczynnik B** (*NADH 1,5 mmol/l, azydek sodu 9,5 g/l*)
- **standard** (*glukoza 100 mg/dl, mocznik 50 mg/dl (8,3 mmol/l, BUN 23,3 mg/dl), kreatynina 2 mg/dl*))

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

1. Do kuwety odpipetować cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B**
2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety

Zasada metody

Stężenie mocznika w próbach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną, która wykorzystuje następujące reakcje:

$$\text{mocznik} + H_2O \xleftrightarrow{\text{ureaza}} NH_4^+ + CO_2$$

$$2\,NH_4^+ + 2\,NADH + H^+ + \alpha\text{-ketoglutaran} \xleftrightarrow[\text{glutaminianowa}]{\text{dehydrogenaza}} \text{L-glutaminian} + 2\,NAD^+ + 2\,H^+ + H_2O$$

Spadek absorbancji NADH + H^+ przy 340 nm jest wprost proporcjonalny do stężenia mocznika w badanej próbie.

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury 37°C
2. Odpipetować do dwóch oznaczonych kuwet:
   a. **Standard**: 1500 µl **OR** i 10 µl **standardu**
   b. **Próba badana**: 1500 µl **OR** i 10 µl **próby**
3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety
4. Umieścić kuwety w spektrofotometrze i rozpocząć pomiar czasu
5. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) przy długości fali 340 nm po upływie 30 sekund i wykonać kolejny pomiar (A2) po 90 sekundach <u>od wymieszania **OR** z próbą/standardem</u>

Obliczenia

Stężenie mocznika w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$C_{\text{Próby}} = \frac{(A_1 - A_2)_{\text{Próby}}}{(A_1 - A_2)_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}} \times \text{współczynnik rozcieńczenia próby}$$

Jeżeli do kalibracji użyto dostarczonego wzorca mocznika:

	Surowica i osocze
$\frac{(A_1 - A_2)_{\text{Próby}}}{(A_1 - A_2)_{\text{Standardu}}}$	**× 50 = mg/dl mocznika** **× 23,3 = mg/dl BUN** **× 8,3 = mmol/l mocznika**

Interferencje

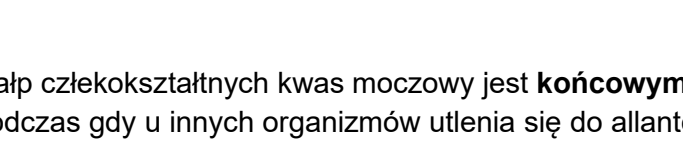
Hemoliza, amoniak

Zagadnienia do opracowania	1. Reakcje cyklu mocznikowego 2. Regulacja cyklu mocznikowego 3. Pozawątrobowe powstawanie mocznika 4. Defekty syntezy mocznika 5. Znaczenie kliniczne oceny stężenia mocznika we krwi
Pytania kontrolne	1. Wymień reakcje odwracalne cyklu mocznikowego 2. Omów bilans energetyczny cyklu mocznikowego 3. Omów regulację cyklu mocznikowego 4. Omów rolę mocznika w reabsorpcji wody w kanalikach nerkowych 5. Omów udział mocznika w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

3.8. KWAS MOCZOWY

➢ Podstawy biochemiczne

Kwas moczowy (ang. *uric acid*; 2,6,8-trioksypuryna) to pochodna zasad purynowych, czyli zasad azotowych zbudowanych ze skondensowanych pierścieni pirymidyny i imidazolu (adenina i guanina) wchodzących w skład kwasów nukleinowych. Kwas moczowy powstaje w reakcjach katalizowanych przez oksydazę ksantynową (EC 1.17.3.2):



hipoksantyna + H_2O + O_2 → ksantyna + H_2O_2
ksantyna + H_2O + O_2 → kwas moczowy + H_2O_2

Ksantyna może także powstawać z guaniny w reakcji katalizowanej przez deaminazę guaninową.

U człowieka i małp człekokształtnych kwas moczowy jest **końcowym produktem metabolizmu puryn**, podczas gdy u innych organizmów utlenia się do allantoiny, kwasu alantoinowego, mocznika, a nawet amoniaku. Stężenie kwasu moczowego we krwi zależy w większym stopniu od syntezy *de novo* puryn/rozpadu kwasów nukleinowych niż od pokarmowej podaży zasad purynowych. Stężenie kwasu moczowego zależy też od płci i jest większe u mężczyzn. Około **75% kwasu moczowego jest wydalane wraz z moczem**. Reszta przechodzi do przewodu pokarmowego, gdzie rozkładana jest przez bakterie jelitowe i wydalana wraz z kałem.

Stężenie kwasu moczowego w surowicy zależy od:

- endogennej syntezy puryn
- podaży puryn wraz z dietą
- nerkowego klirens kwasu moczowego.

W środowisku kwaśnym, szczególnie podczas hiperurykemii, kwas moczowy tworzy trudno rozpuszczalne w wodzie kryształy moczanu sodu, które mogą odkładać się w tkankach i narządach. W lecznictwie stosuje się inhibitory oksydazy ksantynowej (np. allopurynol), które hamują wytwarzanie kwasu moczowego. W wyniku ich działania zwiększa się nerkowe wydalanie hipoksantyny i ksantyny, co zmniejsza ryzyko tworzenia złogów moczanu sodu w nerkach i mięśniach.

Kwas moczowy jest głównym antyoksydantem krwi – ma zdolność „wymiatania" anionorodników ponadtlenkowych, rodników hydroksylowych, nadtlenku wodoru oraz nadtlenoazotynu. Stanowi około **55-60% pojemności antyoksydacyjnej osocza** oraz **około 70% pojemności antyoksydacyjnej śliny**. W wysokich stężeniach ma jednak działanie prooksydacyjne – może generować wolne rodniki (np. rodnik aminokarbolynowy) w reakcji z nadtlenoazotynem. Aktywność proutleniająca kwasu moczowego może tłumaczyć dlaczego hiperurykemia jest znaczącym czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego.

➢ Wartości referencyjne

Surowica	
3-7 mg/dl (180-240 µmol/l) [mg/dl] = [µmol/l]/60	
mężczyźni	**3,5-7,2 mg/dl (210-420 µmol/l)**
kobiety	**3-6 mg/dl (180-350 µmol/l)**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie kwasu moczowego w surowicy (hiperurykemia) może świadczyć o:

- wzmożonej biosyntezie kwasu moczowego
  - pierwotna dna moczanowa
  - choroba Lescha-Nyhana
- nadmiernej podaży zasad purynowych w pokarmach (największa ilość puryn występuje w produktach bogatych w białko (tj. mięso, wędliny, nabiał, rośliny strączkowe))
- upośledzonym wydalaniu kwasu moczowego wraz z moczem
  - ostra i przewlekła niewydolność nerek
  - stosowanie diuretyków
  - niedoczynność tarczycy
  - zatrucie czadem lub związkami ołowiu
- zwiększonym obrocie metabolicznym kwasu moczowego
  - niedokrwistość hemolityczna wywołana talasemią lub hemoglobinopatią S
  - łuszczyca
  - białaczki
- gwałtownym rozkładzie komórek (zwłaszcza bogatych w jądra)
  - zespół lizy nowotworowej podczas chemioterapii

Obniżone stężenie kwasu moczowego w surowicy (hipourykemia) krwi może świadczyć o:

- wrodzonym niedoborze oksydazy ksantynowej
- przyjmowaniu inhibitorów oksydazy ksantynowej (np. allopurynol, febuksostat)
- wzmożonym wydalaniu kwasu moczowego przez nerki
  - upośledzone wchłanianie zwrotne kwasu moczowego przez cewki nerkowe (wrodzone lub nabyte tubulopatie)
  - stosowanie leków urykozurycznych (moczanopędnych), np. salicylanów czy glukokortykoidów
- ciąży
- nieadekwatnym wydzielaniu ADH i akromegalii

Ocena stężenia kwasu moczowego zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*fosforan sodu100 mmol/l, detergent 1,5 g/l, dwuchlorofenylosulfonian 4 mmol/l, urykaza > 0,12 U/ml, oksydaza askorbinowa > 5 U/ml, peroksydaza >1 U/ml, 4-aminoantypiryna 0,5 mmol/l, pH 7,8*) • **standard** (*kwas moczowy 6 mg/dl*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Stężenie kwasu moczowego** w próbach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną wykorzystującą poniższe reakcje: $\text{kwas moczowy} + O_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{urykaza}} \text{alantoina} + CO_2 + H_2O_2$ $2\,H_2O_2 + \text{fenol} + \text{4-aminoantypiryna} \xrightarrow{\text{peroksydaza}} \text{chinonoimina} + 4\,H_2O$ Powstaje czerwono zabarwiona chinonoimina, której natężenie barwy przy 500 nm jest wprost proporcjonalne do stężenia kwasu moczowego w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do trzech oznaczonych kuwet: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 25 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 25 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 25 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 5 minut w temperaturze 37°C 5. Zarejestrować absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 500 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie kwasu moczowego** w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}} \times \text{współczynnik rozcieńczenia próby}$ Jeżeli do kalibracji użyto załączonego standardu kwasu moczowego: $\frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}}$ × 6 = mg/dl kwasu moczowego $\frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}}$ × 357 = µmol/l kwasu moczowego
Interferencje	Hemoglobina, bilirubina, lipemia
Zagadnienia do opracowania	1. Rozpad zasad purynowych i pirymidynowych 2. Zaburzenia metabolizmu nukleotydów 3. Budowa, właściwości biologiczne oraz przemiany kwasu moczowego 4. Podłoże biochemiczne hiperurykemii

	5. Hiperurykemia jako przyczyna chorób układu sercowo-naczyniowego oraz chorób metabolicznych
Pytania kontrolne	1. Omów właściwości antyoksydacyjne i prooksydacyjne kwasu moczowego 2. Porównaj przyczyny pierwotnej i wtórnej dny moczanowej 3. Omów farmakologiczne metody leczenia hiperurykemii 4. Omów udział kwasu moczowego w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

4. BIOMARKERY CHORÓB METABOLICZNYCH

4.1. GLUKOZA

➢ Podstawy biochemiczne

Glukoza (D-glukoza; $C_6H_{12}O_6$) jest monosacharydem należącym do aldoheksoz. W organizmach roślinnych powstaje w procesie fotosyntezy:

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O \xrightarrow{\text{światło słoneczne}} C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2\uparrow$$

Glukoza występuje w dużych ilościach w owocach winogron (stąd nazwa cukier gronowy) oraz w miodzie. W organizmach roślinnych magazynowana jest w postaci skrobi.

Do organizmu człowieka dostarczana jest wraz z dietą oraz magazynowana w mięśniach, wątrobie i tkance tłuszczowej w postaci glikogenu. Glukoza stanowi **podstawowy substrat energetyczny** dla ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Neurony nie potrafią magazynować żadnych substratów energetycznych, dlatego też, właściwe funkcjonowanie OUN uzależnione jest od systematycznego dopływu glukozy.

Glukoza przekształcana jest w glikolizie do pirogronianu lub mleczanu, a następnie w cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA) do CO_2 i H_2O. Synteza glukozy z substratów nie cukrowych nosi natomiast nazwę glukoneogenezy i zachodzi głównie w wątrobie i korze nerki.

Stężenie glukozy we krwi określa się mianem glikemii. Parametr ten jest dobrym wskaźnikiem gospodarki węglowodanowej. Glikemia zależy od:

- podaży węglowodanów w pokarmach
- nasilenia glukoneogenezy, glikogeneolizy i glikolizy, które pozostają pod wpływem czynników hormonalnych (**ACTH** (hormon adrenokortykotropowy), **hormon wzrostu**, **hormony tarczycy**, **adrenalina** i **glukagon** podwyższają stężenie glukozy we krwi, natomiast **insulina** obniża stężenie glukozy we krwi)
- stopnia zużycia glukozy przez poszczególne narządy
- utraty glukozy wraz z moczem (glukozuria).

➢ Wartości referencyjne

Osocze	
[mg/dl] = [mmol/l] x 18	
dzieci, dorośli	**70-100 mg/dl (3,9-5,5 mmol/l)**

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie glukozy w osoczu (hiperglikemia) może świadczyć o:

- niedoborze insuliny
  - cukrzyca typu 1
- zaburzeniach sygnalizacji insulinowej
  - insulinooporność
  - cukrzyca typu 2
  - zespół metaboliczny
  - przewlekłe stany zapalne
  - nowotwory
  - odkładanie złogów hemosyderyny
- wzmożonej sekrecji hormonów pobudzających glukoneogenezę i glikogenolizę
  - *hypercorticismus*
  - *glucagonoma*
  - *pheochromocytoma*
  - *hyperthyerosis*
  - *acromegalia*
- przewlekłej lub ostrej mocznicy
- zawale mięśnia sercowego
- zatruciu tlenkiem węgla
- wstrząsie
- przyjmowaniu niektórych leków, np. diuretyków czy doustnych leków antykoncepcyjnych
- stresie

Zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) **cukrzycę** rozpoznaje się po stwierdzeniu ≥ 1 z poniższych kryteriów:

- **glikemia na czczo** ≥ 126 mg/dl (7 mmol/l; dwukrotnie w innych dniach)
- **jeżeli stężenie glukozy w osoczu wynosi 100-125 mg/dl** (5,6-6,9 mmol/l) należy wykonać doustny test obciążenia glukozą (OGTT; test tolerancji 75 g glukozy z pomiarem glikemii na czczo i po 2 h); **glikemia po 2 h w OGTT ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l)** upoważnia do rozpoznania cukrzycy
- **glikemia przygodna** ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) z typowymi objawami hiperglikemii (pragnienie, wielomocz, osłabienie, kwasica ketonowa)
- **hemoglobina glikowana** (**HbA1c**) ≥ 6,5% (48 mmol/mol)

Obniżone stężenie glukozy w osoczu (hipoglikemia) może świadczyć o:

- niedostatecznej podaży węglowodanów z pokarmem
  - głodzenie
  - jadłowstręt
- upośledzonym wchłanianiu glukozy z przewodu pokarmowego
  - zespół wadliwego wchłaniania
- nadmiernym zużyciu glukozy
  - wzmożony wysiłek fizyczny
  - nowotwory
- upośledzonej glukoneogenezie

    - uszkodzenie miąższu wątroby
    - niedobór hormonu wzrostu, glukokortykoidów czy hormonów tarczycy
- wzmożonej glikogenolizie
    - glikogenozy
- wzmożonej glikogenogenezie
    - *insulinoma*
    - przyjmowanie doustnych leków przeciwcukrzycowych, propranololu czy salicylanów
- wrodzonych defektach metabolicznych
    - nietolerancja fruktozy
    - galaktozemia

