
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. LVII, 11

SECTIO DD

2002

Katedra Chorób Wewnętrznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie

PRZEMYSŁAW SOBIECH, ZYGMUNT KULETA, ARTUR STOPYRA

Diagnostyka izoenzymatyczna chorób przeżuwaczy

Isoenzymatic diagnosis of ruminants diseases

Słowa kluczowe: przeżuwacze, LDH, izoenzymy

Key words: ruminants, LDH, isoenzymes

Wprowadzone w końcu lat pięćdziesiątych do weterynaryjnych badań diagnostycznych oznaczanie aktywności enzymatycznej znalazło szerokie zastosowanie w badaniach naukowych i zakładach higieny weterynaryjnej. Dla ułatwienia interpretacji wyników tych badań wprowadzono kliniczny podział enzymów odbiegający od ich funkcji i budowy biochemicznej. Zostały one podzielone na: 1) enzymy sekrecyjne, 2) enzymy wskaźnikowe, 3) enzymy ekskrecyjne.

Enzymy sekrecyjne – wytwarzane przez komórki np. wątroby zlokalizowane w reticulum endoplazmatycznym szorstkim przekazywane są do krwi. Uszkodzenie komórki wpływa na obniżenie wytwarzania enzymu i zmniejsza jego aktywność we krwi. Zmiany aktywności enzymów tej grupy wskazują na zaburzenia metaboliczne, nie określają natomiast stopnia uszkodzenia komórki. Do enzymów sekrecyjnych należą między innymi esteraza cholinowa, esteraza cholesterolowa i transferaza glukuronylowa.

Enzymy wskaźnikowe – w stanach fizjologicznych występują w surowicy w niewielkich ilościach, natomiast ich aktywność wzrasta wyraźnie przy uszkodzeniu komórek wątroby. Uważane są za najlepszy wskaźnik stanów patologicznych tego narządu. Grupa ta obejmuje enzymy biorące udział w podstawowych procesach metabolicznych komórki i zaliczamy do nich: enzymy cyklu

glikolitycznego, aminotransferazy, enzymy cyklu ornitynowego, enzymy cyklu kwasów trójkarboksylowych, dehydrogenazę sorbitolową, leucyloaminopeptydazę, gammaglutamylotranspeptydazę i wiele innych. W komórce mogą one występować w cytoplazmie (aminotransferazy) lub w organellach komórkowych (enzymy cyklu Krebsa lokalizują się w mitochondriach) i dlatego dopiero przy znacznym uszkodzeniu komórki następuje ich wypływ do krwi.

Enzymy eksekrecyjne – są w większości pochodzenia pozawątrobowego, a komórki wątroby wychwytyują je z krwi, do której dostały się z innych narządów. Należą do nich między innymi fosfataza alkaliczna i 5'-nukleotydaza.

Niektóre z wcześniej wymienionych enzymów mogą występować w różnych formach izodynamicznych, czyli wykazując swoistą aktywność katalityczną do jednej i tej samej reakcji chemicznej w żywym ustroju mogą występować w różnych formach molekularnych. Formy te, zwane izoenzymami, różnią się od siebie pod względem wielu cech, np.: powinowactwem do tkanek, kinetyką enzymatyczną, ruchliwością elektroforetyczną, właściwościami chromatograficznymi i immunologicznymi. Z wymienionych cech najbardziej znaną i wykorzystywaną w diagnostyce jest szybkość wędrówki w polu elektrycznym.

Zjawisko heterogenności enzymów jest bardzo powszechne i stanowi wyraz przystosowania się tkanek i narządów do określonych warunków środowiska. Właściwość ta od dawna jest wykorzystywana w diagnostyce laboratoryjnej, gdyż uszkodzony narząd czy tkanka uwalnia do krwiobiegu tę formę molekularną danego enzymu, w którą jest obficie zaopatrzona. Z klinicznego punktu widzenia największe znaczenie ma oznaczanie aktywności izoenzymów w surowicy, mniej przydatne jest wykonywanie tego oznaczenia w materiale biopsyjnym pochodzącym z różnych tkanek i narządów.

