

**FACULTATEA DE MEDICINĂ
NUTRIȚIE ȘI DIETETICĂ ANUL I
ȘEF LUCRĂRI DR. FELICIA SFRIJAN**
sfrijan.felicia@umft.ro

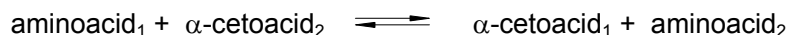
**BIOCHIMIE
LUCRAREA PRACTICĂ NR. 6**

**Diagnostic enzimatic în bolile hepatice. Determinarea
transaminazelor serice**

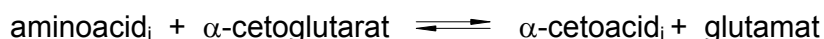
Introducere

În cadrul metabolismului substanțelor proteice, proteinele sunt catabolizate în prima etapă până la constituenții lor primari, aminoacizii. Aceștia sunt folosiți atât pe căi anabolice (sinteza de proteine, sinteza de baze purinice și pirimidinice, porfirine, amine biologic 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).

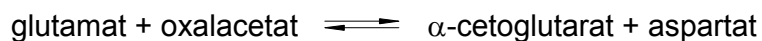
Transaminazele sau aminotransferazele sunt un grup de enzime tisulare, care au ca și grupare prostetică piridoxal-5-fosfatul și care **catalizează interconversia unui aminoacid într-un α -cetoacid prin transferul grupării aminice unui alt α -cetoacid:**



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



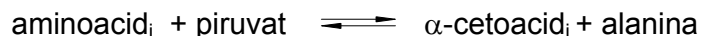
care la rândul său, într-o a doua reacție de transaminare, transferă gruparea amino oxalacetatului, reacție catalizată de glutamat-aspartat transaminaza:



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 α -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 *ciclu 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.

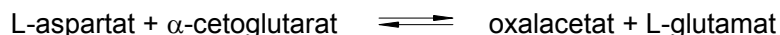
Amplitudinea creșterii concentrației transaminazelor în ser depinde de mai mulți factori:

- 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) pentru ASAT este 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 enzimice 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.

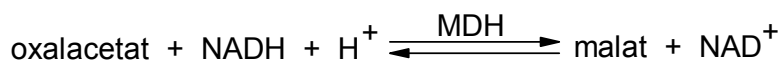
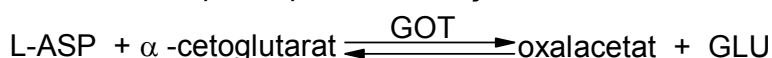
Aplicație practică

A. Determinarea transaminazelor serice prin metoda testului optic

Determinarea activității ASAT (GOT) serice - metoda cinetică enzimatică (test optic)

Principiu

Se utilizează testul optic cuplat cu o reacție indicatoare:



Se înregistrează scăderea absorbției la 340 nm, care este proporțională cu cantitatea de L-ASP (substrat) transformată și, deci, cu activitatea GOT.

Reactivi

1. Reactiv 1: tampon Tris, 100 mmol/l, pH = 7,8; L-Aspartat, 200 mmol/l; LDH, 800 U/l; - MDH (malat dehidrogenaza), 600 U/l;
2. Reactiv 2: NADH, 0,18 mmol/l; α - cetoglutarat, 12 mmol/l;

Pentru prepararea **reactivului de lucru** se dizolva conținutul unui flacon de R₂ cu volumul corespunzător de R₁. Se omogenizează și se lasă în repaus 15 minute. Reactivul de lucru este stabil o săptămână la 2-8°C.

3. Ser, plasmă.

Mod de lucru

În cuva spectrofotometrului se pipetează 1000 μ l reactiv de lucru și 100 μ l ser. Se omogenizează, se incubează 1 minut la temperatura camerei și apoi se citește absorbanța probei față de aer, la 340 nm, la 1, 2 și 3 minute. Se calculează $\Delta E/\text{minut}$.

Calculul activității enzimatic ASAT (U/L) = $\Delta E/\text{minut} \times 1746$.

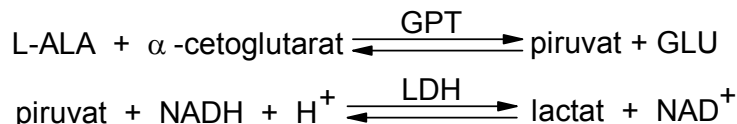
Valori normale:

- bărbați: 10 - 25 U/l;
- femei: 10 - 21 U/l.

B. Determinarea activității ALAT (GPT) serice - metoda cinetică enzimatică (test optic)

Principiu

Se utilizează testul optic cuplat cu reacție indicatoare.



Se înregistrează scăderea absorbției la 340 nm, aceasta fiind direct proporțională cu cantitatea de substrat transformată (L-Alanina) și, deci, cu activitatea ALAT.

Reactivi:

1. Reactiv 1: LDH, 1200 U/l; L-alanină, 500 mmol/l; Tampon Tris, 100 mmol/l, pH=7,8;
2. Reactiv 2: α -cetoglutarat, 15 mmol/l; NADH, 0,18 mmol/l;

Pentru prepararea **reactivului de lucru** se dizolvă conținutul unui flacon de R₂ cu volumul corespunzător de R₁. Se omogenizează și se lasă în repaus 15 minute. Reactivul de lucru este stabil o săptămână la 2-8°C;

3. Ser, plasmă.

Mod de lucru

În cuva spectrofotometrului se pipetează 1000 μ l reactiv de lucru și 100 μ l ser. Se omogenizează, se incubează 1 minut la temperatura camerei și apoi se citește absorbanța probei față de aer, la 340 nm, la 1, 2 și 3 minute. Se calculează $\Delta E/\text{minut}$.

Calculul activității enzimatică ALAT (U/L) = $\Delta E/\text{minut} \times 1750$.

Valori normale: - bărbați: 10 - 29 U/l;

- femei: 10 - 22 U/l.

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.