Ocena stężenia glukozy zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*fosforan sodu 100 mmol/l, fenol 5 mmol/l, oksydaza glukozowa > 10 U/ml, peroksydaza > 1 U/ml, 4-aminoantypiryna 0,4 mmol/l, pH 7,5*) • **standard** (*glukoza 100 mg/dl*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Stężenie glukozy** w próbkach osocza oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną. Glukoza pod wpływem oksydazy glukozowej utlenia się do kwasu glukonowego. Produkt uboczny reakcji utleniania, nadtlenek wodoru, reaguje następnie z fenolem i 4-aminoantypiryną. Powstaje czerwono zabarwiona chinonoimina, której natężenie barwy przy 500 nm jest wprost proporcjonalne do stężenia glukozy w badanej próbce. $\text{glukoza} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{oksydaza glukozowa}} \text{kwas glukonowy} + H_2O_2$ $2\,H_2O_2 + \text{fenol} + \text{4-aminoantypiryna} \xrightarrow{\text{peroksydaza}} \text{chinonoimina} + 4\,H_2O$
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **odczynniki** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do trzech oznaczonych kuwet: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** 10 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 10 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 10 µl **próby badanej** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 10 minut w temperaturze pokojowej lub przez 5 minut w temperaturze 37°C 5. Zmierzyć absorbancję (A) standardu i próby badanej wobec próby ślepej przy długości fali 500 nm
Obliczenia	**Stężenie glukozy** w próbie badanej obliczyć za pomocą poniższego wzoru: $C_{\text{Próby}} = \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$
Interferencje	Kwas askorbinowy, kwas moczowy, mannoza, galaktoza
Zagadnienia do opracowania	1. Budowa i właściwości cukrów prostych 2. Reakcje charakterystyczne monosacharydów 3. Glikoliza tlenowa 4. Glikoliza beztlenowa 5. Regulacja glikolizy 6. Metaboliczne losy pirogronianu 7. Wrodzone defekty glikolizy 8. Cykl Krebsa

9. Glukoneogeneza
10. Choroby spichrzania glikogenu (glikogenozy)
11. Zasada działania glukometru paskowego

Pytania kontrolne

1. Wymień reakcje odwracalne i nieodwracalne zachodzące podczas glikolizy i cyklu Krebsa
2. Wymień reakcje fosforylacji substratowej zachodzące podczas glikolizy i cyklu Krebsa
3. Porównaj regulację metaboliczną glikolizy i cyklu Krebsa
4. Omów regulację metaboliczną glukoneogenezy
5. Dlaczego skutki niedoboru enzymów glikolizy są najbardziej dotkliwe dla erytrocytów?
6. Omów powiązania cyklu Krebsa z innymi przemianami biochemicznymi
7. Porównaj podłoże biochemiczne oraz obraz kliniczny 8 typów glikogenoz
8. Omów kryteria diagnostyczne cukrzycy
9. Omów zasadę działania glukometru paskowego
10. Omów udział glukozy w patogenezie chorób cywilizacyjnych

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

4.2. HEMOGLOBINA GLIKOWANA

➢ Podstawy biochemiczne

Hemoglobina glikowana (niepoprawna nazwa glikohemoglobina lub hemoglobina glikozylowana) powstaje w wyniku nieenzymatycznego przyłączania cząsteczek glukozy do wolnej grupy aminowej lub do obu N-końcowych reszt waliny łańcucha β-globiny. Istnieją różne rodzaje hemoglobiny glikowanej. W medycynie laboratoryjnej zastosowanie znalazła jedynie HbA_1C.

Przyłączanie cząsteczek glukozy do hemoglobiny prowadzące do powstania HbA_1C jest procesem nieodwracalnym. Okres półtrwania hemoglobiny jest równy przeżyciu krwinki czerwonej (około 120 dni), przez co hemoglobina glikowana **obrazuje średnie stężenie glukozy we krwi z ostatnich kilku miesięcy**. Zawartość hemoglobiny glikowanej przedstawia się jako procent HbA_1C do całkowitej ilości hemoglobiny. Stężenie HbA_1C informuje o skuteczności leczenia cukrzycy, pomaga w planowaniu dalszego leczenia oraz pozwala oszacować ryzyko wystąpienia powikłań choroby podstawowej.

➢ Wartości referencyjne

Poniższe wartości referencyjne zostały ustalone przez *Diabetes Control and Complications Trial Research Group* (DCCT) i zostały zaakceptowane dla populacji osób bez cukrzycy oraz do oceny stopnia kontroli poziomu glukozy we krwi u pacjentów z cukrzycą.

Surowica		
IFCC (mmol/mol)	NGSP-DCCT (%)	
< 39	**> 5,7**	wartości docelowe
39-46	**5,7-6,4**	stan przedcukrzycowy
> 48	**> 6,5**	cukrzyca

IFCC – *International Federation of Clinical Chemistry*
NGSP-DCCT - *National Glycohemoglobin Standarization Program- Diabetes Control and Complications Trial*

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie HbA_1C w surowicy może świadczyć o źle wyrównanej cukrzycy i wysokim prawdopodobieństwie wystąpienia ciężkich powikłań naczyniowych

Ocena stężenia hemoglobiny glikowanej zestawem *BioSystems®*

Odczynniki	• **odczynnik A** (*zawiesina cząsteczek lateksu, azydek sodu 0,95 g/l, pH 8,0*) • **odczynnik B** (*przeciwciała anty-HbA_1C, konserwanty, pH 6,0*) • **standard** (*HbA_1C*) Uwaga! Surowica użyta do przygotowania standardu była ujemna pod względem antygenu HBs oraz przeciwciał anty-HCV i anty-HIV. Do tego wzorca należy jednak podchodzić ostrożnie, ponieważ jest on potencjalnie zakaźny
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Stężenie HbA_1C** w próbkach surowicy ocenia się metodą aglutynacji wykorzystującą reakcję antygenów HbA_1C ze specyficznymi przeciwciałami anty-HbA_1C. Metoda polega na zmieszaniu hemolizatu krwi z zawiesiną cząstek lateksu, a następnie dodaniu do mieszaniny przeciwciał anty-HbA_1C. Hemoglobina glikowana obecna w hemolizacie jest adsorbowana na powierzchni cząstek lateksu w proporcji odpowiadającej jej stężeniu w badanej próbce. Dodatek przeciwciał powoduje tworzenie aglutynatów o maksimum absorbcji 670 nm. Produkcja aglutynatów jest wprost proporcjonalna do stężenia HbA_1C w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **odczynniki** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Przygotować hemolizat krwi: odpipetować do kuwety 1000 µl **wody destylowanej** i 10 µl **krwi** 3. Wytrząsnąć delikatnie kuwetę, unikając tworzenia piany 4. Inkubować kuwetę przez 5 minut w temperaturze pokojowej 5. Do kuwety dodać trzy objętości (3V) **próby**, sto dziewięćdziesiąt objętości (190V) **odczynnika A** i czterdzieści objętości (40V) **odczynnika B** 6. Zarejestrować absorbancję standardu i próby badanej wobec próby ślepej przy długości fali 670 nm
Obliczenia	**Stężenie HbA_1C** w próbie badanej obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: HbA_1C - NGSP - DCCT (%) = 0,0915 × HbA_1C - IFCC (mmol/mol) + 2,15
Interferencje	Brak
Zagadnienia do opracowania	1. Budowa hemoglobiny 2. Glikacja białek 3. Znaczenie kliniczne hemoglobiny glikowanej
Pytania kontrolne	1. Wymień wczesne, pośrednie oraz późne produkty glikacji białek 2. Omów mechanizm glikacji białek 3. Omów efekty stymulacji receptora RAGE przez AGE 4. Omów kryteria diagnostyczne cukrzycy 5. Omów zastosowanie leków o działaniu antyglikacyjnym w lecznictwie

6. Omów udział hemoglobiny glikowanej w patogenezie chorób cywilizacyjnych

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

4.3. FRUKTOZAMINA

➢ Podstawy biochemiczne

Poza hemoglobiną, glikacji ulegają także inne białka osocza. **Fruktozamina** jest miarą glikacji pozostałych białek krwi (głównie albumin). Fruktozamina powstaje w reakcji glukozy z grupą ε-aminową reszt lizynowych tych białek, a jej stężenie w osoczu **odzwierciedla średnią glikemię z ostatnich 2-3 tygodni** (białka osocza charakteryzuje krótszy (w porównaniu do HbA1C) okres półtrwania wynoszący 15-20 dni).

Ze względu na duże wahania wyników związane z różnymi stanami klinicznymi (utrata albumin, choroby wątroby, choroby tarczycy) oznaczanie stężenia fruktozaminy nie jest tak częste jak ocena stężenia HbA_1C. Pomiar stężenia fruktozaminy powinno się wykonywać w przypadku braku możliwości oceny HbA_1C lub kiedy nie jest ona wiarygodna (hemoglobinopatie, żółtaczka hemolityczna, zaburzenia glikacji hemoglobiny), u kobiet ciężarnych oraz u pacjentów z chwiejnym przebiegiem cukrzycy.

➢ Wartości referencyjne

Surowica
1,9-2,9 mmol/l

Podane zakresy mają jednie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

Wartości są nieco niższe (5%) u dzieci. Wartości referencyjne fruktozaminy zależą od stężenia albumin.

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie fruktozaminy w surowicy może świadczyć o źle wyrównanej cukrzycy i wysokim prawdopodobieństwie wystąpienia ciężkich powikłań naczyniowych.

Ocena stężenia fruktozaminy zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*błękit nitrotetrazolowy (NBT) 0,25 mmol/l, bufor węglanowy 0,2 mol/l, pH 10,35*) • **standard** (*fruktozamina*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Stężenie fruktozaminy** w próbach surowicy ocenia się metodą kolorymetryczną. Glikowane białka krwi są redukowane do soli tetrazoliowych za pomocą błękitu nitrotetrazolowego (NBT) w środowisku zasadowym. Szybkość tworzenia fruktozaminy przy 530 nm jest wprost proporcjonalna do stężenia glikowanych białek w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do dwóch oznaczonych kuwet: a) **Standard**: 1000 µl **OR** i 50 µl **standardu** b) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 50 µl **próby badanej** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 10 minut w temperaturze 37°C 5. Zmierzyć absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 530 nm w odniesieniu do próby ślepej (woda destylowana)
Obliczenia	**Stężenie fruktozaminy** w próbie badanej obliczyć przy pomocy wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{Próby}}}{(A_2 - A_1)_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$
Interferencje	Brak
Zagadnienia do opracowania	1. Budowa i właściwości białek osocza 2. Glikacja białek 3. Znaczenie kliniczne fruktozaminy
Pytania kontrolne	1. Wymień wczesne, pośrednie oraz późne produkty glikacji białek 2. Omów mechanizm glikacji białek 3. Omów rolę produktów Amadori w procesie glikacji białek 4. Omów kryteria diagnostyczne cukrzycy 5. Omów zastosowanie leków o działaniu antyglikacyjnym w lecznictwie 6. Omów udział fruktozaminy w patogenezie chorób cywilizacyjnych

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

5. BIOMARKERY CHORÓB PRZEWODU POKARMOWEGO

5.1. AMINOTRANSFERAZA ASPARAGINIANOWA

➢ Podstawy biochemiczne

Aminotransferaza asparaginianowa (ang. *aspartate transaminase*; L-asparaginian:2-oksoglutaran aminotransferaza; **AST**, ASAT, ASPAT, GOT; EC 2.6.1.1) jest narządowo niespecyficznym enzymem indykatorowym (wskaźnikowym) biorącym udział w metabolizmie białek. Należy do transferaz, które w reakcjach transaminacji przenoszą grupy α-aminowe aminokwasów na α-ketokwasy. AST katalizuje odwracalną reakcję przeniesienia grupy α-aminowej L-asparaginianu na α-ketoglutaran z utworzeniem L-glutaminianu i szczawiooctanu. Kofaktorem AST jest fosforan pirydoksalu.

AST jest pochodzenia **cytoplazmatycznego** i **mitochondrialnego**. AST występuje głównie w komórkach wątroby, mięśniach poprzecznie prążkowanych (w tym w sercu), ścianach cewek nerkowych, mózgu oraz erytrocytach. Enzym ten nie jest wydzielany do krwi, dlatego każdy wzrost aktywności AST w surowicy jest wynikiem uszkodzenia błony komórkowej lub śmierci komórek. Uszkodzenie miąższu wątroby przez czynnik zakaźny lub toksyczny skutkuje wzrostem aktywności AST nawet 20-50 razy powyżej wartości referencyjnych. Co ważne, aktywność AST w surowicy jest proporcjonalna do rozległości uszkodzenia narządu. W diagnostyce laboratoryjnej wykorzystuje się wskaźnik de Ritisa, który jest ilorazem aktywności AST do aktywności aminotrasferazy alaninowej (ALT). W warunkach fizjologicznych wskaźnik ten jest wyższy od 1, a w chorobach miąższu wątroby < 1.

U 1-3% populacji, AST występuje w formie makroenzymu, który tworzy połączenia z glikoproteinami, lipoproteinami oraz immunoglobulinami. W sytuacjach patologicznych, makroenzymy występują najczęściej u osób z chorobami autoimmunologicznymi i nowotworowymi.

➢ Wartości referencyjne

	Surowica	
	37°C	30°C
bez fosforanu pirydoksalu	**< 40 U/l = 0,67 µkat/l**	**< 25 U/l = 0,42 µkat/l**
z fosforanem pirydoksalu	**< 50 U/l = 0,83 µkat/l**	**< 30 U/l = 0,50 µkat/l**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższona aktywność AST w surowicy może świadczyć o:

- uszkodzeniu wątroby
  - wirusowe zapalenie wątroby
  - polekowe lub toksyczne zapalenie wątroby
  - alkoholowa choroba wątroby
  - niealkoholowe stłuszczenie wątroby
  - cholestaza wątrobowa
  - rak wątroby
- martwicy mięśnia sercowego
  - zawał mięśnia sercowego
- uszkodzeniu mięśni szkieletowych
  - rabdomioliza (spowodowana np. zatruciem statynami, czadem czy etanolem)
  - dystrofia mięśniowa
  - miopatia tyreotoksyczna
  - intensywny wysiłek fizyczny
- uszkodzeniu mózgu
  - udar mózgu
- ostrym zapaleniu trzustki
- mononukleozie zakaźnej
- hemochromatozie
- hemolizie

Ocena aktywności AST zestawem *BioSystems*®

Odczynniki

- **odczynnik A** (*TRIS 121 mmol/l, L-asparaginian 362 mmol/l, dehydrogenaza jabłczanowa > 460 U/l, pH 7,8*)
- **odczynnik B** (*NADH 1,9 mmol/l, α-ketoglutaran 75 mmol/l, wodorotlenek sodu 148 mmol/l, azydek sodu 9,5 g/l*)
- **odczynnik C** (*fosforan pirydoksalu 10 mmol/l*)

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

A. **Metoda bez fosforanu pirydoksalu**:
1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B**
2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety

B. **Metoda z fosforanem pirydoksalu**:
1. Do kuwety dodać 100 objętości (100V) **OR** (odczynnik z punktu A) i jedną objętość (1V) **odczynnika C**
2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety

Zasada metody

Aktywność (stężenie katalityczne) **AST** w próbkach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną wykorzystującą następujące reakcje:

$$\text{L-asparginian} + \alpha\text{-ketoglutaran} \xrightarrow{\text{AST}} \text{L-glutaminian} + \text{szczawiooctan}$$

$$\text{szczawiooctan} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{dehydrogenaza jabłczanowa}} \text{jabłczan} + \text{NAD}^+$$

Spadek absorbancji NADH + H^+ mierzony przy długości fali 340 nm jest wprost proporcjonalny do aktywności AST w badanej próbie.

