

Cadre de predare: Anghel Andrei: biochim@umft.ro Grecu Daniela: grecu.daniela@umft.ro
 Sfrijan Felicia: sfrijan.felicia@umft.ro Samoila Corina: corisamoila@umft.ro
 Gurban Camelia: gurban.camelia@umft.ro Buzatu Ramona: buzatu.ramona@umft.ro
 Bonte Diana: bonte.diana@umft.ro Tamas Liviu: tamas.liviu@umft.ro
 Mihala Adrian: mihala.adrian@umft.ro Bujor Geta: bujor.cristiana@umft.ro
 Alexa Anda: alexa.anda@umft.ro Marcu Anca: marcu.anca@umft.ro
 Moatar Alexandra: moatar.alexandra@umft.ro Chis Aimee: chis.aimee@umft.ro
 Toate întrebările vor fi adresate cadrului de predare corespunzător fiecărei grupe la adresa de email furnizată.

CALEA (CICLUL) PENTOZOFOSFAȚILOR.TESTUL BREWER

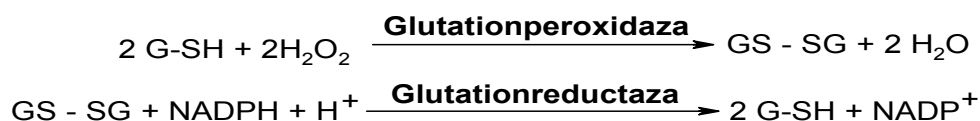
Introducere

Calea pentozofosfaților (CPF) este o cale neenergogenă de metabolizare a glucozei, cu localizare citoplasmatică, unde funcționează în paralel cu calea Embden-Meyerhof și cu care prezintă interferențe.

Rolul principal al căii este furnizarea de NADPH, H⁺, dar și de transformare a hexozelor în pentoze (riboză necesară sintezei acizilor nucleici), de interconversie între ozele cu 3, 4, 5, 6, 7 și 8 atomi de carbon.

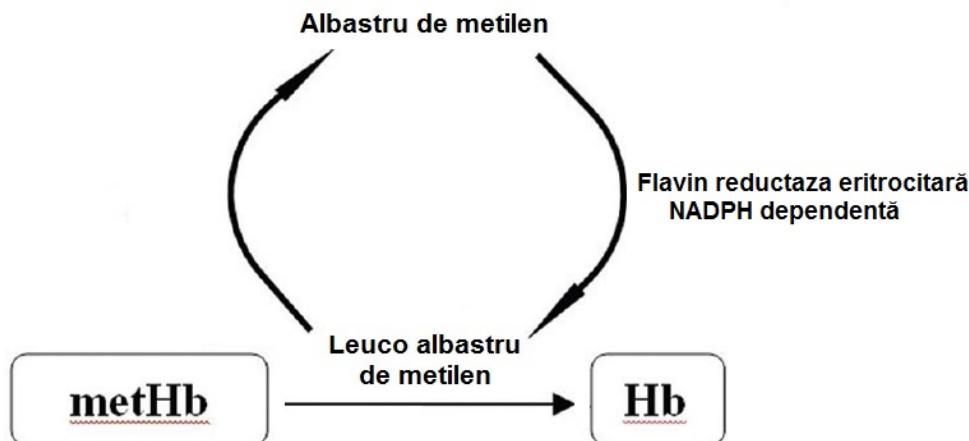
CPF este foarte activă în unele celule (hepatice, adipoase, ale glandelor suprarenale, sexuale, tiroidiene, mamare în perioada de lactație, eritrocite) și cu o activitate redusă în altele (celulele musculare striate).

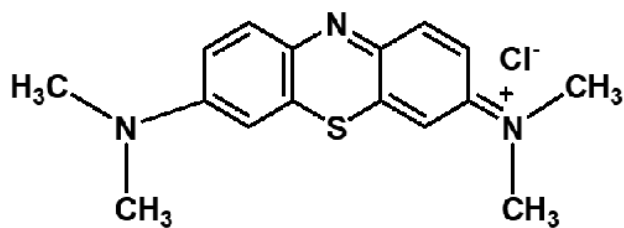
Pentru eritrocite, CPF joacă un rol deosebit de important în prevenirea acumulării apei oxigenate, cu acțiune oxidantă asupra hemoglobinei și a structurilor lipidice. În acest sens, se utilizează un mecanism axat pe glutatation, pentru reducerea căruia este necesar NADPH:



