

Medicină Dentară
Anul I
Grupele 1-10
As.univ.Dr. Buzatu Alina Ramona

Pentru materialul de laborator, corespondența se realizează cu titularul de laborator, la adresa de email buzatu.ramona@umft.ro

Laboratorul 8

METABOLISMUL PROTEINELOR. DETERMINAREA TRANSAMINAZELOR SERICE.

1. Determinarea enzimelor în lichidele biologice

Determinarea activității enzimelor serice/plasmatice constituie una dintre cele mai solicitate investigații în laboratorul clinic. Aprecierea activității enzimatică are o deosebită importanță pentru diagnosticul, urmărirea evoluției, tratamentului și prognosticului bolilor. Pentru interpretarea corectă a rezultatelor obținute la determinările activității enzimatică este necesar să se cunoască locul de producere al enzimelor studiate, mecanismele prin care ele ajung în sânge, dar și modul și viteza cu care ele sunt eliminate din plasmă.

Prin determinările enzimatică poate fi apreciat sediul unor leziuni sau funcționalitatea unui organ.

După ce sunt eliminate în sânge, activitatea enzimelor începe să scadă. Cunoașterea intervalului în care enzimele încep să se modifice, în sensul scăderii lor, are o importanță deosebită pentru diagnostic, dar și pentru recoltarea probelor de sânge.

O importanță deosebită o are și cunoașterea căilor de eliminare a enzimelor. Acest fapt permite punerea unui diagnostic după un interval de timp mai larg de la debutul bolii și chiar aprecierea retrospectivă a debutului afecțiunii. Exemplu: α -amilaza este îndepărtată din sânge pe cale urinară (are greutate moleculară scăzută), deci după un anumit interval de timp de la debutul unei pancreatite acute, amilazuria poate fi un indicator de bază al acestei boli.

Cel mai frecvent activitatea enzimatică se exprima în **unități internaționale (UI)**.

$1 \text{ UI} = \text{cantitatea de enzimă ce transformă } 1 \mu\text{mol de substrat} / \text{minut la } 25^\circ\text{C, în condiții optime (concentrația substratului, pH, forța ionică a tamponului)}$. În determinările pe produse biologice (ser, urină) exprimarea se raportează la **un litru**.

În practica de laborator se utilizează două modalități de determinare a activității enzimatică:

Metodele în două puncte: un martor (cu enzima inactivată) și o probă cu enzima activă. După un timp fix de incubare se inactivează și enzima din probă și activitatea se apreciază prin diferența dintre probă și martor privind concentrația substratului sau a produsului de reacție. În acest mod de analiză nu se observă cinetica de transformare a substratului.

În metodele cinetice mersul reacției se urmărește continuu, vizual sau cu aparate înregistratoare. În plus, determinările cinetice sunt mai simple și mai rapide.

În metodele cinetice se stabilește absorbția la diferite intervale de timp și se calculează variația ei pe minut. Apoi se folosește formula:

$$UI = \frac{\Delta E / \min}{\epsilon \cdot d} \cdot 10^6 \cdot \frac{V_F}{V_A} \quad \mu\text{moli} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$$

$\Delta E / \min$ = variația absorbției probei pe minut;

V_A = volumul materialului de analizat, în ml;

V_F = volumul final, în ml;

d = grosimea cuvelor, în cm;

ϵ = coeficientul molar de absorbție al substratului sau al produsului

2. Transaminazele. GPT (ALAT) și GOT (ASAT).

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 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 α -cetoacid prin transferul grupării aminice unui alt α -cetoacid:

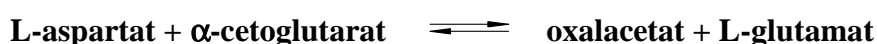


Transaminazele prezente în sânge sunt de proveniență exclusiv intracelulară și prezintă o concentrație în ser de mii și zeci de mii de ori mai mică decât în celule. **Concentrația lor serică crește în cazul producerii unei alterări a membranei celulare, care permite trecerea lor în lichidul interstițial,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

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 enzimatice 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:

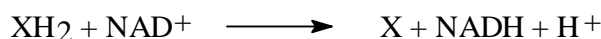


În citoplasma și mitocondriile celulelor se găsesc izoenzime transaminazice diferite. GOT este biloculară, cu localizare atât în mitocondrie cât și în citoplasmă, în timp ce GPT este prezentă doar în citoplasmă. De exemplu, în condițiile unei injurii blânde a țesutului hepatic, izoenzima ce apare în 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.

