

### XVI.3. METABOLISMUL AMINOACIZILOR. EVIDENȚIEREA UNOR TULBURĂRI DE METABOLISM

În organismul sănătos principala sursă de aminoacizi pentru sinteza proteinelor endogene o constituie proteinele de aport alimentar. La nivelul tractului digestiv aceste proteine sunt hidrolizate enzimatic, iar aminoacizii (AA) rezultați trec în sânge, de unde vor fi preluați de ficat și alte țesuturi, fiind folosiți în principal pentru sinteza proteinelor endogene.

Catabolizarea AA are loc în special la nivelul ficatului și rinichiului prin reacția de transaminare cuplată cu reacții de dezaminare oxidativă, rezultând amoniac și  $\alpha$ -cetoacizi. Amoniacul este convertit în uree și eliminat urinar, în timp ce  $\alpha$ -cetoacizii sunt degradați în ciclul Krebs sau prin reacții specifice.

Concentrația plasmatică a AA variază diurn cu aproximativ 30%, fiind mai ridicată după masa de prânz. AA din sânge sunt filtrați prin membrana glomerulară, dar sunt apoi reabsorbiți în tubii renali printr-un mecanism de transport activ. Eliminarea crescută de AA în urina patologică și se numește *aminoacidurie*, aceasta putând fi *primară* sau *secundară*.

#### Aminoaciduria primară

Este dată de mutații ereditare la nivelul ADN ce codifică enzime implicate în căile de metabolizare ale AA sau în sistemul de reabsorbție renală a acestora. Aceste mutații conduc la enzime defecte, ce blochează căile normale de metabolizare ale propriilor substraturi, având loc o acumulare a substraturilor (aminoacizi) sau a intermediarilor de metabolizare. În unele cazuri, acest blocaj al căilor normale orientează AA pe alte căi de metabolizare, care produc compuși de degradare patologici.

Diagnosticul acestor boli metabolice se poate face la 3 nivele:

- a. evidențierea modificărilor ADN;
- b. evidențierea defectelor enzimatice;
- c. evidențierea tulburărilor metabolice produse.

În clinică, diagnosticul se bazează pe evidențierea tulburărilor metabolice. Simptomele și prognoza aminoaciduriilor primare pot varia de la forme benigne, ca alcaptonuria, la forme letale, ca boala urinii cu miros de sirop de arțar. Acumularea de cetoacizi în boala urinii cu miros de sirop de arțar, sau de fenilalanină în fenilcetonurie, sunt exemple de acumulare de precursori și intermediari cu efect toxic.

În tabelul 1 sunt redate principalele aminoacidurii primare.

**Tabel 1. Principalele aminoacidurii primare**

Aminoaciduria	Incidența	Enzima defectivă	Exces în sânge	Exces în urină	Simptome clinice	Tratament
Hiper-fenilalaninemia	1:10000	Phe hidroxilază	Phe	Phe și metaboliții (fenilpiruvic fenilacetic)	Retardare mintală, eczeme	Dietă restrictivă la Phe
Tirozinemie (Tirozinoze)	1:100000	Fumarilaceto-acetat hidrolază	Tir, Met	Tir și metaboliții	Ciroză hepatică, tulburări renale	Dietă restrictivă la Phe, Tir, Met
Alcaptonurie	1:250000	Homogentizat oxidază	Acid homogentizic	Acid homogentizic	Artrită degenerativă, pigmentare cartilaje	-
Homocistinuria	1:200000	Cistationin $\beta$ -sintetază	h-Cisteină, Met	h-Cisteină, Met	Tulburări oculare, vasculare, osoase	Piridoxină; Met scăzută, supliment de Cis
Cetoaciduria cu catenă ramificată (urină cu miros de sirop de arțar)	1:250000	Cetoacid ramificat dehidrogenază	Leu, Val, Ile	Leu, Ile, Val și cetoacizii corespunzători	Acidoză, vomă, blocaj respirator. Evoluție fatală	Dietă restrictivă Leu, Ile, Val

### Aminoacidurii secundare

Afectează simultan mai mulți AA și sunt date de afecțiunile unor organe active în metabolismul AA, cum ar fi ficatul sau rinichii. De asemenea apar și în înfometare avansată.