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury reakcji
2. Do kuwety odpipetować w zależności od temperatury reakcji:

Temperatura reakcji	37°C	30°C
OR	**1000 µl**	**1000 µl**
Próba badana	**50 µl**	**100 µl**

3. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety i rozpocząć pomiar czasu
4. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) przy długości fali 340 nm po upływie 1 minuty od wymieszania OR z próbą i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych
5. Obliczyć różnicę absorbancji pomiędzy kolejnymi pomiarami oraz średnią różnic absorbancji na minutę (ΔA/min)

Obliczenia

Aktywność (stężenie katalityczne) **AST** w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$\frac{U}{l} = \frac{Vt \times 10^6}{\varepsilon \times I \times Vs} \times \frac{\Delta A}{min}$$

Molowy współczynnik absorpcji (ε) NADH przy długości fali 340 nm wynosi 6300, droga optyczna (l) – 1 cm, całkowita objętość reakcji (Vt) – 1,05 ml przy temperaturze 37°C i 1,1 ml przy 30°C, objętość próby badanej (Vs) – 0,05 ml przy 37°C i 0,1 ml przy 30°C, a 1 U/l równa się 0,0166 µkat/l

Obliczyć stężenie katalityczne AST za pomocą następujących wzorów:

	37°C	30°C
ΔA/min	**× 3333 = U/l** **× 55,55 = µkat/l**	**× 1746 = U/l** **× 29,1 = µkat/l**

Interferencje

Lipemia

Zagadnienia do opracowania

1. Enzymologia: miejsce aktywne enzymu, mechanizm biokatalizy, aktywność enzymu, inhibicja enzymów, regulacja aktywności enzymatycznej, enzymy wielofunkcyjne, podział enzymów pod kątem klinicznym
2. Metabolizm aminokwasów: transaminacja, cykl alaninowy, deaminacja
3. Znaczenie kliniczne oceny aminotransferaz w surowicy

Pytania kontrolne

1. Omów rolę fosforanu pirydoksalu w reakcji katalizowanej przez AST
2. Omów znaczenie biologiczne cyklu alaninowego
3. Omów znaczenie kliniczne oceny aktywności AST w surowicy
4. Omów udział AST w patogenezie chorób cywilizacyjnych

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

5.2. AMINOTRANSFERAZA ALANINOWA

➢ Podstawy biochemiczne

Aminotransferaza alaninowa (ang. *alanine transaminase*; L-alanina:2-oksoglutaran aminotransferaza; **ALT**, ALAT, GPT; EC 2.6.1.2) jest narządowo niespecyficznym enzymem indykatorowym (wskaźnikowym) biorącym udział w metabolizmie białek. Należy do transferaz, które w reakcjach transaminacji przenoszą grupy α-aminowe aminokwasów na α-ketokwasy. ALT katalizuje odwracalną reakcję przeniesienia grupy aminowej L-alaniny na α-ketoglutaran z utworzeniem L-glutaminianu i pirogronianu. Kofaktorem ALT jest fosforan pirydoksalu.

Wyróżnia się dwa izoenzymy aminotransferazy alaninowej: ALT-1 i ALT-2. Enzym ten występuje głównie w cytoplazmie komórek wątroby (ALT-1). W mniejszych ilościach zlokalizowany jest także w mięśniach poprzecznie prążkowanych (ALT-2), sercu (ALT-1), ścianach cewek nerkowych (ALT-1), mózgu oraz erytrocytach. ALT nie jest wydzielany do krwi, dlatego każdy wzrost aktywności enzymu w surowicy jest wynikiem uszkodzenia błony komórkowej lub śmierci komórek. W diagnostyce laboratoryjnej wykorzystuje się wskaźnik de Ritisa, który jest ilorazem aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AST) do aktywności ALT. W warunkach fizjologicznych wskaźnik ten jest wyższy od 1, a w chorobach miąższu wątroby < 1. ALT jest bardziej swoistym markerem uszkodzenia wątroby niż AST.

➢ Wartości referencyjne

	Surowica	
	37°C	30°C
bez fosforanu pirydoksalu	**< 40 U/l = 0,67 µkat/l**	**< 25 U/l = 0,42 µkat/l**
z fosforanem pirydoksalu	**< 50 U/l = 0,83 µkat/l**	**< 30 U/l = 0,50 µkat/l**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższona aktywność ALT w surowicy może świadczyć o:

- uszkodzeniu wątroby
  - wirusowe zapalenie wątroby
  - polekowe lub toksyczne zapalenie wątroby
  - alkoholowa choroba wątroby
  - niealkoholowe stłuszczenie wątroby
  - cholestaza wątrobowa
  - rak wątroby
- martwicy mięśnia sercowego
  - zawał mięśnia sercowego

- uszkodzeniu mięśni szkieletowych
    - rabdomioliza (spowodowana np. zatruciem statynami, czadem czy etanolem)
    - dystrofia mięśniowa
    - miopatia tyreotoksyczna
    - intensywny wysiłek fizyczny
- uszkodzeniu mózgu
    - udar mózgu
- ostrym zapaleniu trzustki
- mononukleozie zakaźnej
- hemochromatozie
- hemolizie

Ocena aktywności ALT zestawem *BioSystems*®

Odczynniki

- **odczynnik A** (*TRIS 121 mmol/l, L-alanina 362 mmol/l, dehydrogenaza mleczanowa > 660 U/l, pH 7,8*)
- **odczynnik B** (*NADH 1,9 mmol/l, α-ketoglutaran 75 mmol/l, wodorotlenek sodu 148 mmol/l, azydek sodu 9,5 g/l*)
- **odczynnik C** (*fosforan pirydoksalu 10 mmol/l*)

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

A. **Metoda bez fosforanu pirydoksalu**:
1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B**
2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety

B. **Metoda z fosforanem pirydoksalu**:
1. Do kuwety dodać 100 objętości (100V) **OR** (odczynnik z punktu A) i jedną objętość (1V) **odczynnika C**
2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety

Zasada metody

Aktywność (stężenie katalityczne) **ALT** w próbkach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną wykorzystującą następujące reakcje:

$$\text{L-alanina} + \alpha\text{-ketoglutaran} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{L-glutaminian} + \text{pirogronian}$$

$$\text{pirogronian} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{dehydrogenaza mleczanowa}} \text{mleczan} + \text{NAD}^+$$

Spadek absorbancji NADH + H^+ mierzony przy długości fali 340 nm jest wprost proporcjonalny do aktywności ALT w badanej próbie.

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury reakcji
2. Do kuwety odpipetować w zależności od temperatury reakcji:

Temperatura reakcji	37°C	30°C
Odczynnik roboczy	**1000 µl**	**1000 µl**
Próba badana	**50 µl**	**100 µl**

3. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety i rozpocząć pomiar czasu
4. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) przy długości fali 340 nm po upływie 1 minuty od wymieszania OR z próbą i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych
5. Obliczyć różnicę absorbancji pomiędzy kolejnymi pomiarami oraz średnią różnic absorbancji na minutę (ΔA/min)

Obliczenia

Aktywność ALT w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$\frac{U}{l} = \frac{Vt \times 10^6}{\varepsilon \times I \times Vs} \times \frac{\Delta A}{min}$$

Molowy współczynnik absorpcji (ε) NADH przy długości fali 340 nm wynosi 6300, droga optyczna (l) – 1 cm, całkowita objętość reakcji (Vt) – 1,05 ml przy temperaturze 37°C i 1,1 ml przy 30°C, objętość próby badanej (Vs) – 0,05 ml przy 37°C i 0,1 ml przy 30°C, a 1 U/l równa się 0,0166 µkat/l

Obliczyć stężenie katalityczne za pomocą następujących wzorów:

	37°C	30°C
ΔA/min	**× 3333 = U/l** **× 55,55 = µkat/l**	**× 1746 = U/l** **× 29,1 = µkat/l**

Interferencje

Lipemia

Zagadnienia do opracowania

1. Enzymologia: miejsce aktywne enzymu, mechanizm biokatalizy, aktywność enzymu, inhibicja enzymów, regulacja aktywności enzymatycznej, enzymy wielofunkcyjne, podział enzymów pod kątem klinicznym
2. Metabolizm aminokwasów: transaminacja, cykl alaninowy, deaminacja
3. Znaczenie kliniczne oceny aminotransferaz w surowicy

Pytania kontrolne

1. Omów rolę fosforanu pirydoksalu w reakcji katalizowanej przez AST
2. Omów znaczenie biologiczne cyklu alaninowego
3. Omów znaczenie kliniczne oceny aktywności ALT w surowicy
4. Omów udział ALT w patogenezie chorób cywilizacyjnych

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

5.3. GAMMA-GLUTAMYLO-TRANSFERAZA

➢ Podstawy biochemiczne

Gamma-glutamylotransferaza (ang. *gamma glutamyl tranferase*; (5-glutamyl)-peptyd:amino-kwas 5-glutamylotransferaza; transpeptydaza gamma-glutamylowa, **γ-GT**, GGTP; EC 2.3.2.2) jest enzymem ekskrecyjnym z klasy transferaz katalizującym przeniesienie grupy γ-glutamylowej glutationu lub innego γ-glutamylopeptydu na akceptor, którym może być wolny aminokwas lub peptyd. γ-GT katalizuje też hydrolizę połączeń γ-glutamylowych oraz reakcję autotranspeptydacji. Uczestniczy przez to w przenoszeniu aminokwasów przez błony komórkowe w cyklu γ-glutamylowym.

W dużych ilościach enzym ten występuje **w cewkach proksymalnych nefronów** oraz **w rąbku szczoteczkowym jelit**. Z organizmu γ-GT wydalana jest głównie przez przewód pokarmowy z żółcią.

Wzrost aktywności γ-GT w surowicy jest wskaźnikiem:

- cholestazy
- działania induktorów mikrosomalnych (barbiturany, leki przeciwpadaczkowe, alkohol)
- intensywnego procesu nowotworowego.

➢ Wartości referencyjne

Surowica				
temperatura reakcji	mężczyźni		kobiety	
	U/l	µkat/l	U/l	µkat/l
25°C	**< 22**	**< 0,37**	**< 15**	**< 0,25**
30°C	**< 35**	**< 0,59**	**< 24**	**< 0,40**
37°C	**< 55**	**< 0,92**	**< 38**	**< 0,64**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższona aktywność γ-GT w surowicy może świadczyć o:

- upośledzonym wydalaniu γ-GT z żółcią
  - żółtaczka zastoinowa
  - cholestaza wewnątrzwątrobowa
- nasilonej syntezie γ-GT
  - stosowanie leków przeciwpadaczkowych
  - alkoholowa choroba wątroby

    - toksyczne uszkodzenie wątroby
    - nowotwory wątroby
- intensywnym procesie nowotworowym
    - nowotwory o dużym potencjale wzrostu
- ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki

Ocena aktywności γ-GT zestawem *BioSystems*®

Odczynniki

- **odczynnik A** (*glicyloglicyna 25 mmol/l, wodorotlenek sodu 130 mmol/l, pH 7,9*)
- **standard** (*γ-glutamylo-3-karboksy-4-nitroanilid 32,5 mmol/l*)

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B**
2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety

Zasada metody

Aktywność (stężenie katalityczne) **γ-GT** w próbkach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną. 3-karboksy-4-nitroanilina uwalniana jest w reakcji przeniesienia grupy γ-glutamylowej z γ-glutamylo-3-karboksy-4-nitroanilidu na glicyloglicynę, katalizowanej przez γ-GT.

$$\text{γ-glutamylo-3-karboksy-4-nitroanilid} + \text{glicyloglicyna} \xrightarrow{\gamma-\mathrm{GT}} \text{γ-glutamyloglicyloglicyna} + \text{3-karboksy-4-nitroanilina}$$

Szybkość powstawania 3-karboksy-4-nitroaniliny mierzona przy długości fali 405 nm jest wprost proporcjonalna do aktywności γ-GT.

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury reakcji
2. Dodać do dwóch oznaczonych kuwet:
   a) **Standard**: 1000 µl **OR** i 100 µl **standardu**
   b) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 100 µl **próby badanej**
3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety
4. Umieścić kuwety w spektrofotometrze
5. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) przy długości fali 405 nm i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych
6. Obliczyć różnicę pomiędzy kolejnymi pomiarami absorbancji oraz średnią różnic absorbancji na minutę (ΔA/min)

Obliczenia

Aktywność (stężenie katalityczne) **γ-GT** obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$\frac{U}{L} = \frac{Vt \times 10^6}{\varepsilon \times I \times Vs} \times \Delta A/\mathrm{min}$$

Molowy współczynnik absorpcji (ε) 3-karboksy-4-nitroaniliny przy 405 nm wynosi 9900, droga optyczne (I) – 1 cm, całkowita objętość reakcji (Vt) – 1,1 ml, objętość próby badanej (Vs) – 0,1 ml, a 1 U/l równa się 16,67 nkat/l

Stężenie katalityczne γ-GT obliczyć za pomocą następujących wzorów:

$$\frac{\Delta A}{\mathrm{min}} \times 1111 = \frac{U}{l}$$

$$\frac{\Delta A}{\mathrm{min}} \times 18{,}52 = \mu\mathrm{kat/l}$$

Interferencje

Hemoglobina, bilirubina, lipemia

Zagadnienia do opracowania	1. Enzymologia: miejsce aktywne enzymu, mechanizm biokatalizy, aktywność enzymu, inhibicja enzymów, regulacja aktywności enzymatycznej, enzymy wielofunkcyjne, podział enzymów pod kątem klinicznym 2. Przemiany cyklu γ-glutamylowego 3. Metabolizm i znaczenie biologiczne glutationu 4. Znaczenie kliniczne oceny aktywności γ-GT w surowicy
Pytania kontrolne	1. Omów udział γ-GT w metabolizmie glutationu 2. Omów znaczenie biologiczne glutationu zredukowanego i utlenionego 3. Omów znaczenie stosunku GSH/GSSG w metabolizmie komórki 4. Omów udział γ-GT w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

5.4. KINAZA KREATYNOWA

➢ Podstawy biochemiczne

Kinaza kreatynowa (ang. *creatine kinase*, ATP:kreatyna N-fosfotransferaza; **CK**, CPK; EC 2.7.3.2) jest narządowo niespecyficznym enzymem indykatorowym (wskaźnikowym) katalizującym odwracalną reakcję przenoszenia reszty fosforanowej z fosfokreatyny na ADP:

fosfokreatyna + ADP ↔ kreatyna + ATP

Reakcja ta jest 2-6 razy szybsza niż reakcja fosforylacji kreatyny. Nie dziwi więc, że w tkankach o dużym zapotrzebowaniu energetycznym zawartość fosfokreatyny znacznie przewyższa stężenie ATP.

CK występuje w postaci **trzech izoenzymów** będących dimerami jednakowych bądź różnych **podjednostek typu B** (ang. *brain* – mózg) i **M** (ang. *muscle* – mięsień). Wyróżnia się:

- CK-BB (CK-1) – występujący głównie w mózgu
- CK-MB (CK-2) – występujący głównie w sercu
- CK-MM (CK-3) – występujący w mięśniach szkieletowych.

Numery przypisane poszczególnym izoenzymom CK wynikają z ich ruchliwości elektroforetycznej – CK-1 wędruje najszybciej, a CK-3 najwolniej w kierunku anody.