Najwięcej obserwacji dotyczących heterogenności enzymów poczyniono na dehydrogenazie mleczanowej. Jest to jeden z najbardziej powszechnych enzymów w przyrodzie i występuje w każdej komórce, gdzie odbywa się proces glikolizy. W płynach biologicznych i w homogenatach tkankowych można znaleźć maksymalnie 5 różnych form LDH. Nie wszystkie jednak narządy i tkanki mają jednocześnie 5 frakcji tego enzymu. W niektórych występują 2, 3 lub nawet tylko jedna z nich. Układ frakcji enzymu, typowy dla danego narządu lub tkanki, nazywany jest jego obrazem izoenzymatycznym. Frakcje LDH zostały podzielone pod względem szybkości ich wędrówki w polu elektrycznym – i tak najszybciej wędruje LDH₁, potem LDH₂, LDH₃, LDH₄ i LDH₅ (14).

Wykazano, że w homogenatach mięśnia sercowego większości badanych gatunków zwierząt występuje przewaga izoenzymu LDH₁, a w homogenatach mięśni szkieletowych i wątroby dominuje frakcja LDH₅ (15). Inne tkanki lub narządy wykazują przewagę frakcji pośrednich. Częsteczką LDH jest tertramery, zbudowanym z dwóch podjednostek – podjednostki H (*heart*) i podjed-

nostki M (*muscle*). Frakcja LDH₁ składa się wyłącznie z podjednostek typu H, natomiast frakcja LDH₅ zawiera tylko podjednostki typu M. Izoenzymy o pośredniej szybkości wędrowania w polu elektrycznym są formami mieszanymi i zawierają różne liczby podjednostek H i M (2). Obie podjednostki są łańcuchami polipeptydowymi o masie cząsteczkowej ok. 35000 i zbliżonych właściwościach antygenowych (2).

Opisano kilka technik rozdziału izoenzymatycznego LDH i innych enzymów. Najbardziej popularna jest metoda elektroforetyczna, gdzie otrzymane izoenzymy LDH można podzielić na frakcje szybko wędrujące (anodowe): LDH₁, LDH₂ i LDH₃ oraz wolno wędrujące (katodowe): LDH₄ i LDH₅ (15). Innymi metodami są rozdziały na kolumnach chromatograficznych lub metody immunologiczne – są one bardziej czułe, ale mają ograniczone zastosowanie (8).

Dehydrogenaza mleczanowa katalizuje odwracalną reakcję konwersji pirogronianu w mleczan w obecności NADH. Różnice w aktywności poszczególnych izoenzymów w tkankach wynikają z tego, że frakcje katodowe (LDH₄, LDH₅) katalizują reakcję przy dużej ilości nagromadzonego mleczanu (czyli tam, gdzie dominują przemiany beztlenowe), natomiast izoenzymy anodowe (LDH₁, LDH₂ i LDH₃) znajdujące się w tkankach z tlenową przemianą pirogronianu w cyklu kwasów trójkarboksylowych (14).

U bydła największą całkowitą aktywność LDH zanotowano głównie w mięśniu sercowym, wątrobie i nerkach. W narządach tych przeważają frakcje LDH₁ i LDH₂ (ok. 35% całkowitej aktywności enzymu). W surowicy bydła dominują także frakcje anodowe – LDH₁ 40% całkowitej aktywności, LDH₂ 25% aktywności całkowitej enzymu (3, 6, 12).

W mięśniu sercowym, nerkach i wątrobie owiec dominuje LDH₁ – ok. 80% całkowitej aktywności LDH, w tkance płucnej najwyższą aktywność wykazują LDH₁ i LDH₃ – ok. 30% całkowitej aktywności. W surowicy owiec przeważają zaś frakcje: LDH₁ – 52% całkowitej aktywności oraz LDH₃ – 22% całkowitej aktywności (3).