În identificarea și tratamentul aminoaciduriilor primare se utilizează:

- diagnosticul sugarului sau al copilului bolnav;
- testele de rutină la nou născut;
- diagnostic prenatal.

Diagnosticarea precoce a acestor afecțiuni este o condiție obligatorie a eficienței tratamentului. Aceste afecțiuni sunt suspectate când copilul sau sugarul vomită repetat, are tulburări neurologice sau hepatice și aceste tulburări se accentuează pe măsura creșterii aportului proteic.

Ca metode de investigație sunt folosite uzual teste calitative sau semicalitative de natură chimică sau microbiologică, care evidențiază AA individuali sau metaboliți intermediari specifici.

În centrele medicale specializate se utilizează metode cantitative pentru determinarea exactă a AA sau metabolitului necunoscut, metode ce folosesc tehnici moderne de spectrometrie de masă, spectrometrie în infraroșu, cromatografia de lichide de înaltă presiune (HPLC) etc.

### Aplicație practică

#### A. Evidențierea hiperfenilalaninемiei prin testul pentru acid fenilpiruvic în urină

**Hiperfenilalaninemіile** sunt un *grup de afecțiuni datorate alterării mecanismului de conversie al Phe la Tir*. În aceste condiții, **catabolizarea Phe are loc pe o cale metabolică secundară**, al cărei produs principal, **acidul fenilpiruvic, apare în cantități crescute în plasmă și urină, fenomen numit fenilketonurie**.

Identificarea precoce a bolii este esențială în evitarea retardării mintale. Tratamentul constă într-o dietă restrictivă la Phe, care să mențină concentrația plasmatică a Phe la nivelul de 3-8 mg%.

Testul pentru acidul fenilpiruvic în urină are rolul de a identifica afecțiunea și de a monitoriza dieta cu Phe.

#### Principiu

Acidul fenilpiruvic reacționează cu clorura ferică, formând un compus colorat albastru-verde închis, a cărui colorație persistă timp de 2-4 minute. O colorație tranzitorie asemănătoare este dată și de acidul homogentizic sau *p*-hidroxifenilpiruvic.

#### Reactivi

1. Soluție  $\text{FeCl}_3$ : se dizolvă 10 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  în apă și se completează la 100 ml cu apă distilată.
2. Agent precipitant pentru fosfat: se dizolvă 2,2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,4 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  și 2 ml  $\text{NH}_3$  25% în apă se completează la 100 ml soluție.
3. Acid clorhidric concentrat.

#### Mod de lucru

Se amestecă 4 ml urină cu 1 ml agent precipitant. Se filtrează, apoi filtratul se acidifică cu 2-3 picături acid clorhidric concentrat. Se agită, apoi se adaugă 2-3 picături soluție  $\text{FeCl}_3$ . Apariția unei colorații albastru-verde închis ce persistă 2-4 minute indică un

test pozitiv. Sensibilitatea metodei este de 10 mg/100ml. Prin folosirea diluției filtratului urinar se poate obține o metodă semicantitativă.

### **Interpretarea rezultatelor**

Acidul fenilpiruvic nu poate fi detectat în urina copiilor decât după 10-14 zile de la naștere, atunci când concentrația fenilalaninei în ser atinge 12-15 mg/100ml. La copiii suferind de fenilcetonurie, concentrația urinară a acidului fenilpiruvic atinge 50-100 mg/100ml, excretându-se 2 grame acid fenilpiruvic/g creatinină.

### **B. Testul pentru boala urinii cu miros de sirop de arțar**

Această afecțiune este legată de catabolizarea defectuoasă a aminoacizilor cu catenă ramificată: Leu, Ile, Val. Catabolizarea normală a acestora implică transaminarea AA la  $\alpha$ -cetoacizi, urmată de decarboxilarea oxidativă, rezultând derivați acil-CoA.