Wzrost aktywności CK w surowicy jest zawsze wskaźnikiem martwicy komórek. Szczególnie cenne diagnostycznie są izoenzymy:

- CK-MB – biomarker zawału mięśnia sercowego, ostrej niewydolności serca i urazów serca
- CK-MM – biomarker uszkodzenia mięśni szkieletowych.

➢ Wartości referencyjne

Surowica				
temperatura reakcji	mężczyźni		kobiety	
	U/l	**µkat/l**	**U/l**	**µkat/l**
25°C	**10-65**	**167-1084**	**7-55**	**117-917**
30°C	**15-105**	**250-750**	**10-80**	**167-1334**
37°C	**38-174**	**633-2900**	**26-140**	**433-2334**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

U dzieci aktywność CK w surowicy jest wyższa niż u dorosłych.

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższona aktywność CK w surowicy może świadczyć o:

- chorobach mięśni szkieletowych (szczególnie wzrost aktywności CK-MM)
  - toksyczne, zapalne lub urazowe uszkodzenie mięśni szkieletowych
  - dystrofia mięśniowa
  - iniekcje domięśniowe
  - intensywny wysiłek fizyczny
  - rabdomioliza spowodowana hipokaliemią, statynami, neuroleptykami, czadem, etanolem lub hipertermią
- uszkodzeniu mięśnia sercowego (szczególnie wzrost aktywności CK-MB)
  - zawał serca
  - zapalenie mięśnia sercowego
  - ostra niewydolność serca
  - urazy serca (resuscytacja, kardiowersja)
- uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego (OUN)
  - zmiany zapalne i nowotworowe OUN
  - epilepsja
- uszkodzeniu innych narządów
  - zatorowość płucna
  - niedoczynność tarczycy

Ocena aktywności CK zestawem *BioSystems*®

Odczynniki

- **odczynnik A** (*imidazol 125 mmol/l, EDTA 2 mmol/l, octan magnezu 12,5 mmol/l, D-glukoza 25 mmol/l, N-acetylocysteina 25 mmol/l, heksokinaza 6000 U/l, NADP⁺ 2,4 mmol/l, pH 6,7*)
- **odczynnik B** (*fosfokreatyna 250 mmol/l, ADP 15 mmol/l, AMP 25 mmol/l, dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa 8000 U/l*)

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B**
2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety

Zasada metody

Aktywność (stężenie katalityczne) **CK** w próbkach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną. Metoda polega na pomiarze szybkości powstawania NADPH + H^+ w wyniku następujących sprzężonych reakcji:

$$\text{fosfokreatyna} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{kreatyna} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \text{glukoza} \xrightarrow{\text{heksokinaza}} \text{ADP} + \text{glukozo-6-fosforan}$$

$$\text{glukozo-6-fosforan} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa}} \text{lakton kwasu 6-fosfoglukonowego} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Szybkość powstawania NADPH + H^+ mierzona przy długości fali 340 nm jest wprost proporcjonalna do aktywności CK.

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury reakcji
2. Do kuwety odpipetować 1000 µl **OR** i 50 µl **próby badanej**
3. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety i rozpocząć pomiar czasu
4. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) przy długości fali 340 nm po upływie 3 minut od wymieszania OR z próbą i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych
5. Obliczyć różnicę absorbancji pomiędzy kolejnymi pomiarami oraz średnią różnic absorbancji na minutę (ΔA/min)

Obliczenia

Aktywność (stężenie katalityczne) **CK** w próbie badanej obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$\frac{U}{l} = \frac{V_{t \times 10^6}}{\varepsilon \times I \times V_s} \times \Delta A/\text{min}$$

Molowy współczynnik absorpcji (ε) NADPH przy 340 nm wynosi 6300, droga optyczna (I) – 1 cm, całkowita objętość reakcji (Vt) – 1,05 ml, objętość próby badanej (Vs) – 0,05 ml, a 1 U/l równa się 16,67 nkat/l

Obliczyć stężenie katalityczne CK za pomocą następujących wzorów:

$$\Delta A/\text{min} \times 3333 = U/l$$

$$\Delta A/\text{min} \times 55561 = \mu\text{kat}/l$$

Interferencje	Lipemia
Zagadnienia do opracowania	1. Enzymologia: miejsce aktywne enzymu, mechanizm biokatalizy, aktywność enzymu, inhibicja enzymów, regulacja aktywności enzymatycznej, enzymy wielofunkcyjne, podział enzymów pod kątem klinicznym 2. Metabolizm fosfokreatyny 3. Znaczenie kliniczne oceny aktywności CK w surowicy
Pytania kontrolne	1. Omów wykorzystanie CK-MB i CK-MM w diagnostyce klinicznej 2. Omów udział CK w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

5.5. FOSFATAZA ZASADOWA

➢ Podstawy biochemiczne

Fosfataza zasadowa (ang. *alkaline phosphatase*, fosfataza alkaiczna, fosfohydrolaza monoestruortofosforanowego (z optimum alkaicznym); **ALP**; EC 3.1.3.1) jest enzymem ekskrecyjnym z klasy hydrolaz katalizującym defosforylację estrów fosforanowych w silnie zasadowym środowisku (pH 9-10). Występuje jako białko zewnętrznej błony plazmatycznej lub w postaci kompleksów z innymi białkami błonowymi.

Wyróżnia się 4 izoenzymy ALP:

- **izoenzym tkankowo-niespecyficzny** (ALPL) – występuje w praktycznie każdej tkance. Wyróżnia się 3 izoformy różniące się profilem glikozylacji:
  - izoforma kostna
  - izoforma wątrobowa (frakcja żółciowa i makromolekularna)
  - izoforma nerkowa
- **izoenzym jelitowy** (Kasahara, ALPI)
- **izoenzym komórek zarodkowych** (Nagao, ALPPL2)
- **izoenzym łożyskowy** (Regan'a, ALPP).

Chociaż fizjologiczna rola ALP nie jest znana, przypuszcza się, że enzym ten uczestniczy w procesach kostnienia, jak również w transporcie reszt fosforanowych przez błonę komórkową, wchłanianiu lipidów w przewodzie pokarmowym oraz transporcie immunoglobulin IgG z krwi matki do płodu.

W surowicy osób zdrowych występuje głównie fosfataza pochodzenia kostnego (ok. 50-60%), jelitowego (ok. 30%) oraz wątrobowego (ok. 10-20%). Należy jednak pamiętać, że zawartość poszczególnych izoenzymów ALP zmienia się wraz z wiekiem oraz zależy od grupy krwi. Aktywność ALP u dzieci jest dużo wyższa niż u dorosłych.

➢ Wartości referencyjne

Surowica		
temperatura reakcji	mężczyźni	kobiety
25°C	**< 75 U/l = 1,25 µkat/l**	**< 68 U/l = 1,13 µkat/l**
30°C	**< 87 U/l = 1,45 µkat/l**	**< 80 U/l = 1,33 µkat/l**
37°C	**< 115 U/l = 1,92 µkat/l**	**< 105 U/l = 1,75 µkat/l**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

U dorastających dzieci aktywność ALP w surowicy jest wyższa i bardzo zmienna.

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższona aktywność ALP w surowicy może świadczyć o:

- nadmiernej aktywności osteoblastów
  - choroba Pageta
  - nadczynność przytarczyc
  - nowotwory kości
  - niedobór witaminy D
- upośledzonym wydalaniu ALP przez drogi żółciowe
  - cholestaza (cholestaza polekowa, niedrożność przewodów żółciowych)
  - choroby wątroby (zapalenie wątroby, marskość wątroby, sarkoidoza, gruźlica)
- wzmożonej biosyntezie ALP
  - choroby nowotworowe
- przewlekłej niewydolności nerek
- niewydolności serca

Ocena aktywności ALP zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*2-amino-2-metylo-1-propanol (AMP) 0,4 mol/l, siarczan cynku 1,2 mmol/l, kwas N-hydroksyetyloetylenodiaminooctowy 2,5 mmol/l, octan magnezu 2,5 mmol/l, pH 10,4*) • **odczynnik B** (*4-nitrofenylofosforan 60 mmol/l*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B** 2. Wymieszać reagenty przy pomocy końcówki pipety
Zasada metody	**Aktywność** (stężenie katalityczne) **ALP** w próbkach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną mierząc szybkości tworzenia się 4-nitrofenolu. 4-nitrofenol to produkt uwalniany w wyniku przeniesienia reszty fosforanowej z 4-nitrofenylofosforanu na 2-amino-2-metylo-1-propanol (AMP) w środowisku zasadowym w reakcji katalizowanej przez ALP. Szybkości powstawania 4-nitrofenolu mierzona przy długości fali 405 nm jest wprost proporcjonalna do aktywności ALP.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury reakcji 2. Do kuwety dodać 1000 µl **OR** i 20 µl **próby badanej** 3. Wymieszać reagenty przy pomocy końcówki pipety i umieścić kuwetę w spektrofotometrze 4. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) przy długości fali 405 nm i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych 5. Obliczyć różnicę absorbancji pomiędzy kolejnymi pomiarami oraz średnią różnic absorbancji na minutę (ΔA/min)
Obliczenia	**Aktywność** (stężenie katalityczne) **ALP** w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $$\frac{U}{l} = \frac{\Delta A}{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\varepsilon \times I \times Vs}$$ Molowy współczynnik absorpcji (ε) 4-nitrofenolu przy długości fali 405 nm wynosi 18450, droga optyczna (l) – 1 cm, całkowita objętość reakcji (Vt) – 1,02 ml, objętość próby badanej (Vs) – 0,002 ml, a 1U/l równa się 0,0166 µkat/L **Obliczyć stężenie katalityczne ALP** za pomocą następujących wzorów: ΔA/min × 2764 = U/l ΔA/min × 46,08 = µkat/l
Interferencje	Hemoglobina
Zagadnienia do opracowania	1. Enzymologia: miejsce aktywne enzymu, mechanizm biokatalizy, aktywność enzymu, inhibicja enzymów, regulacja aktywności enzymatycznej, enzymy wielofunkcyjne, podział enzymów pod kątem klinicznym 2. Budowa, właściwości oraz znaczenie kliniczne izoenzymów i izoform ALP

Pytania kontrolne	1. Omów wykorzystanie ALP w diagnostyce klinicznej 2. Omów udział ALP w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

5.6. DEHYDORGENAZA MLECZANOWA

➢ Podstawy biochemiczne

Dehydrogenaza mleczanowa (ang. *lactate dehydrogenase*, L-mleczan:NAD+ oksydoreduktaza; **LDH**; EC 1.1.1.27) jest enzymem indykatorowym (wskaźnikowym) z klasy oksydoreduktaz. Katalizuje odwracalną reakcję redukcji pirogronianu do mleczanu.

LDH występuje w postaci **pięciu izoenzymów** różniących się składem podjednostkowym. Każdy z nich zbudowany jest z czterech różnych lub jednakowych **podjednostek typu H** (ang. *heart* – serce) i **M** (ang. *muscle* – mięsień):

- LDH-1 (H4)
- LDH-2 (H3M)
- LDH-3 (H2M2)
- LDH-4 (HM3)
- LDH-5 (M4).

LDH występuje w **cytoplazmie** wszystkich komórek organizmu. Największą aktywność wykazuje w narządach o wysokim metabolizmie energetycznym (wątroba, mięśnie szkieletowe, serce, nerki) oraz w płucach, mózgu i erytrocytach. Izoenzymy **LDH-1** i **LDH-2** występują głównie w mięśniu sercowym, podczas gdy **LDH-4** i **LDH-5** w mięśniach szkieletowych i wątrobie. Wyróżnia się także szósty izoenzym **LDH-X**, który występuje wyłącznie w jądrach i plemnikach po osiągnięciu dojrzałości płciowej.

W warunkach prawidłowych, aktywność LDH-2 w surowicy jest wyższa niż LDH-1. Wzrost aktywności LDH we krwi wskazuje na martwicę komórek lub zwiększoną przepuszczalność błon komórkowych.

➢ Wartości referencyjne

	Surowica	
temperatura reakcji	**U/l**	**µKat/l**
25°C	**105-210**	**1,70-3,50**
30°C	**140-280**	**3,30-4,70**
37°C	**207-414**	**3,40-6,80**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższona aktywność LDH w surowicy może świadczyć o:

- chorobach krwi (szczególnie wzrost aktywności LDH-1 i LDH-2)
    - niedokrwistość hemolityczna
    - ostre białaczki
    - mononukleoza
- chorobach serca (szczególnie wzrost aktywności LDH-1)
    - zawał serca
    - zapalenie mięśnia sercowego
    - choroby wątroby
- infekcyjne, toksyczne lub nowotworowe uszkodzenie hepatocytów
- chorobach mięśni szkieletowych
    - wzrost aktywności LDH-4 i LDH-5)
    - miopatie wrodzone i nabyte
- chorobach płuc
    - zawał płuc
    - nowotwory płuc
- chorobach nowotworowych (szczególnie wzrost aktywności LDH-3)
    - nowotwory o dużym potencjale wzrostu (zwłaszcza nowotwory układu krwiotwórczego i chłonnego)
- hipoksji
    - hipotensja
    - wstrząs
    - niewydolność oddechowa
- hemolizie

Ocena aktywności LDH zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*TRIS 100 mmol/l, pirogronian 2,75 mmol/l, chlorek sodu 222 mmol/l, pH 7,2*) • **odczynnik B** (*NADH 1,55 mmol/l, azydek sodu 9,5 g/l*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B** 2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety
Zasada metody	**Aktywność** (stężenie katalityczne) **LDH** w próbkach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną wykorzystującą następującą reakcję: $\text{pirogronian} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{mleczan} + \text{NAD}^+$ Spadek absorbancji NADH+ + H^+ mierzony przy długości fali 340 nm jest wprost proporcjonalny do aktywności LDH w badanej próbie.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury reakcji 2. Odpipetować do kuwety 1000 µl **OR** i 20 µl **próby badanej** 3. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety i rozpocząć pomiar czasu 4. Zarejestrować absorbancję początkową (A1) przy długości fali 340 nm po upływie 30 sekund od wymieszania OR z próbą i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych 5. Obliczyć różnicę absorbancji pomiędzy kolejnymi pomiarami oraz średnią różnic absorbancji na minutę (ΔA/min)
Obliczenia	**Aktywność LDH** w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $\frac{U}{l} = \frac{Vt \times 10^6}{\varepsilon \times I \times Vs} \times \Delta A/\text{min}$ Molowy współczynnik absorpcji (ε) NADH przy 340 nm wynosi 6300, droga optyczna (l) – 1 cm, całkowita objętość reakcji (Vt) – 1,02 ml, objętość próby badanej (Vs) – 0,02 ml a 1 U/l równa się 0,0166 µl **Stężenie katalityczne LDH** obliczyć za pomocą następujących wzorów: ΔA/min × 8095 = U/l ΔA/min × 135 = µkat/l
Interferencje	Hemoliza
Zagadnienia do opracowania	1. Enzymologia: miejsce aktywne enzymu, mechanizm biokatalizy, aktywność enzymu, inhibicja enzymów, regulacja aktywności enzymatycznej, enzymy wielofunkcyjne, podział enzymów pod kątem klinicznym 2. Budowa, właściwości oraz znaczenie kliniczne izoenzymów LDH

Pytania kontrolne	1. Omów wykorzystanie LDH w diagnostyce klinicznej 2. Wyjaśnij, dlaczego LDH może być używana jako biomarker apoptozy 3. Omów udział LDH w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

5.7. α-AMYLAZA

➢ Podstawy biochemiczne

α-amylaza (4-glukanohydrolaza 1,4-α-D-glukanu, diastaza; **AMY**; EC 3.2.1.1) jest endoamylazą katalizującą hydrolizę wiązań α-1,4-glikozydowych w polisacharydach zawierających co najmniej trzy reszty D-glukozy połączone wiązaniami α-1,4. Substratami dla α-amylazy są skrobia (amyloza i amylopektyna), glikogen i maltotrioza, a powinowactwo enzymu do substratu zwiększa się wraz ze wzrostem długości łańcucha. Rozkład polisacharydów katalizowany przez α-amylazę zachodzi stopniowo, a jego szybkość jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości wiązań α-1,6-glikozydowych w cząsteczce cukru. W pierwszym etapie hydrolizy powstają dekstryny zawierające zwykle jedno wiązanie α-1,6-glikozydowe. Następnie, związki te są rozkładane do maltozy, maltotriozy oraz glukozy.