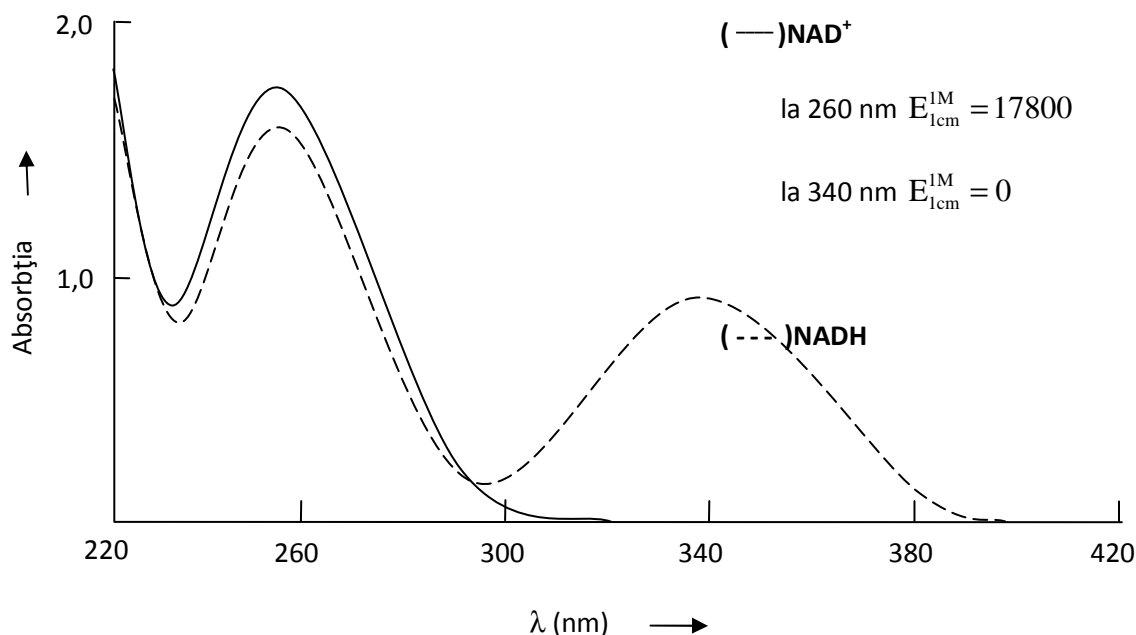
Determinarea activității transaminazelor serice se efectuează cu o metoda cinetică numită testul optic.

3. Testul optic

Este aplicabil în cazul enzimelor care au **cofactor un derivat de niacină, NAD(P)⁺ sau NAD(P)H**. În principiu se măsoară direct oxidarea NAD(P)H sau reducerea NAD(P)⁺:



Acest lucru este posibil deoarece în spectrul de absorbție al celor două forme, redusă și oxidată, există o diferență: *NADH absoarbe puternic la 340 nm* pe când *NAD⁺ absoarbe foarte puțin*.



Spectrul de absorbție al NAD⁺ și NADH

De obicei se lucrează la **340 nm**.

Astfel, prin test optic se înțelege determinarea în UV a activității enzimelor NAD⁺ și NADP⁺ dependente.

Se practică trei variante de utilizare a testului optic, prin aceasta existând posibilitatea determinării aproape a tuturor enzimelor cu semnificație în laboratorul clinic.

a. Testul optic simplu - dacă enzima pe care o determinăm necesită prezența de NAD⁺ sau NADH, reacția se efectuează între substrat, enzimă (prezentă în ser), coenzimă și se urmărește variația absorbției pe un interval de timp stabilit.

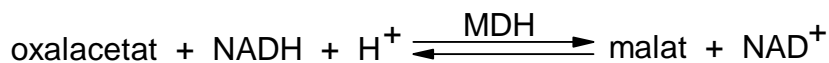
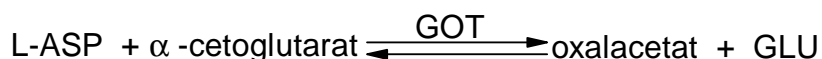
b. Testul optic cuplat cu o reacție indicatoare - anumite enzime nu implică direct coenzima NAD(P)⁺, totuși se pot determina pe baza principiului testului optic cuplat cu o **reacție indicatoare specifică**. Enzima de determinat catalizează formarea unui produs, iar acesta urmează să fie determinat prin intermediul unei alte enzime NAD⁺-dependente.

c. Testul optic cuplat cu o reacție auxiliară și o reacție indicatoare - în cazul în care produsul final al reacției enzimatice nu poate fi măsurat direct printr-o reacție indicatoare, este necesar să se intercaleze o reacție auxiliară, catalizată de un alt sistem enzimatic.

4. Partea experimentală

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

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

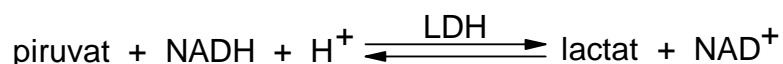
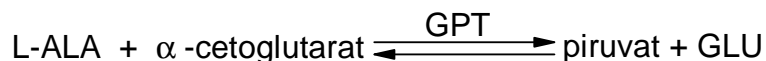
În cuva spectrofotometrului se pipetează 1000 μ l reactiv de lucru și 100 μ l ser. Se omogenizează, se incubează 1 minut la temperatura camerei și apoi se citește absorbția probei față de aer, la 340 nm, la 1, 2 și 3 minute. Se calculează $\Delta E/\text{minut}$.

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

Valori normale: - bărbați: 10 - 25 UI/L;
 - femei: 10 - 21 UI/L.

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

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 µl reactiv de lucru și 100 µl ser. Se omogenizează, se incubează 1 minut la temperatura camerei și apoi se citește absorbanta probei față de aer, la 340 nm, la 1, 2 și 3 minute. Se calculează ΔE/minut.

Calculul activității enzimatice ALAT (U/L) = ΔE/minut x 1750.

Valori normale: - bărbați: 10 - 29 UI/L;
- femei: 10 - 22 UI/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 neurolepticilor, 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 are valori crescute și 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.