Defectul genetic al etapei de decarboxilare oxidativă produce acumularea în sânge și urină a acestor AA și a  $\alpha$ -cetoacizilor derivați. Copiii afectați par normali la naștere, dar rapid, odată cu aportul proteic, se instalează o cetoacidoză acută ce cauzează vomă, letargie, slăbiciune, comă, iar la supraviețuitori retardare mintală. Testele evidențiază în sânge un exces de AA ramificați, iar în urină cantități mari de cetoacizi derivați, care dau acesteia mirosul specific de sirop de arțar.

#### **Reactivi**

Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină 0,4 g/dl în HCl 1 mol/l (DNPH).

#### **Mod de lucru**

Se amestecă într-o eprubetă câte 2 ml urină filtrată cu 2 ml soluție DNPH. Se lasă în repaus 10 minute. Apariția unui precipitat galben de hidrazonă indică prezența excesului de  $\alpha$ -cetoacizi. Posibila interferență a acetonei se elimină prin fierberea urinii înaintea testării.

### **C. Determinarea cantitativă a acidului 5-hidroxiindolacetic (5-HIAA)**

5-HIAA se formează prin dezaminarea oxidativă a serotoninei (5-hidroxitriptamină 5HT), fiind produsul de excreție urinară al acesteia. Serotonina se formează din triptofan la nivelul celulelor argentafine ale tractului digestiv și hipotalamus și este o amină biogenă cu efecte vasoconstrictive în mușchiul neted și neurotransmițător în creier. Deoarece concentrația plasmatică a serotoninei este foarte mică, determinarea urinară a 5-HIAA continuă să fie cea mai folosită metodă de evaluare a metabolismului serotoninei.

#### **Principiu**

Testul se bazează pe formarea unui diazoderivat de culoare purpurie la amestecarea 5-HIAA cu 1-nitrozo-2-naftol și acid azotos.

#### **Reactivi**

1. Soluție 1-nitrozo-2-naftol 1% în alcool etilic 95%.
2. Soluție acid azotos. Se amestecă 0,20 ml azotit de sodiu 2,5% cu 5 ml acid sulfuric 2 N. Se prepară proaspăt.
3. Dicloroetan.
4. Standard 5-HIAA. 8 mg 5-HIAA se dizolvă și se aduc la 100 ml cu apă distilată.

#### **Mod de lucru**

În trei eprubete de centrifugă se pipetează:

Reactivi, ml	P	S	M
Urină	0,40	-	-
Standard	-	0,40	-
H <sub>2</sub> O distilată	1,60	1,60	2,00
$\alpha$ -nitrozo- $\beta$ -naftol	0,50	0,50	0,50
Soluție acid azotos	0,50	0,50	0,50
<b>Se amestecă și se lasă în repaus 10 minute</b>			
Dicloroetan	5,00	5,00	5,00

Se agită energic și cu atenție 15 secunde, apoi se centrifughează timp de 10 minute la 3000 rpm. Se transferă stratul superior în trei eprubete și se măsoară absorbțiile de radiație  $E_p$  și  $E_s$  față de martor la 540 nm, în cuve cu grosimea de strat de un centimetru.

#### Calcul

$$\text{mg 5-HIAA/1000 ml urină} = \frac{E_p}{E_s} \times 8$$

Rezultatul se raportează la volumul de urină colectat în 24 de ore.

#### Varianta fără standard

Se procedează în același fel, dar fără eprubeta de standard.

#### Calcul

$$\text{mg 5-HIAA/100 ml urină} = E_p \times F$$

unde F (factorul de pantă) = 32 (determinat dintr-o curbă de etalonare).

#### Valori normale

**2-9 mg 5-HIAA/24 ore.**

#### Patologie

Serotonina și implicit 5-HIAA sunt produse în exces în cazul tumorilor „carcinoide” ale celulelor argentafine, când cantitatea de 5-HIAA excretată urinar în 24 de ore ajunge la 100-220 mg.