Pierwsze doniesienia na temat wykorzystania rozdziału izoenzymatycznego LDH w diagnozowaniu chorób przeżuwaczy pojawiły się w latach sześćdziesiątych, kiedy B o y d (4) stwierdził znaczny wzrost aktywności frakcji LDH₅ u owiec z ostrą postacią pokarmowej dystrofii mięśni. K e l l e r (6) wykazał, że po doświadczalnym uszkodzeniu wątroby bydła w surowicy przeważała frakcja LDH₁, a w uszkodzeniu mięśni najwyższą aktywność wykazywał izoenzym LDH₅. Autor ten stwierdził, że aktywność LDH₅ rośnie bardzo szybko, bo już po 6 godz. od momentu uszkodzenia tkanek i utrzymuje się na wysokim poziomie do 30 godz. po zadziałaniu czynnika chorobotwórczego. Przydatne okazało się także oznaczanie zymogramu LDH w tkankach. Stwierdzono, że profil izoenzymatyczny tkanki wątrobowej przeżuwaczy w zwyrodnieniu tłuszczowym,

nekrozie i zwyrodnieniu wodniczkowym ulegał przesunięciu w kierunku znacznego wzrostu aktywności frakcji LDH_1 i LDH_2 (15).

Oznaczanie profilu izoenzymatycznego LDH w chorobach nowotworowych okazało się czułym testem diagnostycznym. Wykazano, że w przebiegu wspomnianych procesów chorobowych z reguły dochodzi do wzrostu aktywności frakcji LDH_1 i LDH_2 (1, 5). Podobną przydatność oznaczania profilu izoenzymatycznego LDH surowicy do diagnozowania subklinicznych form pokarmowej dystrofii mięśni jagniąt wykazano w badaniach własnych. Otrzymano wyniki świadczące o znacznym, bo aż pięciokrotnym, wzroście aktywności mięśniowego izoenzymu LDH_5 w surowicy, przy równoczesnym braku jakichkolwiek klinicznych objawów choroby, co potwierdza w tym przypadku podkliniczny stan uszkodzenia mięśni badanych zwierząt (10).

Innym enzymem, którego heterogenność została wykorzystana w diagnostyce laboratoryjnej, jest kinaza kreatynowa. Odgrywa ona kluczową rolę w metabolizmie energii w komórce katalizując odwracalną reakcję przemiany kreatyny w fosfokreatynę z udziałem ATP. W tkankach są syntetyzowane dwie cytozolowe formy izoenzymów kinazy: typ mózgowy (CK-B) oraz typ mięśniowy (CK-M), a także dwie formy mitochondrialne: CK-Mi_A (wszechobecny) oraz sarkomeryczny CK-Mi_B. Te dwa ostatnie izoenzymy są związane z wewnętrznymi membranami mitochondrialnymi (11).

W żywym organizmie formy cytozolowe CK-M i CK-B składają się na homo i heterodimery enzymatyczne tworząc izoenzymy CK, których wyróżniono 3 rodzaje: CK-MM, CK-MB oraz CK-BB, podczas gdy izoenzymy mitochondrialne występują w dwóch formach oligomerycznych. W tkance mięśniowej mięśni szkieletowych główną formą jest CK-MM i występuje ona razem z dużą ilością mitochondrialnego CK-Mi_B. Izoenzym CK-BB jest szerzej rozpowszechniony i występuje głównie w mózgu, mięśniach gładkich oraz w mięśniu sercowym. Dla serca najbardziej charakterystyczny jest jednak izoenzym CK-MB, a jego aktywność wzrasta znacznie przy schorzeniach tego narządu (11).