Cząsteczka α-amylazy zawiera **jon wapnia**, który stabilizuje strukturę enzymu, ale nie uczestniczy w tworzeniu kompleksu enzym-substrat. Działanie α-amylazy aktywowane jest przez **jony chlorkowe**.

Narządami odpowiedzialnymi za produkcję α-amylazy są głównie ślinianki (α-amylaza ślinowa, S-AMY), a w mniejszym stopniu trzustka (α-amylaza trzustkowa, P-AMY). α-amylaza występuje w formie 5 izoenzymów. W śliniankach występują trzy z nich (**AMY1A**, **AMY1B**, **AMY1C**) o optimum pH równym **5,6-6,9**. α-amylaza ślinowa uczestniczy nie tylko we wstępnym trawieniu cukrów. Odpowiada za tworzenie kompleksu glikoproteinowego błonki nabytej, który tworzy się bezpośrednio na umytych zębach. S-AMY ma wysokie powinowactwo do bakterii, przez co skuteczni chroni twarde tkanki zęba przed próchnicą. Ponadto, aktywność α-amylazy ślinowej koreluje z czynnością sekrecyjną/syntezą białka w gruczołach ślinowych, przez co S-AMY stanowi najlepszy nieinwazyjny biomarker uszkodzenia ślinianek.

W trzustce występują dwa kolejne izoenzymy (**AMY2A**, **AMY2B**). Są one wydzielane są do jelit i działają w pH równym **6,5-8,0**. Najważniejszymi narządami wydalania α-amylazy z ustroju są natomiast nerki oraz przewód pokarmowy.

U 1-3% populacji, α-amylaza występuje w formie makroenzymu, który tworzy połączenia z glikoproteinami, lipoproteinami oraz immunoglobulinami. W sytuacjach patologicznych, makroenzymy występują najczęściej u osób z chorobami autoimmunologicznymi i nowotworowymi.

➢ Wartości referencyjne

Surowica		
temperatura reakcji	**U/l**	**µkat/l**
25°C	**12-45**	**0,21-0,75**
30°C	**17-60**	**0,28-1,00**
37°C	**22-80**	**0,37-1,33**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższona aktywność α-amylazy w surowicy może świadczyć o:

- uwalnianiu α-amylazy z uszkodzonej trzustki i ślinianek (stany zapalne i nowotworowe oraz obturacja przewodu trzustkowego lub dróg wyprowadzających ślinę)
    - ostre i przewlekłe zapalenie trzustki
    - ostre i przewlekłe zapalenie ślinianek
    - brodawkowate nowotwory śluzowe trzustki
    - guzy ślinianek
    - stosowanie opioidów
- przenikaniu α-amylazy z treści jelitowej do krwi poprzez uszkodzoną błonę śluzową jelit
    - zawał jelita
    - niedrożność jelit
- uszkodzeniu nerek
    - niewydolność nerek
    - kamienie nerkowe
- uszkodzeniu wątroby
- chorobach dróg żółciowych
- makroamylazemii
    - choroba trzewna
    - gammapatie monoklonalne
    - chłoniaki
- chorobach nowotworowych (hiperamylazemia paranowotworowa)

Ocena aktywności α-amylazy zestawem *BioSystems®*

Odczynniki

- **odczynnik A** (*bufor MES 50 mmol/l, chlorek wapnia 5 mmol/l, chlorek sodu 300 mol/l, tiocyjanian sodu 450 mmol/l, 2-chloro-4-nitrofenylo-α-D-maltotriozyd (CNPG3) 2,25 mmol/l, pH 6,1*)

Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)

Gotowy do użycia

Zasada metody

Aktywność (stężenie katalityczne) **α-amylazy** w próbkach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą enzymatyczną. α-amylaza katalizuje hydrolizę syntetycznego substratu (2-chloro-4-nitrofenylo-α-D-maltotriozyd; CNPG3), w wyniku której powstaje 2-chloro-4-nitrofenol (CNP), 2-chloro-4-nitrofenylo-α-D-maltozyd (CNPG2), maltotrioza (G3) oraz glukoza (G):

$$10\ \text{CNPG3} \xrightarrow{\alpha-\text{amylaza}} 9\ \text{CNP} + \text{CNPG2} + \text{G3} + \text{G}$$

Szybkość powstawania CNP mierzona przy 405 nm jest wprost proporcjonalna do aktywności α-amylazy w badanej próbie.

Wykonanie oznaczenia

1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury reakcji
2. Odpipetować do kuwety 1000 µl **odczynnika A** i 20 µl **próby badanej**
3. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety
4. Umieścić kuwetę w fotometrze
5. Zarejestrować absorbancję (A) przy długości fali 405 nm i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych
6. Obliczyć różnicę absorbancji pomiędzy kolejnymi pomiarami oraz średnią różnic na minutę (ΔA/min)

Obliczenia

Aktywność α-amylazy w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego:

$$\frac{U}{l} = \Delta A/\text{min} \times \frac{V_t \times 10^6}{\varepsilon \times I \times V_s}$$

Molowy współczynnik absorpcji (ε) CNP przy 405 nm wynosi 15490 a droga optyczna (l) 1 cm. Dla oznaczeń w surowicy całkowita objętość reakcji (Vt) wynosi 1,02 ml przy temperaturze 37°C i 1,05 ml przy 25-30°C, a objętość badanej (Vs) wynosi 0,02 ml przy 37°C i 0,05 ml przy 25-30°C

Stężenie katalityczne α-amylazy obliczyć za pomocą następujących wzorów:

	37°C	25-30°C
ΔA/min	**× 3292 = U/l** **× 54,9 = µkat/l**	**× 1355 = U/l** **× 22,6 = µkat/l**

Interferencje

Hemoliza

Zagadnienia do opracowania

1. Enzymologia: miejsce aktywne enzymu, mechanizm biokatalizy, aktywność enzymu, inhibicja enzymów, regulacja aktywności enzymatycznej, enzymy wielofunkcyjne, podział enzymów pod kątem klinicznym
2. Budowa, właściwości oraz trawienie disacharydów i polisacharydów
3. Budowa, właściwości oraz znaczenie kliniczne α-amylazy

Pytania kontrolne	1. Omów trawienie polisacharydów w przewodzie pokarmowym człowieka 2. Porównaj udział α-amylazy ślinowej i α-amylazy trzustkowej w trawieniu węglowodanów 3. Omów znaczenie kliniczne α-amylazy ślinowej 4. Omów udział α-amylazy w patogenezie chorób cywilizacyjnych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

6. INNE BIOMARKERY

6.1. BIAŁKO CAŁKOWITE

➢ Podstawy biochemiczne

Białka stanowią około 17% masy ustroju dorosłego człowieka. Większość białek surowicy (oprócz hemoglobiny i globuliny) jest syntetyzowana w wątrobie. Białka krwi pełnią funkcje strukturalne, uczestniczą w procesach enzymatycznych, krzepnięciu krwi oraz transporcie biocząsteczek. Regulują także ciśnienie onkotyczne oraz pH krwi.

Zawartość białka całkowitego w surowicy wynosi około 6-8%, z czego 60% stanowią albuminy, 4% α1-globuliny, 8% α2-globuliny,10% β-globuliny i 18% γ-globuliny. Stężenie białka całkowitego we krwi zależy głównie od równowagi między syntezą i degradacją albumin i immunoglobulin. Do czynników nasilających syntezę białek zalicza się: insulinę, hormon wzrostu, insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1), androgeny, estrogeny oraz aktywację układu współczulnego. Do czynników zwiększających katabolizm białek należą: spadek pH krwi, duże wahania stężenia hormonów tarczycy, glikokortykoidów i progesteronu oraz hipokalioza.

Znaczenie kliniczne ma nie tylko ocena stężenia białka całkowitego, ale także pomiar poszczególnych frakcji metodą elektroforezy (proteinogram). Zaburzenia w stężeniach albumin, α1-globulin, α2-globulin, β-globulin i γ-globulin określa się jako dysproteinemię. Pojawienie się białka patologicznego określa się jako paraproteinemię.

	α-globuliny	**β-globuliny**	**γ-globuliny**
Przykłady	· nośniki białkowe dla Cu^{2+} (ceruloplazmina, haptoglobina, tyroksyna, witamina B12) · α1- i α2-antytrypsyny · α1- i α2-lipoproteiny · α2-makroblobuliny	· β-lipoproteiny · plazminogen · transferryna · częściowo immunoglobuliny klasy IgM i IgA	· immunoglobuliny klasy IgG, IgM i IgA
Wartości referencyjne (surowica)	· α1-globuliny **1,3 – 2,8 g/l** (0,13 – 0,28 g/dl) · α2-globuliny **3,8 – 7 g/l** (0,38 – 0,7 g/dl)	**6,5 – 11 g/l** (0,65 – 1,1 g/dl)	**5 – 12 g/l** (0,5 – 1,2 g/dl)
Wzrost stężenia	· **ostry** proces zapalny · martwica tkanek (zawał serca, nowotwory) · zespół nerczycowy (↑α2)	· **przewlekły** proces zapalny · nadprodukcja lipoprotein (zespół nerczycowy, choroby wątroby, nowotwory, ciąża) · nadprodukcja paraprotein (szpiczak mnogi, makroglobulinemia Waldenströma, choroby nowotworowe)	· **przewlekły** proces zapalny pochodzenia bakteryjnego (np. gruźlica, zapalenie szpiku kostnego), niebakteryjnego (np. reumatoidalne zapalenie stawów, przewlekłe zapalenie wątroby) i pasożytniczego (np. malaria, bilharcjoza) · sarkoidoza · choroby nowotworowe

			· gammapatie monoklonalne IgA lub IgM (np. szpiczak plazmocytowy)
Spadek stężenia	· defekty syntezy białek nośnikowych · uszkodzenia wątroby · niedobór α1-antytrypsyny (↓α1)	· wrodzone defekty produkcji IgA lub IgM (np. hipotransferynemia) · nabyte defekty produkcji IgA lub IgM (np. przewlekłe uszkodzenie miąższu wątroby)	· wrodzone defekty produkcji immunoglobulin (np. zespół niedoboru immunoglobulin) · nabyte defekty produkcji immunoglobulin (np. przerzuty nowotworowe do kości, stosowanie leków immunosupresyjnych np. glikokortykoidów) · nadmierna utrata białek przez przewód pokarmowy (np. enteropatia wysiękowa) lub nerki (zespół nerczycowy)

➢ Wartości referencyjne

Surowica
60-80 g/l (6-8 g/dl)

Stężenie białka całkowitego w surowicy jest niższe u dzieci w porównaniu do dorosłych. Stężenie białka całkowitego w osoczu jest o 2 do 4 g/l wyższe niż w surowicy z powodu obecności fibrynogenu, jak i innych śladowych obecności białek.

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Hiperproteinemia prawdziwa może być spowodowana:

- wzmożoną syntezą białek fizjologicznych
  - przewlekłe stany zapalne
  - kolagenoza
  - marskość wątroby
- wzmożoną syntezą białek patologicznych
  - szpiczak mnogi
  - makroglobulinemia Waldenströma
  - choroby nowotworowe

Hiperproteinemia rzekoma może być spowodowana:

- odwodnieniem

Hipoproteinemia prawdziwa może być spowodowana:

- niedostateczną podażą białka

    - niedożywienie lub wadliwe odżywianie
    - jadłowstręt
- upośledzonym wchłanianiu białka z przewodu pokarmowego
    - zaburzenia wchłaniania i trawienia
- nadmierną utratą białka przez
    - przewód pokarmowy (enteropatia wysiękowa, przewlekłe stany zapalne jelit)
    - nerki (zespół nerczycowy)
    - skórę (oparzenia i stany zapalne skóry z wysiękiem)
    - płuca (rozstrzenie oskrzeli)
- niedostateczną syntezą białka
    - uszkodzenia wątroby
- wzmożonym katabolizmie białek
    - nadczynność tarczycy
    - posocznica
    - nowotwory

Hipoproteinemia rzekoma może być spowodowana:
- przewodnieniem

Ocena stężenia białka całkowitego zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*octan miedzi (II) 6 mmol/l, jodek potasu 12 mmol/l, wodorotlenek sodu 1,15 mol/l, detergent*) • **standard** (*albumina wołowa*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Zawartość białka całkowitego** w próbkach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą biuretową. Atomy azotu wiązania peptydowego -CO-NH -białka reagują w środowisku alkalicznym z jonami miedzi (II) zawartymi w odczynniku biuretowym tworząc barwny, granatowo-fioletowy kompleks o maksimum absorpcji 545 nm. Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do liczby wiązań peptydowych, a tym samym do stężenia białka w badanej próbce. Ze względu na alkaiczne środowisko reakcji metoda ta jest szczególnie przydatna do oznaczania stężenia białka w płynach biologicznych czy homogenatach tkankowych.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Do trzech oznaczonych kuwet odpipetować: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 20 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 20 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 20 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 10 minut w temperaturze pokojowej 5. Zarejestrować absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 545 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie białka** w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$
Interferencje	Hemoglobina, lipemia
Zagadnienia do opracowania	1. Aminokwasy powszechnie występujące w białkach, symbolika aminokwasów, biologiczne znaczenie aminokwasów 2. Wiązanie peptydowe. Nazewnictwo peptydów 3. Peptydy biologicznie aktywne 4. Struktury białek 5. Wrodzone defekty struktury białek 6. Właściwości białek w roztworach 7. Izolacja i oczyszczanie białek z materiału biologicznego 8. Funkcje biologiczne białek 9. Skład, właściwości i znaczenie kliniczne białek surowicy

Pytania kontrolne	1. Opisz rozdział białek metodą elektroforezy
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

6.2. ALBUMINA

➢ Podstawy biochemiczne

Albumina jest białkiem syntetyzowanym w wątrobie. Jej okres półtrwania wynosi ok. 20 dni i rozkładana jest w przewodzie pokarmowym, wątrobie oraz nerkach. Albumina jest głównym składnikiem krwi odpowiedzialnym za ciśnienie koloidoosmotyczne. Stanowi również białko nośnikowe dla wolnych kwasów tłuszczowych, niektórych hormonów, bilirubiny, jonów metali oraz leków. Ponadto, albumina wykorzystywana jest jako endogenne źródło aminokwasów do syntezy białek w komórkach pozawątrobowych.

