

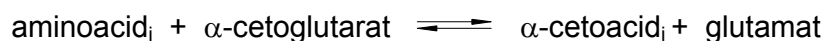
## L8. Metabolismul proteinelor. Investigarea transaminazelor

### Introducere

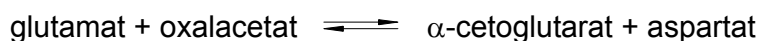
În cadrul metabolismului substanțelor proteice, proteinele sunt catabolizate în prima etapă până la constituentii lor primari, aminoacizii. Aceștia sunt folosiți atât pe căi anabolice (sinteza de proteine, sinteza de baze purinice și pirimidinice, porfirine, amine biologice active, etc.) cât și catabolice. În cazul catabolismului aminoacizilor, în scopul utilizării scheletului lor hidrocarbonat, prima etapă o constituie procesul de dezaminare (fie prin dezaminare oxidativă, fie prin transaminare). Transaminazele sau aminotransferazele sunt un grup de enzime tisulare, care au ca și grupare prostetică piridoxal-5-fosfatul și care catalizează interconversia unui aminoacid într-un  $\alpha$ -cetoacid prin transferul grupării aminice unui alt  $\alpha$ -cetoacid:



O bună parte din  $\alpha$ -aminoacizi transferă gruparea aminică  $\alpha$ -cetoglutaratului, cu formare de acid glutamic:



care la rândul său, într-o a doua reacție de transaminare, transferă gruparea amino oxalacetatului, reacție catalizată de glutamat-aspartat transaminaza:



Gruparea aminică a majorității aminoacizilor este canalizată înspre formarea glutamatului sau aspartatului, care la rândul lor pot trece unul în celălalt conform reacției precedente.

Dezaminarea oxidativă a glutamatului produce amoniac și regenerează acidul  $\alpha$ -cetoglutaric pentru un nou ciclu de reacții de transaminare. Amoniacul și aspartatul sunt furnizorii de grupări amino în sinteza ureei.

Reacția de transaminare din mușchi utilizează ca substrat acidul piruvic, astfel că produsul reacției este alanina:



Alanina formată este transferată în sânge, care o transportă la ficat, unde suferă o reacție de transaminare, în urma căreia rezultă piruvatul ce va fi utilizat în gluconeogeneză. Glucoza rezultată este transportată pe cale sanguină la mușchi, unde este catabolizată oxidativ la piruvat. Acest ciclu poartă numele de *ciclul glucoză-alanină* și are menirea de-a transporta azotul de la mușchi la ficat.

Transaminazele prezente în sânge sunt de proveniență exclusiv intracelulară și prezintă o concentrație în ser de mii și zeci de mii de ori mai mică decât în celule. Concentrația lor serică crește în cazul producerii unei alterări a membranei celulare, care permite trecerea lor în lichidul interstițial, limfă și plasmă.

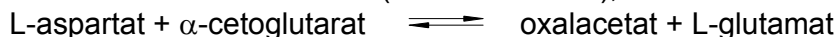
Amplitudinea creșterii concentrației transaminazelor în ser depinde de mai mulți factori între care: localizarea intracelulară și permeabilitatea membranelor celulare și mitocondriale, gradul de vascularizare a organului lezat, solubilitatea enzimei în lichidul extracelular, viteza de catabolizare a enzimei ajunsă în plasmă precum și numărul de celule lezate. Enzimele (și transaminazele nu fac excepție)

sunt supuse permanent unor procese de transformare ce implică sinteza, activarea, inactivarea și catabolizarea lor.

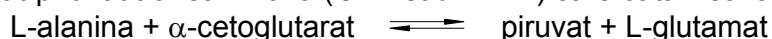
După ce transaminazele au ajuns în plasmă activitatea lor scade rapid. Timpul de înjumătățire (exprimat în ore) este pentru ASAT de aproximativ 46-58 ore iar pentru ALAT de 63-88 ore (doar acele enzime a căror timp de înjumătățire este mai mare de 6 ore constituie obiectul investigațiilor de rutină din laboratorul clinic). Scăderea activității enzimatică poate fi cauzată de: inactivarea enzimelor, eliminarea lor pe cale urinară, precum și de captarea și degradarea lor de către macrofage.

Pentru diagnosticul clinic prezintă importanță deosebită:

- a) glutamat-oxalacetat transaminaza (GOT sau ASAT), care catalizează reacția:



- b) glutamat-piruvat transaminaza (GPT sau ALAT) care catalizează reacția:



În citoplasma și mitocondriile celulelor se găsesc izoenzime transaminazice diferite. GOT este biloculară, cu localizare atât în mitocondrie cât și în citoplasmă, în timp ce GPT este prezentă doar în citoplasmă. De exemplu, în condițiile unei injurii blânde a țesutului hepatic, izoenzima ce apare în ser provine din citoplasma celulară, deși este prezentă și o cantitate mică din izoenzima mitocondrială. La vătămarea severă a țesutului și izoenzima mitocondrială este eliberată în cantități semnificative.