Piśmiennictwo dotyczące wykorzystania rozdziału izoenzymatycznego kinazy kreatynowej do diagnozowania schorzeń przeżuwalczy jest dosyć skromne. W pracy Visser i wsp. (13) wykazano wzrost aktywności CK-BB w przypadku encephalomalacji u owiec, natomiast Kim-Duc k h w a n i wsp. (7) odnotowali zmiany w obrazie izoenzymatycznym surowicy kóz, u których sztucznie wywołano niewydolność serca. W tym przypadku stwierdzono znaczne podwyższenie aktywności izoenzymu CK-BB oraz CK-MB, bez zmian w aktywności frakcji mięśniowej, czyli CK-MM.

Ze względu na to, że kinaza kreatynowa ma największe powinowactwo do tkanki mięśniowej, a szczególnie do mięśni szkieletowych, oznaczanie całkowitej aktywności kinazy w surowicy ma duże znaczenie diagnostyczne w rozpo-

znawaniu różnego rodzaju dystrofii mięśniowych u zwierząt. Wydaje się, że rozdział izoenzymatyczny kinazy w surowicy, a zwłaszcza oznaczenie jej frakcji mięśniowej (CK-MM), byłby bardzo pomocny we wczesnym diagnozowaniu tego typu schorzeń, niestety dotychczas takich badań u przeżuwaczy nie prowadzono.

W diagnostyce laboratoryjnej schorzeń zwierząt często oznaczana jest także fosfataza alkaliczna. Występuje ona we wszystkich tkankach hydrolizując estry monofosforanowe, a optimum jej działania przypada między pH 9,0 a 10,5 (2). Udało się wyizolować kilka izoenzymów AP, ale niestety nie ma do tej pory dobrych i dogodnych metod na dokładne poznanie ich działania i lokalizacji. W medycynie ludzkiej uważa się, że głównym źródłem enzymu występującego w krwi są izoenzymy: wątrobowy, kostny, jelitowy i łożyskowy (2). Dane literaturowe na temat izoenzymów fosfatazy występujących u przeżuwaczy są rozbieżne. Jedni autorzy podają, że można je podzielić na tzw. niespecyficzne tkankowe izoenzymy AP, do których zaliczają: izoenzym wątrobowy, kostny i nerkowy oraz specyficzne tkankowe pochodzące z jelit, łożyska i komórek jąder (9). Inni twierdzą, że w surowicy bydła są obecne izoenzymy pochodzące z wątroby, kości, nerek i jelit (17). Badania zmian rozkładu izoenzymatycznego AP surowicy w przebiegu dysfunkcji wątroby i niedoboru fosforu u krów mlecznych wykazały obecność trzech rodzajów izoenzymów – frakcji wątrobowej, kostnej oraz jelitowej (16). Stwierdzono, że przy zaburzeniach w wątrobie większą aktywność (w porównaniu z grupą kontrolną) miała frakcja wątrobowa, a w niedoborze fosforu frakcja kostna. Otrzymane wyniki sugerują przydatność oznaczania zymogramu AP w diagnozowaniu tego typu schorzeń u bydła. Jednak ze względu na niepoznaną do końca specyfikę tkankową izoenzymów AP u zwierząt oznaczanie ich aktywności w tkankach czy też surowicy ma znaczenie bardziej naukowe niż diagnostyczne, a szersze wykorzystanie otrzymanych w ten sposób wyników w praktyce weterynaryjnej wymaga podjęcia szeroko zakrojonych badań.

PIŚMIENNICTWO

1. A h m e d S. A.: A preliminary report on the prognostic value of selected diagnostic enzymes among certain and schistosomal malignant patients. *J. Egypt. Soc. Parasit.* **25**, (3), 659, 1996.
2. Angielski S., Dominiczak M. H. (red.): *Biochemia kliniczna*. Wyd. I. MAKmed s c Gdańsk, 1993.
3. Beatty E. M., Doxey D. L.: Lactate dehydrogenase and creatine kinase isoenzyme levels in the tissues and serum of normal lambs. *Res. Vet. Sci.* **35**, (3), 325, 1983.
4. Boyd J. W.: Serum enzyme changes in lambs with experimentally induced acute muscular dystrophy. *Res. Vet. Sci.* **5**, 419, 1964.