➢ Wartości referencyjne

Surowica
35-50 g/l (3,5-5 g/dl)

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie albuminy w surowicy (hiperalbuminemia) może świadczyć o:
- odwodnieniu
- nadciśnieniu tętniczym

Obniżone stężenie albuminy w surowicy (hipoalbuminemia) może świadczyć o:
- wrodzonym defekcie biosyntezy
  - analbuminemia
- niedostatecznej podaży białka
  - niedożywienie lub wadliwe odżywianie
  - jadłowstręt
- upośledzonym wchłanianiu białka z przewodu pokarmowego
  - zaburzenia wchłaniania i trawienia
- nadmiernej utracie białka przez
  - przewód pokarmowy (enteropatia wysiękowa, przewlekłe stany zapalne jelit)
  - nerki (zespół nerczycowy)
  - skórę (oparzenia i stany zapalne skóry z wysiękiem)
  - płuca (rozstrzenia oskrzeli)
- niedostatecznej biosyntezie białka
  - uszkodzenia wątroby
- wzmożonym katabolizmie białka
  - nadczynność tarczycy
  - posocznica
  - nowotwory
- przewodnieniu
- ciąży

Ocena stężenia albuminy zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*bufor octanowy 100 mmol/l, zieleń bromokrezolową 0,27 mmol/l, detergent, pH 4,1*) • **standard** (*albumina bydlęca*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	Gotowy do użycia
Zasada metody	**Stężenie albuminy** w próbach surowicy oznacza się kolorymetryczną metodą BCG. W środowisku kwaśnym albumina reaguje z zielenią bromokrezolową (BCG) tworząc barwny kompleks o maksimum absorpcji 630 nm. Natężenie barwy powstałego kompleksu jest wprost proporcjonalne do stężenia albuminy w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Do trzech oznaczonych kuwet odpipetować: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 10 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 10 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **odczynnika A** i 10 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 1 minutę w temperaturze pokojowej 5. Zarejestrować absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 630 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie albuminy** w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$
Interferencje	Bilirubina, lipemia, hemoglobina
Zagadnienia do opracowania	1. Aminokwasy powszechnie występujące w białkach, symbolika aminokwasów, biologiczne znaczenie aminokwasów 2. Wiązanie peptydowe. Nazewnictwo peptydów 3. Peptydy biologicznie aktywne 4. Struktury białek 5. Wrodzone defekty struktury białek 6. Właściwości białek w roztworach 7. Izolacja i oczyszczanie białek z materiału biologicznego 8. Funkcje biologiczne białek 9. Skład, właściwości i znaczenie kliniczne białek surowicy 10. Znaczenie kliniczne albuminy glikowanej (GA) i albuminy modyfikowanej hipoksją (IMA) 11. Albumina jako białko modelowe w badaniach biochemicznych

Pytania kontrolne	1. Omów znaczenie kliniczne albuminy glikowanej (GA) i albuminy modyfikowanej hipoksją (IMA) 2. Omów zastosowanie albuminy jako białka modelowego w badaniach biochemicznych
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

6.3. BILIRUBINA

➢ Podstawy biochemiczne

Bilirubina to produkt rozpadu porfiryn (głównie hemoglobiny) powstający w wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym. Bilirubina wiąże się z białkami osocza (głównie albuminą) dając bilirubinę pośrednią (nierozpuszczalna w wodzie). Jest ona transportowana do wątroby, gdzie ulega sprzęganiu z kwasem β-D-glukuronowym dając diglukuronid bilirubiny (bilirubina bezpośrednia, sprzężona; rozpuszczalna w wodzie). W tej postaci bilirubina wydalana jest do żółci. Bilirubina sprzężona reaguje bezpośrednio z odczynnikiem diazowym (diazowany kwas sulfanilowy) dając czerwono-fioletowe zabarwienie (odczyn van den Bergha bezpośredni), natomiast bilirubina niesprzężona daje pośredni odczyn van den Bergha.

Stężenie bilirubiny w surowicy zależy od:

- klirensu wątrobowego zależnego od stopnia ukrwienia tego narządu
- zdolności komórek wątrobowych do estryfikacji bilirubiny kwasem β-D-glukuronowym i kwasem siarkowym
- drożności dróg żółciowych.

Wzrost stężenia bilirubiny we krwi prowadzi do jej odkładania w tkankach, co objawia się w postaci zażółcenia białkówek oczu oraz skóry. Stan ten nosi nazwę żółtaczki i jest objawem różnych stanów chorobowych.

	Żółtaczka		
	Hemolityczna (przedwątrobowa)	***Miąższowa (wątrobowa)***	***Zastoinowa (pozawątrobowa)***
Bilirubina całkowita	Normalna lub ↑	↑	↑
Bilirubina bezpośrednia (sprzężona)	Normalna	↑	↑
Bilirubina pośrednia (niesprzężona)	Normalna lub ↑	↑	Normalna
Mocz	Normalny	Ciemny	Ciemny
Kał	Normalny	Jasny	Jasny

➢ Wartości referencyjne

Surowica	
[mg/dl] = [μmol/l]/17	
bilirubina całkowita	**0,3-1,2 mg/dl (5,1-20,5 mol/l)**
bilirubina bezpośrednia (sprzężona)	**0,1-0,4 mg/dl (1,7-6,8 mol/l)**
bilirubina pośrednia (niesprzężona)	**0,2-0,8 mg/dl (3,4-13,7 mol/l)**

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie bilirubiny (hiperbilirubinemia) w surowicy może świadczyć o:

- uszkodzeniu hepatocytów
  - wirusowe lub toksyczne uszkodzenie wątroby
  - niedokrwienie wątroby
- cholestazie wewnątrzwątrobowej
  - uszkodzenie bieguna żółciowego hepatocytów lub włośniczek żółciowych za pomocą leków, toksyn bakteryjnych czy nowotworów
- obturacji dróg żółciowych
  - kamica żółciowa
  - nowotwory
- upośledzeniu procesów estryfikacji bilirubiny
  - o charakterze wrodzonym (zespół Gilberta, zespół Crigela-Najjara)
  - o charakterze nabytym (po podaniu ryfampicyny)
- hemolizie
  - niedokrwistość hemolityczna

Ocena stężenia bilirubiny zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	**A. Bilirubina całkowita**: • **odczynnik AT** (*kwas sulfanilowy 29 mmol/l, kwas solny 0,2 mol/l, ceramid 50 mmol/l*) • **odczynnik BT** (*azotyn sodu 11,6 mmol/l*) **B. Bilirubina pośrednia**: • **odczynnik AD** (*kwas sulfanilowy 35 mmol/l, kwas solny 0,2 mol/l*) • **odczynnik BD** (*azotyn sodu 3,5 mol/l*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	**A. Bilirubina całkowita**: 1. Do kuwety dodać jedną objętość (1V) **odczynnika BT** i cztery objętości (4V) **odczynnika AT** 2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety **B. Bilirubina pośrednia**: 1. Do kuwety dodać jedną objętość (1V) **odczynnika BD** i cztery objętości (4V) **odczynnika AD** 2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety
Zasada metody	**Stężenie bilirubiny** w próbkach surowicy oznacza się metodą kolorymetryczną. Bilirubina w kwaśnym pH ulega reakcji azowania z odczynnikiem diazowym (diazowany kwas sulfanilowy) dając czerwono-fioletową azobilirubinę o maksimum absorpcji 540 nm. W reakcji tej możliwe jest rozróżnienie bilirubiny bezpośredniej, reagującej bez udziału akceleratora (ceramid), i bilirubiny pośredniej, która reaguje w jego obecności. Natężenie barwy powstałego kompleksu jest wprost proporcjonalne do stężenia bilirubiny w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	A. Bilirubina całkowita: 1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Do czterech oznaczonych kuwet odpipetować: • **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 100 µl **wody destylowanej** • **Próba ślepa surowicy**: 1000 µl odczynnika **AT** i 100 µl **próby** • **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 100 µl **próby** • **Standard**: 1000 µl **OR** i 100 µl **standardu** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 2 minuty w temperaturze pokojowej 5. Zarejestrować absorbancję prób ślepych surowicy przy długości fali 540 nm wobec wody destylowanej 6. Zarejestrować absorbancję (A) prób badanych i standardu przy długości fali 540 nm wobec próby ślepej odczynnikowej B. Bilirubina bezpośrednia: 1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C)

	2. Do oznaczonych kuwet odpipetować: • **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 100 µl **wody destylowanej** • **Próba ślepa surowicy**: 1000 µl **odczynnika AD** i 100 µl **próby** • **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 100 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 5 minut w temperaturze 37°C 5. Zarejestrować absorbancję prób ślepych surowicy przy długości fali 540 nm wobec wody destylowanej 6. Zarejestrować absorbancję (A) prób badanych i standardu przy długości fali 540 nm wobec próby ślepej odczynnikowej
Obliczenia	**Stężenie bilirubiny** w badanej obliczyć przy pomocy wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = \frac{A_{\text{Próby}} - A_{\text{Próby ślepej}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$ W obliczeniach bilirubiny bezpośredniej należy użyć wartość absorbancji uzyskaną dla standardu w procedurze oznaczania bilirubiny całkowitej.
Interferencje	Lipemia
Zagadnienia do opracowania	1. Budowa, właściwości i znaczenie biologiczne porfiryn (chem, chlorofil, kobalamina) 2. Synteza porfiryn 3. Porfirie 4. Rozkład hemu 5. Żółtaczki
Pytania kontrolne	1. Omów powstawanie i rozkład bilirubiny
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

6.4. MAGNEZ

➢ Podstawy biochemiczne

Całkowita zawartość **magnezu** w ustroju dorosłego człowieka wynosi ok. 35 g. Połowa tej ilości znajduje się w kościach w formie hydroksyapatytów, a jedynie 16% magnezu występuje w formie wymienialnej. Magnez jest głównie kationem wewnątrzkomórkowym i uczestniczy w ponad 300 reakcjach enzymatycznych.

➢ Wartości referencyjne

Surowica
[mg/dl] = [mmol/l] x 2,4
1,7-2,4 mg/dl (0,66-1,07 mmol/l)

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie magnezu w surowicy (hipermagnezemia) może świadczyć o:

- przedawkowaniu preparatów magnezu
- nadmiernym wchłanianiu magnezu z przewodu pokarmowego
  - choroby zapalne żołądka
  - choroby zapalne jelit
- upośledzonym wydalaniu magnezu przez nerki
  - niewydolność nerek
  - niedoczynność tarczycy
  - niedoczynność kory nadnerczy
- nadmiernym uwalnianiu magnezu z komórek
  - zespół lizy nowotworowej
  - rabdomioliza
  - hemoliza
  - kwasica

Obniżone stężenie magnezu w surowicy (hipomagnezemia) może świadczyć o:

- niedostatecznej podaży magnezu z pokarmami
  - dieta ubogomagnezowa
  - nadużywanie alkoholu
  - długotrwałe żywienie pozajelitowe
- zmniejszonym wchłanianiu magnezu z przewodu pokarmowego
  - zespół upośledzonego wchłaniania
- nadmiernej utracie magnezu przez przewód pokarmowy
  - wymioty

    - biegunka
    - przetoki
- nadmiernej utracie magnezu przez nerki
    - hiperaldosteronizm
    - nadużywanie alkoholu
    - hiperkalcemia
    - hipokaliemia
    - stosowanie diuretyków
    - niewyrównana cukrzyca
- przemieszczeniu magnezu z przestrzeni pozakomórkowej do komórek
    - nadużywanie alkoholu
- nadmiernym odkładaniu magnezu w tkankach miękkich i kościach
    - ostre zapalenie trzustki
    - zespół „głodnych kości”

Ocena stężenia magnezu zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*węglan sodu 0,1 mol/l, kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy (EGTA) 0,1 mol/l, trietanoloamina 0,1 mol/l, cyjanek sodu 7,7 mmol/l, azydek sodu 0,95 g/L*) • **odczynnik B** (*glicyna 25 mmol/l, błękit ksylidylu 0,5 mmol/l, chloroacetamid 2,6 g/L*) • **standard** (*Mg^{2+} 2 mg/dl*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B** 2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety
Zasada metody	**Stężenie magnezu** w próbkach surowicy oznacza się metodą kolorymetryczną. W środowisku zasadowym jony Mg^{2+} reagują z błękitem ksylidylu tworząc barwny kompleks o maksimum absorpcji 520 nm. Dodatek substancji chelatującej (EGTA) zmniejsza interferencje spowodowane jonami Ca^{2+}. Natężenie barwy fiołkowego kompleksu jest wprost proporcjonalne do stężenia magnezu w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do oznaczonych kuwet: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 10 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 10 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 10 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 2 minuty w temperaturze pokojowej 5. Zarejestrować absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 520 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie magnezu** w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = C \frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$ Jeżeli do kalibracji użyto załączonego standardu magnezu: $\frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}}$ × 2 = $\frac{mg}{dl}$ magnezu $\frac{A_{\text{Próby}}}{A_{\text{Standardu}}}$ × 0,82 = $\frac{mmol}{l}$ magnezu
Interferencje	Ca^{2+}
Zagadnienia do opracowania	1. Makroelementy (sód, potas, wapń, magnez, fosfor, chlor): zawartość w organizmie, zapotrzebowanie, źródła pokarmowe, funkcje biologiczne, przemiany w ustroju, implikacje kliniczne (niedobór oraz nadmiar)

Pytania kontrolne	1. Porównaj wpływ jonów magnezu na transport przez błony w warunkach fizjologicznych i patologicznych 2. Omów zależności między jonami magnezu i wapnia na poziomie komórki i płynu pozakomórkowego
Bibliografia	1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner 2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner 3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner 4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL 5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny 6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN 7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm 8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm 9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL 10. Medycyna praktyczna (online)

6.5. WAPŃ

➢ Podstawy biochemiczne

Prawie cały **wapń** w ustroju znajduje się w przestrzeni pozakomórkowej. 99,85% wapnia występuje w kościach w formie hydroksyapatytów, a jedynie 0,05% w płynie pozakomórkowym. Tylko 1% wapnia w kościach tworzy szybko wymienialną pulę wapniową.

Stężenie wapnia w surowicy (kalcemia) zależy od:

- podaży wapnia z pożywieniem oraz stopnia jego wchłaniania z przewodu pokarmowego
- mobilizacji wapnia z kości
- stopnia wydalania wapnia z moczem (kalciuria).

Kalcemia zależy również od zawartości białka (głównie albuminy). Wzrost albuminemii o 10 g/l zwiększa kalcemię o 0,2 mmol/l i odwrotnie.

Parathormon (PTH), witamina D (1,25-dihydroksycholekalcyferol), czynnik wzrostu fibroblastów 23 (FGF23) oraz białko Klotho (kofaktor FGF23) zwiększają wchłanianie wapnia z pokarmem, stymulują mobilizację wapnia z kości oraz hamują wydalanie wapnia z moczem. Przeciwstawne działanie wykazuje **kalcytonina**, która pobudza odkładanie wapnia w kościach. Wiązanie wapnia przez **szczawiany**, **fosforany** i **kwasy tłuszczowe** również zmniejsza stężenie wapnia w surowicy.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się roli **FGF23** w homeostazie wapnia. Działanie FGF23 polega na blokowaniu sekrecji PTH oraz resorpcji fosforanów w cewkach proksymalnych nerek, co odpowiada za hipofosfatemię i hiperfosfaturię. FGF23 hamuje też hydroksylację 25-hydroksycholekalcyferolu w pozycji 1 cholesterolu, natomiast stymuluje hydroksylację w pozycji 24 cholesterolu, co zaburza wchłanianie wapnia i fosforu z przewodu pokarmowego.