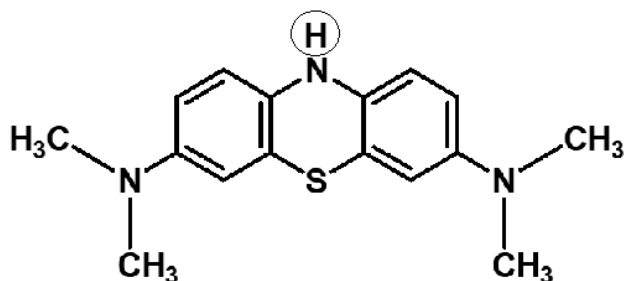
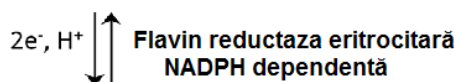
Sistemul care asigură reducerea permanentă a methemoglobinei la hemoglobină are la bază acțiunea a două enzime: NADH-methemoglobin reductaza (85%) și NADPH-methemoglobin reductaza (**flavin reductaza eritrocitară**) (15%).

În situații patologice, în care se acumulează methemoglobina (de exemplu în intoxicațiile cu nitriți), aceasta poate fi redusă la hemoglobină prin stimularea NADPH-methemoglobin reductazei (și deci a CPF) interpunând un sistem redox care să preia echivalenții reducători de la NADPH (redus) care poate participa astfel la o nouă dehidrogenare în cadrul CPF și să-i pună la dispoziția NADPH-methemoglobin reductazei. Un astfel de sistem redox este albastrul de metilen care, administrat intravenos în intoxicația cu nitriți, are acțiune terapeutică.

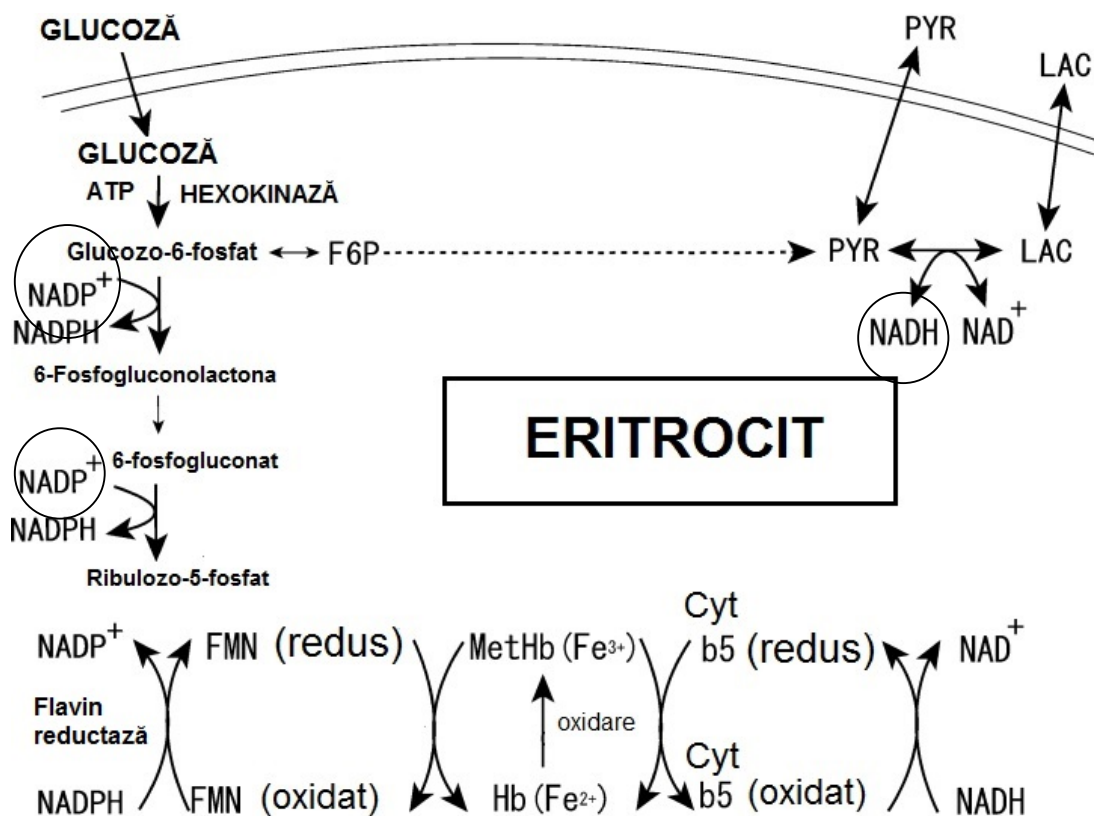




Albastru de metilen (albastru)