5. Edler von Eyben F., Lindegard-Madsen E., Blaabjerg O., Hyltoft-Petersen P.: Serum lactate dehydrogenase isoenzyme I. An early indicator of relapse in patients with testicular germ cell tumors. *Acta Oncol.* **34**, (7), 925, 1995.
6. Keller P.: Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal bovine serum and during experimental and muscle damage. *Res. Vet. Sci.* **17**, (1), 49, 1974.
7. Kim-Duckhwan, Lee-KyoYoung, Chang-Seek J., Song-Kun H.: Blood chemistry in the diagnosis of cardiac disease in ruminants. *Kor. J. Vet. Med.* **35**, (2), 399, 1995.
8. Maekawa M.: Lactate dehydrogenase isoenzymes. *J. Chrom.* **429**, 373, 1988.
9. McDougall K., Beecroft J., Wasnidge C., King W.A., Hahnel A.: Sequences and expression patterns of alkaline phosphatase isozymes in preattachment bovine embryos and the adult bovine. *Mol. Reprod. Develop.* **50**, 7, 1988.
10. Sobiech P., Kuleta Z.: Levels of selected biochemical indicators of serum and blood during subclinical forms of nutritional muscular dystrophy in lambs. *Polish J. Vet. Sci.* **2**, (1), 37, 1999.
11. Stolz M., Walliman T.: Myofibrillar interaction of cytosolic creatine kinase (CK) isoenzymes: allocation of N-terminal binding epitope in MM-CK and BB-CK. *J. Cell. Sci.* **111**, 1207, 1998.
12. Sutiakova I., Dalliova K., Sutiak V., Pijakova N.: Izoenzymy laktadehydrogenazy u plemenných oviec a barancek. *Vet. Med.* **38**, (10), 609, 1993.
13. Visser J. R., Vermeulen D. J., Vellema P., Gruys E.: Total CK and CK-BB activity in serum from sheep with scrapie. *Vet. Quart.* **14**, (4), 157, 1992.
14. Wang X.C., Jiang L., Zhou H.M.: Minimal functional unit of lactate dehydrogenase. *J. Protein. Chem.* **16**, (3), 227, 1997.
15. Yasuda J., Syuoto B., Too K., Ohfuji S.: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in bovine liver tissue. *Jap. J. Vet. Sci.* **51**, (4), 733, 1989.
16. Yin G.R., Yang J.Y., Yao S.Z., Li J. H.: Separation of dairy cow serum alkaline phosphatase isoenzymes and identification of its tissue of origin using polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Vet. Zoot. Sinic.* **24**, (2), 125, 1993.
17. Yin G.R., Yang J.Y., Yao S.Z., Li J. H.: Diagnostic evaluation of serum alkaline phosphatase isoenzymes in dairy cows with aphosphorosis and hepatic function disorders. *Acta Vet. Zoot. Sinic.* **24**, (4), 359, 1993.

SUMMARY

New diagnostic methods are improved in clinical practice. One of these methods is isoenzymatic separation of some enzymes in serum or tissues. Estimation of isoenzymes of LDH, AP and CK has diagnostic usefulness. Activity of isoenzyme LDH₁ increased in liver damage and activity of LDH₅ increased in muscle damage in ruminants. Activity of LDH₁ and LDH₂ increased in tumor diseases. Separation of CK isoenzymes is useful in diagnosis of sheep encephalomalacia (increase of CK-BB) and cardiac failure of goats (increase of CK-MB). Four fractions of AP were found – liver, bone, intestinal and placental. Although some data about their changing in ruminants disease can be found their tissue specific have not been recognized yet.