➢ Wartości referencyjne

Surowica	
[mg/dl] = [mmol/l] x 4	
wapń całkowity	**9-11 mg/dl (2,25-2,75 mmol/l)**
wapń zjonizowany	**4-5,2 mg/dl (1-1,3 mmol/l)**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie wapnia w surowicy (hiperkalcemia) może świadczyć o:

- nadmiernym wchłanianiu wapnia z przewodu pokarmowego
  - przedawkowanie witaminy D
  - nadmierne wytwarzanie witaminy D przez ziarniniaki (sarkoidoza) lub chłoniaki
  - niedobór czynników działających antagonistycznie do PTH (hipokortyzolemia, hipokalcytoninemia)
- nadmiernej mobilizacji wapnia z kości
  - nadmierna sekrecja PTH (nadczynność przytarczyc), somatotropiny, hormonów tarczycy, adrenaliny i noradrenaliny
  - nowotwory kości wytwarzające peptyd PTH-podobny (PTHrP)
  - nowotwory pozakostne wytwarzające czynnik pobudzający osteoklasty (OSF) lub prostaglandynę PGE-M
  - nadczynność tarczycy
  - hiperwitaminoza A
  - długotrwałe unieruchomienie
- zmniejszonym wydalaniu wapnia przez nerki
  - stosowanie diuretyków lub teofiliny
- upośledzonym odkładaniu wapnia w kościach
  - adynamiczna choroba kości u chorych dializowanych z przewlekłą niewydolnością nerek
- zatruciu glinem
- rodzinnej hipokalciurii hiperkalcemicznej (mutacje inaktywujące receptor kanału wapniowego)
- wrodzonym lub nabytym niedoborze FGF23 lub białka Klotho

Obniżone stężenie wapnia w surowicy (hipokalcemia) może świadczyć o:

- upośledzeniu biosyntezy lub sekrecji parathormonu
  - niedoczynność przytarczyc
  - oporność na PTH uwarunkowana niedoborem magnezu lub witaminy D
  - oporność na PTH uwarunkowana nadmiarem kalcytoniny lub prostaglandyny PGE
- niedostatecznej podaży wapnia z pokarmem
- zmniejszonym wchłanianiu wapnia z przewodu pokarmowego
  - zespół upośledzonego wchłaniania lub trawienia
  - niedobór witaminy D z pokarmem
- nadmiernym odkładaniu wapnia w tkankach miękkich lub kościach
  - ostre zapalenie trzustki
  - zespół „głodnych kości”
  - przerzuty nowotworowe raka piersi i gruczołu krokowego
  - stosowanie bisfosfonianów
  - hiperfosfatemia (wiązanie wapnia przez fosforany)
- nadmiernej utracie wapnia przez nerki
  - stosowanie diuretyków
  - kwasica

- zaburzeniach gospodarki witaminą D
    - niedostateczne naświetlanie skóry
    - niedobór witaminy D z pokarmem
    - zmniejszone wchłanianie witaminy D z pokarmem (zespół upośledzonego wchłaniania lub trawienia, żółtaczka cholestatyczna, niedobór enzymów trzustkowych)
    - zmniejszona 25-hydroksylacja witaminy D u chorych z miąższowym uszkodzeniem wątroby
    - zmniejszona 1α-hydroksylacja witaminy D u chorych z ostrą lub przewlekłą niewydolnością nerek
    - przyspieszony metabolizm, a przez to nasilona inaktywacja witaminy D u osób przyjmujących niektóre leki przeciwpadaczkowe (pochodne kwasu barbiturowego i hydantoiny)

Ocena stężenia wapnia zestawem *BioSystems*®

Odczynniki	• **odczynnik A** (*Arsenazo III 0,2 mmol/l, imidazol 75 mmol/l*) • **standard** (Ca^{2+} *10 mg/dl*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B** 2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety
Zasada metody	**Stężenie wapnia** w próbkach surowicy oznacza się metodą kolorymetryczną. Jony Ca^{2+} reagują w środowisku lekko zasadowym z odczynnikiem Arsenazo III tworząc purpurowy kompleks o maksimum absorpcji 650 nm. Dodatek imidazolu zmniejsza interferencje spowodowane jonami Mg^{2+}. Natężenie barwy powstałego kompleksu jest wprost proporcjonalne do stężenia wapnia w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do oznaczonych kuwet: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 15 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 15 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 15 µl **próby badanej** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówek pipety 4. Inkubować probówki przez 2 minuty w temperaturze pokojowej 5. Zarejestrować absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 650 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie wapnia** w badanej próbie obliczyć za pomocą wzoru ogólnego: $C_{Próby} = C \frac{A_{Próby}}{A_{Standardu}} \times C_{Standardu} \times$ współczynnik rozcieńczenia próby Jeżeli do kalibracji użyto załączonego standardu wapnia: $\frac{A_{Próby}}{A_{Standardu}}$ × 10 = $\frac{mg}{dl}$ wapnia $\frac{A_{Próby}}{A_{Standardu}}$ × 2,5 = $\frac{mmol}{l}$ wapnia
Interferencje	Mg^{2+}, hemoliza, lipemia
Zagadnienia do opracowania	1. Makroelementy (sód, potas, wapń, magnez, fosfor, chlor): zawartość w organizmie, zapotrzebowanie, źródła pokarmowe, funkcje biologiczne, implikacje kliniczne (niedobór oraz nadmiar)
Pytania kontrolne	1. Omów działanie jonów wapnia jako wtórnych przekaźników 2. Omów udział jonów wapnia w procesie krzepnięcia krwi 3. Omów hormonalną regulację metabolizmu wapnia 4. Omów zależności między jonami wapnia i magnezu na poziomie komórki i płynu pozakomórkowego 5. Omów udział wapnia w patogenezie osteoporozy

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

6.6. FOSFOR

➢ Podstawy biochemiczne

Całkowita zawartość **fosforu** w ustroju dorosłego człowieka wynosi ok. 750 g. Fosfor jest składnikiem kwasów nukleinowych, nośników energetycznych, fosfolipidów oraz fosfoprotein. Fosforany nieorganiczne (PO_4^{3-}) są najważniejszym anionem śródkomórkowym.

➢ Wartości referencyjne

Surowica	
[mg/dl] = [mmol/l] x 3,1	
dzieci	**4,0-7,0 mg/dl (1,29-2,26 mmol/l)**
dorośli	**2,5-4,5 mg/dl (0,81-1,45 mmol/l)**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od normy

Podwyższone stężenie fosforanów w surowicy (hiperfosfatemia) może świadczyć o:

- nadmiernym wchłanianiu fosforanów z przewodu pokarmowego
  - spożywanie mleka bogatego w fosforany
  - stosowanie środków przeczyszczających zawierających fosforany
  - stosowanie żywienia pozajelitowego
  - nadmierna podaż witaminy D
- nadmiernym uwalnianiu fosforanów z uszkodzonych tkanek
  - faza kataboliczna u chorych z ciężkimi infekcjami lub urazami
  - nadmierny wysiłek fizyczny
  - rabdomioliza
  - hemoliza
  - kwasica
  - hipertermia złośliwa
  - zespół lizy nowotworowej podczas chemioterapii
- zmniejszonym wydalaniu fosforanów przez nerki
  - niewydolność nerek
  - nadmierna reabsorbcja zwrotna fosforanów w cewkach nerkowych (niedobór PTH lub FGF23, niedoczynność przytarczyc, nadprodukcja hormonu wzrostu)
- nadmiernej mobilizacji fosforanów z kości
  - długotrwałe unieruchomienie

Hiperfosfatemia jest bezpośrednią przyczyną hipokalcemii.

Obniżone stężenie fosforanów w surowicy (hipofosfatemia) może świadczyć o:

- niedostatecznej podaży fosforanów z pokarmem
  - dieta bogatobiałkowa
- zmniejszonym wchłanianiu fosforanów z przewodu pokarmowego
  - wymioty
  - biegunki
  - stosowanie leków wiążących fosforany (np. wodorotlenek glinu, węglan wapnia)
- przemieszczaniu fosforanów z przestrzeni pozakomórkowej do śródkomórkowej
  - faza anaboliczna u chorych oparzonych lub po ciężkich urazach
  - zespół „głodnych kości”
  - zasadowica oddechowa
  - zatrucie salicylanami
- nadmiernej utracie fosforanów przez nerki
  - nadczynność przytarczyc
  - niedobór witaminy D
  - nadmierna podaż glukokortykosteroidów
  - nadmiar fosfatonin (w tym FGF23) wytwarzanych przez niektóre nowotwory lub w trakcie leczenia dożylnymi preparatami żelaza
  - tubulopatie

Ocena stężenia fosforu nieorganicznego zestawem *BioSystems®*

Odczynniki	• **odczynnik A** (*kwas siarkowy 0,36 mol/l, chlorek sodu 154 mmol/l)* • **odczynnik B** (*molibdenian amonu 3,5 mmol/l*) • **standard** (*fosfor 5 mg/dl (1,61 mmo/L)*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	1. Do kuwety dodać siedem objętości (7V) **odczynnika A** i trzy objętości (3V) **odczynnika B** 2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety
Zasada metody	**Stężenie fosforu nieorganicznego** w próbkach surowicy oznacza się metodą kolorymetryczną Fiske-Subbarowa. Jony PO_4^{3-} reagują w środowisku kwaśnym z molibdenianem amonu tworząc niebieski kompleks o maksimum absorpcji 340 nm. Natężenie barwy powstałego kompleksu jest wprost proporcjonalne do stężenia fosforanów w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do oznaczonych kuwet: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 10 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 10 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 10 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 5 minut w temperaturze pokojowej 5. Zarejestrować absorbancję (A) standardu i próby badanej przy długości fali 340 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie fosforanów** w badanej próbie obliczyć przy pomocy wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = C \frac{A_{\text{Próby}} - A_{\text{Próby ślepej}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}} \times$ współczynnik rozcieńczenia próby Jeżeli do kalibracji użyto załączonego standardu fosforu: $\frac{A_{\text{Próby}} - A_{\text{Próby ślepej}}}{A_{\text{Standardu}}} \times 5 = \frac{mg}{dl}$ fosforu $\times 1{,}64 = \frac{mmol}{l}$ fosforu
Interferencje	Brak
Zagadnienia do opracowania	1. Makroelementy (sód, potas, wapń, magnez, fosfor, chlor): zawartość w organizmie, zapotrzebowanie, źródła pokarmowe, funkcje biologiczne, przemiany w ustroju, implikacje kliniczne (niedobór oraz nadmiar)
Pytania kontrolne	1. Omów przemiany fosforu nieorganicznego w procesach energetycznych komórki 2. Omów wzajemne zależności między metabolizmem fosforu i wapnia w ustroju 3. Omów udział fosforu w patogenezie osteoporozy

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

6.7. ŻELAZO

➢ Podstawy biochemiczne

Całkowita zawartość żelaza w ustroju dorosłego człowieka wynosi ok. 3-4 g. Większość żelaza znajduje się w porfirynach (hemoglobina, mioglobina, cytochromy, peroksydaza czy katalaza), a pozostała część w związkach nieporfirynowych (ferrytyna, transferyna czy hemosyderyna).

Stężenie żelaza w surowicy zależy od:
- podaży żelaza w pokarmach
- absorpcji żelaza w przewodzie pokarmowym
- utraty żelaza przez przewód pokarmowy, nerki czy narządy moczowo-płciowe
- dystrybucji żelaza w ustroju

Oprócz oceny stężenia żelaza w surowicy, do oceny gospodarki żelazem stosuje się pomiar:
- całkowitej zdolności surowicy do wiązania żelaza (TIBC, ang. *total iron binding capacity*), która odzwierciedla stężenie transferyny
- stopnia wysycenia transferyny żelazem
- stężenia ferrytyny
- stopnia wydalania żelaza z moczem lub po podaniu desferoksaminy
- liczby syderoblastów w szpiku lub liczby erytrocytów hipochromicznych we krwi
- stężenia hepcydyny

➢ Wartości referencyjne

Surowica
[µg/dl] = [µmol/l] x 5,45
60-280 µg/dl (11-33 µmol/l)

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

➢ Odchylenia od wartości referencyjnych

Podwyższone stężenie żelaza w surowicy (hipersyderemia) może świadczyć o:
- nadmiernej podaży żelaza
  - spożywanie pokarmów bogatych w żelazo
  - spożywanie leków lub suplementów diety zawierających żelazo
  - częste transfuzje krwi
- nadmiernym wchłanianiu żelaza z przewodu pokarmowego
  - hemochromatoza dziedziczna
- upośledzonym klirensowaniu żelaza osoczowego przez niewydolną wątrobę

    - ostre i przewlekłe stany zapalne wątroby
- nadmiernym uwalnianiu żelaza z komórek
    - hemoliza
- nieprawidłowym rozmieszczeniu żelaza
    - niedokrwistości (syderoblastyczna, aplastyczna, megaloblastyczna, hemolityczna)
    - porfirie
    - zatrucie ołowiem

Obniżone stężenie żelaza w surowicy (hiposyderemia) może świadczyć o:

- niedostatecznej podaży żelaza
    - niezbilansowana dieta wegańska lub wegetariańska
    - niedożywienie
    - wyniszczenie
- upośledzonym wchłanianiu żelaza z przewodu pokarmowego
    - zespół upośledzonego wchłaniania lub trawienia
    - zespół poresekcyjny
    - achlorhydria
    - przewlekle stany zapalne przewodu pokarmowego przebiegające z biegunką
    - nadmierne spożycie kawy, herbaty, wapnia, fosforanów, szczawianów lub fitynianów
- nadmiernej utracie żelaza
    - przez przewód pokarmowy (krwawienia spowodowane przez stosowanie NLPZ, nowotwory przewodu pokarmowego, zapalenie przełyku, choroby pasożytnicze)
    - przez nerki (krwiomocz, hemoglobinuria, hemosyderynuria)
    - przez narządy płciowe (obfite miesiączki, mięśniaki)
- zwiększonym zapotrzebowaniu na żelazo przy niedostatecznej podaży
    - ciąża i laktacja
    - okres dojrzewania
    - leczenie erytropoetyną
- nadmiernym odkładaniu się żelaza w tkankach (układzie siateczkowo-śródbłonkowym)
    - choroby zapalne
    - nowotwory
- nadprodukcji hepcydyny lub defekcie matriptazy