**Leuco albastru de metilen
(incolor)**



Testul Brewer

Principiu

Testul Brewer este o determinare in vitro prin care se poate verifica integritatea funcțională (enzimatică) a CPF. Hemoglobina eritocitară se oxidează cu azotit de sodiu la methemoglobină, proces reversibil în prezența albastrului de metilen și cu condiția integrității enzimatice a CPF. Existența unui defect enzimatic al CPF (în special de glucoză-6P-dehidrogenază) face ca transformarea hemoglobinei în methemoglobină să nu mai fie reversibilă datorită lipsei NADPH produs de CPF.

Reactivi

1. Soluție azotit de sodiu 0,18 M în glucoză 0,28 M;
2. Soluție albastru de metilen 0,0004 M în NaCl 0,9%.

Se dizolvă 149,5 mg albastru de metilen ($C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_2O$) în 100 ml apă distilată. Într-un balon cotat de 100 ml se introduc 10 ml din această soluție și se completează până la semn cu soluție NaCl 0,9%.

3. Heparină 50 UI pentru 1 ml sânge.

Modul de lucru

În trei eprubete potrivite notate 1, 2, 3 se introduc:

Reactivi/Eprubeta	1	2	3
Sânge heparinat	2,00 ml	2,00 ml	2,00 ml
Nitrit de sodiu	-	0,10ml	0,10 ml
Albastru de metilen	-	-	0,10 ml

Se omogenizează eprubetele. Se incubează 3 ore la 37°C.

Interpretare

Eprubeta 1: este eprubeta de referință pentru hemoglobină, culoare **roșie**.

Eprubeta 2: este eprubeta de referință pentru methemoglobină, culoare **brună**.

Eprubeta 3: este proba propriu-zisă, care poate fi:

- **Roșie** (similară cu E 1): situație normală, producția de NADPH + H^+ prezentă.
- **Brună** (similară cu E 2): situație patologică, producția de NADPH + H^+ alterată prin defect enzimatic al căii (la indivizii homozigoți).

Albastrul de metilen constituie un sistem redox oxidant al cuplului NADPH/NADP⁺ și reducător pentru reacția catalizată de hemoglobin reductază.

Semnificația medicală a deficienței glucoză-6P-dehidrogenazei

Mutațiile genetice ale genei glucoză-6P-dehidrogenază, care afectează consecutiv producția de NADPH, se întâlnesc la populațiile mediteraneene sau de origine afro-caraibiană. Gena este situată pe cromozomul X, are o transmitere X-linkată și afectează majoritar bărbații.

Există peste **400 de milioane de purtători** a unor mutații ale genei G6PDH, însă majoritatea sunt asimptomatici. În urma defectului genic, enzima rezultată determină anemie hemolitică atunci când indivizii sunt supuși la stres oxidativ, diverse infecții, medicamente (antimalarice, de ex. primaquina sau sulfonamide), sau atunci când în alimentație utilizează un anumit tip de fasole, *Vicia faba*, boala apărută fiind numită **favism** (mecanismul de producere al bolii nu este încă lămurit dar se presupune că doi compuși proveniți din boabele de fasole, izouramilul și divicina acționează asupra glutatationului, având un efect inhibitor asupra regenerării acestuia, ceea ce duce la *acumularea de H_2O_2* și de alți radicali liberi).

Variantele mutante ale genei sunt mai frecvente la populațiile afectate de malarie, ceea ce sugerează o creștere a rezistenței împotriva bolii printr-o enzimă deficitară (parazitul *Plasmodium falciparum* este foarte sensibil la stresul oxidativ, astfel că, în eritrocit, unde apare o variantă enzimatică cu activitate antioxidantă redusă, mediul devine toxic pentru parazit, dar nu și pentru celula gazdă).

Există două tipuri de defecte enzimatic rezultate în urma mutațiilor genice:

1. **Varianta mediteraneeană**, reprezentată de o *enzimă stabilă*, dar cu activitate redusă, care poate determina *crize hemolitice severe* ce pot fi fatale pacientului.
2. **Varianta afro-caraibiană**, reprezentată de o *enzimă instabilă*, care afectează în special hematiile bătrâne, astfel că pacientul prezintă *crize hemolitice mai ușoare*, auto-limitante.