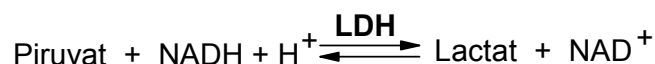
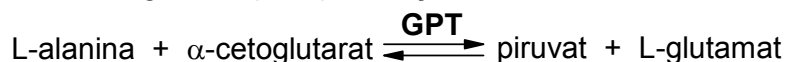
Determinarea activității transaminazelor serice se poate efectua prin mai multe metode, printre care sunt metoda bazată pe reacții de culoare și testul optic. În continuare se prezintă o variantă bazată pe reacții de culoare și una bazată pe testul optic.

### **Aplicație practică**

#### **Determinarea activității L-Alanin: 2-cetoglutarataminotransferazei (E.C.2.6.1.2.) (ALAT) sau glutamat-piruvat transaminazei (GPT)**

### **Principiu**

Determinarea GPT se efectuează rapid și foarte exact prin metoda testului optic, cuplând reacția de măsurat, catalizată de GPT, cu o reacție indicatoare, catalizată de lactat dehidrogenază (LDH). Reacțiile sunt următoarele:



Se înregistrează variația absorbției NADH la 340 nm, aceasta fiind direct proporțională cu cantitatea de substrat transformată (L-alanina).

### **Reactivi (kit Fluitest GPT ALT)**

1. Reactiv 1 – enzimatic tamponat: tampon TRIS 100 mmol/l, pH 7,8; L-alanină 500 mmol/l; lactat dehidrogenază 1200 U/l
2. Reactiv 2 – substrat: NADH<sub>2</sub> 0,18 mmol/l; 2-oxoglutarat de sodiu 15 mmol/l

**!!!! Reactivul 1 se amesteca cu reactivul 2 în raport volumetric 5:1 în prealabil**

### 3. Material biologic: ser sanguin **nehemolizat**.

#### **Aparatură și materiale**

- Spectrofotometru UV cu dispozitiv de termostatare al cuvelor, cuve de cuarț (sau din plastic) cu grosimea de strat de un cm
- Pipetă automată cu volum reglabil
- Cronometru

#### **Mod de lucru**

- Se etalonează spectrofotometrul față de aer (cuva goală).
- Se pipetează în cuva spectrofotometrică:
  - 1,00 ml Reactiv de lucru
  - 0,10 ml ser sanguin
- Se incubează cuva la 25°C timp de 1 minut. Se amesteca reactivii prin pipetare.
- Se citește absorbția inițială ( $A_{0min}$ ) la 340 nm și se declanșează simultan cronometrul. Se repetă citirile după exact 1, 2 și 3 minute.

#### **Calcul**

$$\text{activitate GPT} = 1746 \times \Delta A / \text{min (U/I)}$$

Unde:  $\Delta A$  = reprezintă diferența ( $A_{3min} - A_{0min}$ )

#### **Valori normale**

- femei < 35 U/I
- bărbați < 50 U/I

#### **Semnificație clinică**

Transaminazele sunt larg distribuite în țesuturile umane; atât GOT cât și GPT sunt în mod normal prezente în plasma umană, bilă, lichidul cerebrospinal și salivă, dar nici una nu este prezentă în urină, în afară de cazul în care rinichiul prezintă leziuni. În **hepatita virală** și alte forme de boli hepatice asociate cu necroza hepatică, nivelele GOT și GPT în ser sunt crescute chiar și înainte de instalarea semnelor clinice și a simptomelor bolii, ca icterizarea.

Activitatea celor două enzime poate să atingă valori de până la 100 de ori mai mari decât valorile normale, mai des întâlnindu-se o creștere de 20-50 de ori. În hepatitele toxice sau virale activitatea GPT este în general la fel de mare ca a GOT. Valorile înregistrate în ciroze variază cu starea procesului cirotic; valorile GOT sunt mai mari decât cele pentru GPT.

Valori ușor crescute ale GOT și GPT pot fi observate după **ingerarea de alcool** și după administrarea unor **medicamente** ca opiacee, salicilați, ampicilină, benzodiazepină, paracetamol, majoritatea neurolepticelor, etc.

Deși valorile serice ale ambelor enzime sunt mai ridicate de fiecare dată când este afectată integritatea celulei hepatice, GPT este o enzimă cu specificitate mai mare pentru ficat; valori ridicate ale GPT sunt rar observate în alte condiții decât afecțiunile hepatice.

După un infarct miocardic apare o creștere a activității GOT în ser. GOT și ocazional GPT au valori crescute în **distrofia musculară progresivă** și în **dermatomiozită**, atingând valori de până la 8 ori mai mari. **Embolia pulmonară** poate ridica nivelul GOT de două, până la trei ori față de normal, iar **pancreatita acută**, **gangrena**, **bolile hemolitice** de două până la cinci ori.