Ocena stężenia żelaza zestawem *BioSystems*®	
Odczynniki	• **odczynnik A** (*chlorek guanidyny 1,0 mol/l, bufor octanowy 0,4 mol/l, pH 4,0*) • **odczynnik B** (*ferrozyna 8 mmol/l, kwas askorbinowy 200 mmol/l, molibdenian amonu 3,5 mmol/l*) • **standard** (*żelazo 200 µg/dl (35,8 µmo/L), woda*)
Przygotowanie odczynnika roboczego (OR)	1. Do kuwety dodać cztery objętości (4V) **odczynnika A** i jedną objętość (1V) **odczynnika B** 2. Wymieszać zawartość kuwety przy pomocy końcówki pipety
Zasada metody	**Stężenie żelaza** w próbkach surowicy oznacza się metodą kolorymetryczną. Jony Fe^{2+} reagują w środowisku kwaśnym z ferrozyną tworząc barwny kompleks o maksimum absorpcji 560 nm. Natężenie barwy powstałego kompleksu jest wprost proporcjonalne do stężenia żelaza w badanej próbce.
Wykonanie oznaczenia	1. Doprowadzić **OR** i spektrofotometr do temperatury pokojowej (16-25°C) 2. Odpipetować do oznaczonych kuwet: a) **Próba ślepa**: 1000 µl **OR** i 200 µl **wody destylowanej** b) **Standard**: 1000 µl **OR** i 200 µl **standardu** c) **Próba badana**: 1000 µl **OR** i 200 µl **próby** 3. Wymieszać zawartość kuwet przy pomocy końcówki pipety 4. Inkubować kuwety przez 5 minut w temperaturze pokojowej 5. Zarejestrować absorbancję (A) próby badanej i standardu przy długości fali 560 nm wobec próby ślepej
Obliczenia	**Stężenie żelaza** w próbie badanej obliczyć przy pomocy wzoru ogólnego: $C_{\text{Próby}} = C \frac{A_{\text{Próby}} - A_{\text{Próby ślepej}}}{A_{\text{Standardu}}} \times C_{\text{Standardu}}$
Interferencje	Hemoliza
Zagadnienia do opracowania	1. Mikroelementy (żelazo, cynk, miedź, selen, mangan, molibden, chrom, jod, fluor): zawartość w organizmie, zapotrzebowanie, źródła pokarmowe, funkcje biologiczne, przemiany w ustroju, implikacje kliniczne (niedobór oraz nadmiar)
Pytania kontrolne	1. Opisz białka transportujące i magazynujące żelazo 2. Omów procesy wchłaniania i wydalania żelaza z ustroju

Bibliografia

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Medycyna praktyczna (online)

7. SPIS WARTOŚCI REFERENCYJYCH

7.1. BIOMARKERY CHORÓB UKŁADU KRĄŻENIA

7.1.1. TRIACYLOGLICEROLE

Surowica	
< 150 mg/dl (1,7 mmol/l) [mg/dl] = [mmol/l] x 88,5	
≤ 150 mg/dl (1,7 mmol/l)	wartości niskie
150-199 mg/dl (1,70-2,25 mmol/l)	wysokie prawidłowe
200-499 mg/dl (2,26-5,64 mmol/l)	wysokie
> 500 mg/dl (> 5,56 mmol/l)	bardzo wysokie

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.1.2. CHOLESTEROL CAŁKOWITY

Surowica	
114-190 mg/dl (3,0-4,9 mmol/l) [mg/dl] = [mmol/l] x 38,5	
≤ 200 mg/dl (5,2 mmol/l)	wartości pożądane
200-239/dl (5,2-6,21 mmol/l)	graniczne/wysokie
≥ 240 mg/dl (> 6,24 mmol/l)	wysokie

Wyżej podane wartości referencyjne zostały zaproponowane przez *Amerykański Narodowy Program Edukacji Cholesterolowej* do oceny zagrożenia chorobami wieńcowymi.

7.1.3. CHOLESTEROL HDL

Surowica	
> 45 mg/dl (1,2 mmol/l)	kobiety
> 40 mg/dl (1 mmol/l)	mężczyźni
[mg/dl] = [mmol/l] x 38,5	
≤ 35 mg/dl (0,91 mmol/l)	wysokie ryzyko
> 60 mg/dl (> 1,56 mmol/l)	niskie ryzyko

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

Podane wyżej wartości graniczne służą do różnicowania osób o niskim i wysokim ryzyku wystąpienia choroby wieńcowej.

7.1.4. CHOLESTEROL LDL

Prawidłowe stężenie cholesterolu LDL zależy od ryzyka sercowo-naczyniowego.

Surowica	
[mg/dl] = [mmol/l] x 38,5	
≤ 100 mg/dl (2,59 mmol/l)	wartości optymalne
100-129 mg/dl (2,59-3,34 mmol/l)	prawie optymalne
130-159 mg/dl (3,37-4,12 mmol/l)	umiarkowane
160-189 mg/dl (4,14-4,90 mmol/l)	wysokie
≥ 190 mg/dl (4,92 mmol/l)	bardzo wysokie

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.1.5. LIPAZA

Surowica
13-60 U/l (0,22-1,00 µkat/l)

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.1.6. KREATYNINA

Surowica		
0,6-1,3 mg/dl (53-115 µmol/l) [mg/dl] = [µmol/l]/88		
	Metoda Jaffé'go bez kompensacji	Metoda Jaffé'go z kompensacją
mężczyźni	**0,9-1,3 mg/dl (80-115 µmol/l)**	**0,7-1,2 mg/dl (62-106 µmol/l)**
kobiety	**0,6-1,1 mg/dl (53-97 µmol/l)**	**0,5-0,9 mg/dl (44-80 µmol/l)**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.1.7. MOCZNIK

Surowica
15-40 mg/dl (2,5-6,7 mmol/l) [mg/dl] = [mmol/l]/0,166
azot mocznika (BUN, *blood urea nitrogen*) 7-18,8 mg/dl (5-13,4 mmol/l) **[mg/dl] = [mmol/l]/0,36**

Stężenie mocznika w okresie noworodkowym jest niższe, a u osób po 60 roku życia wyższe niż u dorosłych. Stężenie jest również nieco wyższe u mężczyzn niż u kobiet.

7.1.8. KWAS MOCZOWY

Surowica	
3-7 mg/dl (180-240 µmol/l) [mg/dl] = [µmol/l]/60	
mężczyźni	**3,5-7,2 mg/dl (210-420 µmol/l)**
kobiety	**3-6 mg/dl (180-350 µmol/l)**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.2. BIOMARKERY CHORÓB METABOLICZNYCH

7.2.1. GLUKOZA

Osocze	
[mg/dl] = [mmol/l] x 18	
dzieci, dorośli	**70-100 mg/dl (3,9-5,5 mmol/l)**

7.2.2. HEMOGLOBINA GLIKOWANA

Poniższe wartości referencyjne zostały ustalone przez *Diabetes Control and Complications Trial Research Group* (DCCT) i zostały zaakceptowane dla populacji osób bez cukrzycy oraz do oceny stopnia kontroli poziomu glukozy we krwi u pacjentów z cukrzycą.

Surowica		
IFCC (mmol/mol)	NGSP-DCCT (%)	
< 39	**> 5,7**	wartości docelowe
39-46	**5,7-6,4**	stan przedcukrzycowy
> 48	**> 6,5**	cukrzyca

IFCC – *International Federation of Clinical Chemistry*
NGSP-DCCT - *National Glycohemoglobin Standarization Program- Diabetes Control and Complications Trial*

7.2.3. FRUKTOZAMINA

Surowica
1,9-2,9 mmol/l

Podane zakresy mają jednie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

Wartości są nieco niższe (5%) u dzieci. Wartości referencyjne fruktozaminy zależą od stężenia albumin.

7.3. BIOMARKERY CHORÓB UKŁADU POKARMOWEGO

7.3.1. AMINOTRANSFERAZA ASPARAGINIANOWA

Surowica		
	37°C	30°C
bez fosforanu pirydoksalu	**< 40 U/l = 0,67 µkat/l**	**< 25 U/l = 0,42 µkat/l**
z fosforanem pirydoksalu	**< 50 U/l = 0,83 µkat/l**	**< 30 U/l = 0,50 µkat/l**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.3.2. AMINOTRANSFERAZA ALANINOWA

Surowica		
	37°C	30°C
bez fosforanu pirydoksalu	**< 40 U/l = 0,67 µkat/l**	**< 25 U/l = 0,42 µkat/l**
z fosforanem pirydoksalu	**< 50 U/l = 0,83 µkat/l**	**< 30 U/l = 0,50 µkat/l**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.3.3. GAMMA-GLUTAMYLOTRANSFERAZA

Surowica				
temperatura reakcji	mężczyźni		kobiety	
	U/l	µkat/l	U/l	µkat/l
25°C	**< 22**	**< 0,37**	**< 15**	**< 0,25**
30°C	**< 35**	**< 0,59**	**< 24**	**< 0,40**
37°C	**< 55**	**< 0,92**	**< 38**	**< 0,64**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.3.4. KINAZA KREATYNOWA

Surowica				
temperatura reakcji	mężczyźni		kobiety	
	U/l	**µkat/l**	**U/l**	**µkat/l**
25°C	**10-65**	**167-1084**	**7-55**	**117-917**
30°C	**15-105**	**250-750**	**10-80**	**167-1334**
37°C	**38-174**	**633-2900**	**26-140**	**433-2334**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

U dzieci aktywność CK w surowicy jest wyższa niż u dorosłych.

7.3.5. FOSFATAZA ZASADOWA

	Surowica	
temperatura reakcji	mężczyźni	kobiety
25°C	**< 75 U/l = 1,25 µkat/l**	**< 68 U/l = 1,13 µkat/l**
30°C	**< 87 U/l = 1,45 µkat/l**	**< 80 U/l = 1,33 µkat/l**
37°C	**< 115 U/l = 1,92 µkat/l**	**< 105 U/l = 1,75 µkat/l**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

U dorastających dzieci aktywność ALP w surowicy jest wyższa i bardzo zmienna.

7.3.6. DEHYDROGENAZA MLECZANOWA

	Surowica	
temperatura reakcji	**U/l**	**µKat/l**
25°C	**105-210**	**1,70-3,50**
30°C	**140-280**	**3,30-4,70**
37°C	**207-414**	**3,40-6,80**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.3.7. α-AMYLAZA

	Surowica	
temperatura reakcji	**U/l**	**µkat/l**
25°C	**12-45**	**0,21-0,75**
30°C	**17-60**	**0,28-1,00**
37°C	**22-80**	**0,37-1,33**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.4. INNE BIOMARKERY

7.4.1. BIAŁKO CAŁOKWITE

Surowica
60-80 g/l (6-8 g/dl)

Stężenie białka całkowitego w surowicy jest niższe u dzieci w porównaniu do dorosłych. Stężenie białka całkowitego w osoczu jest o 2 do 4 g/l wyższe niż w surowicy z powodu obecności fibrynogenu, jak i innych śladowych obecności białek.

7.4.2. ALBUMINA

Surowica
35-50 g/l (3,5-5 g/dl)

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.4.3. BILIRUBINA

Surowica	
[mg/dl] = [µmol/l]/17	
bilirubina całkowita	**0,3-1,2 mg/dl (5,1-20,5 mol/l)**
bilirubina bezpośrednia (sprzężona)	**0,1-0,4 mg/dl (1,7-6,8 mol/l)**
bilirubina pośrednia (niesprzężona)	**0,2-0,8 mg/dl (3,4-13,7 mol/l)**

7.4.4. MAGNEZ

Surowica
[mg/dl] = [mmol/l] x 2,4
1,7-2,4 mg/dl (0,66-1,07 mmol/l)

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.4.5. WAPŃ

Surowica	
[mg/dl] = [mmol/l] x 4	
wapń całkowity	**9-11 mg/dl (2,25-2,75 mmol/l)**
wapń zjonizowany	**4-5,2 mg/dl (1-1,3 mmol/l)**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.4.6. FOSFOR

Surowica	
[mg/dl] = [mmol/l] x 3,1	
dzieci	**4,0-7,0 mg/dl (1,29-2,26 mmol/l)**
dorośli	**2,5-4,5 mg/dl (0,81-1,45 mmol/l)**

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

7.4.7. ŻELAZO

Surowica
[µg/dl] = [µmol/l] x 5,45
60-280 µg/dl (11-33 µmol/l)

Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych

8. Wzór sprawozdania

Imię i Nazwisko

Data* wykonania ćwiczenia

*Data wykonania ćwiczenia nie zawsze jest datą przygotowania sprawozdania

Nr grupy

TYTUŁ ĆWICZENIA

1. CEL ĆWICZENIA

Zdanie opisujące główny cel i cele poboczne (jeśli są obecne)

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA (10-15 zdań)

Krótkie nawiązanie do tematyki zagadnienia, potrzeby wykonania badania, celowości wybranej metodyki i jej ograniczeń

3. CZĘŚĆ METODYCZNA

3.1. Zasada metody

3.2. Opis wykonywanych czynności

Najważniejsze etapy pracy, wskazanie mas naważek i stężeń, które należy użyć do obliczeń

4. WYNIKI

4.1. Obserwacje

4.2. Uzyskane dane

4.3. Wykorzystywane wzory

4.4. Obliczenia

W przypadku aktywności enzymów wyniki należy przedstawić w unitach i katalach

4.5. Wartości referencyjne

5. WNIOSKI

Wnioski wynikające z ćwiczenia wraz z krótkim komentarzem

6. ZALICZENIE

Data i podpis prowadzącego

9. Literatura podstawowa

1. Bańkowski E., 2020. *Biochemia.* Wrocław: Edra Urban & Partner
2. Dennis R. Ferrier 2018. *Biochemia*. Wrocław: Edra Urban & Partner
3. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wrocław: Edra Urban & Partner
4. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2015. *Badania laboratoryjne*. Warszawa: PZWL
5. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. *Diagnostyka laboratoryjna. Tom I*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny
6. Kłyszejko-Stefanowicz L., 2013. *Ćwiczenia z biochemii.* Warszawa: PWN
7. Kalinowski L., 2017. *Przypadki laboratoryjno-kliniczne*. Wrocław: MedPharm
8. Scott M.G., Gronowski A.M., Eby C.S., 2007. *Medycyna laboratoryjna w praktyce —przypadki kliniczne*. Wrocław: MedPharm
9. Rodvel V., Bender D., Bodham K., Kennelly P., Weil P., 2018. *Biochemia Harper*. Warszawa: PZWL
10. Bain C., Page A., Webb P., 2021. *Epidemiologia - podręcznik dla studentów i praktyków.* Warszawa: Scholar
11. Pawlas K., Gać P., Pawlas N., 2024. *Zdrowie środowiskowe z elementami medycyny środowiskowej.* Warszawa: PZWL
12. Mamcarz A., Śliż D., 2024. *Medycyna stylu życia.* Warszawa: PZWL
13. Medycyna praktyczna (online)

10. Literatura uzupełniająca

1. Hames D., Hooper N., 2021. *Krótkie wykłady Biochemia*. Warszawa: PWN
2. Kędryna T., 2010. *Chemia ogólna z elementami biochemii*. Kraków: ZamKor
3. Gałasiński W., 2004. *Chemia medyczna. Podręcznik dla studentów medycyny* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL
4. Graham P., 2019. *Chemia medyczna*. Warszawa: PWN
5. Hart H., 2009. *Chemia organiczna. Krótki kurs*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL
6. Żak I., 2001. *Chemia medyczna*. Katowice: Śląska Akademia Medyczna
7. Maciejczyk M., Żebrowska E., Żendzian-Piotrowska M., 2021. *Wybrane zagadnienia z ekotoksykologii, toksykologii środowiska i toksykologii żywności.* Białystok: Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

1950