

Medicină Dentară
Anul I
Grupele 1-10
As.univ.Dr. Buzatu Alina Ramona
buzatu.ramona@umft.ro

Pentru materialul de laborator, corespondenta se realizeaza cu titularul de laborator, la adresa de corespondenta de mai sus.

Laboratorul 4

METABOLISMUL GLUCIDIC. DETERMINAREA ACIDULUI LACTIC ȘI PIRUVIC ÎN LICHIDELE BIOLOGICE. CALEA PENTOZO FOSFAȚILOR. TESTUL BREWER. DETERMINAREA GLUCOZO-6-FOSFAT DEHIDROGENAZEI.

I. Glicoliza anaerobă. Acidul lactic și piruvic.

Glucoza este principalul substrat energogen din organism. În acest scop, glucoza este oxidată într-un șir de reacții enzimatice, în calea metabolică numită glicoliză.

Procesul poate avea loc în absența sau în prezența oxigenului. Glicoliza aerobă este oxidarea completă a glucozei în prezența oxigenului care implică transformarea glucozei în piruvat, în citoplasmă, urmată de etapele metabolismului energetic mitocondrial. Glicoliza anaerobă, când sunt disponibile cantități limitate de oxigen, este calea metabolică de transformare a glucozei în acid lactic.

Ambele tipuri de glicoliză au un mecanism identic, transformarea glucozei în piruvat, formată dintr-o serie de reacții enzimatice anaerobe oxidative ce se desfășoară în citoplasmă, cunoscută sub numele de calea Embden-Meyerhof. În condiții anaerobe, piruvatul este redus la lactat sub acțiunea lactat dehidrogenazei NADH dependentă.

LDH este o enzimă prezentă în majoritatea țesuturilor, în special la nivelul inimii, plămânilor, rinichilor, ficatului, mușchilor scheletici și creierului. Acidul lactic este produs în unele țesuturi chiar și în prezența oxigenului (eritrocite și cartilaj). Alte țesuturi, precum țesutul muscular produc cantități mari de acid lactic numai în condiții anaerobe (activitate musculară intensă). În mod normal acidul lactic are o concentrație în plasmă de aproximativ 9 mg%.

Glicoliza anaerobă este:

- Mecanism temporar în mușchi în efort fizic intens.
- Mecanism unic în eritrocite (nu au mitocondrie) și în celulele cu oxigenare redusă.
- Mecanism parțial în țesuturile cu creștere rapidă, embrionar și tumoral.

Lactatul format în glicoliza anaerobă va fi:

- a) oxidat înapoi la piruvat de către celulele musculare bine oxigenate, miocard, neuroni, iar piruvatul va trece în membrana mitocondrială unde au loc etapele metabolismului energetic (Acetil-CoA, ciclul Krebs și lanțul respirator).
- b) transformat la glucoză prin gluconeogeneză în ficat, care ajunge înapoi în circulație și prin glicoliza anaerobă în celula musculară înapoi la lactat (ciclul Cori);

Valorile normale ale acidului piruvic în sânge sunt: 0.08 - 0.16 mmol/L (0.7 - 1.4 mg/dL).

Variații fiziologice ale acid piruvic: creșterea acidului piruvic se poate produce după exerciții fizice intense.

Variații patologice:

Scăderi: nu sunt semnificative pentru stabilirea unui diagnostic.

Creșteri ale acid piruvic: deficit de vitamina B1, consum cronic de alcool, ciroza hepatică, uremie, intoxicații cu metale grele (arseniu, antimon. aur, mercur), insuficiența cardiacă, distrofie musculară, cancer, diabet zaharat.

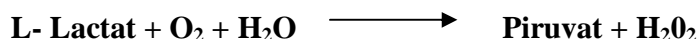
- afecțiuni în care *raportul acid lactic/acid piruvic este constant*: perfuzii masive de glucoză, administrare masivă pe linie venoasă de insulină, în glicogenozele hepatice cu deficit de glucoză-6-fosfatază, alcaloza prin hiperventilație pulmonară.

- afecțiuni în care *raportul acid lactic/acid piruvic este crescut, mai mare de 20/1*: epilepsii, convulsii, șocul infecțios, cardiogen, postoperator, infarct miocardic, intoxicații medicamentoase cu antihistaminice, neoplasme.

I.1. Determinarea acidului lactic prin metoda enzimatică în ser/plasmă

Acidul lactic este oxidat de către lactatoxidaza (LO), reacție în care se formează acid piruvic și peroxid de hidrogen (apa oxigenată). Peroxidul de hidrogen în prezența 4-aminoantipirinei și acidului tribrom-3-hidroxibenzoic (TBHB) se transformă sub influența peroxidazei (POD) într-un produs colorat în ROSU (chinonimina), a cărui absorbție de radiație se măsoară la $\lambda=546$ nm (intensitatea culorii este direct proporțională cu concentrația de acid lactic).

LO



POD



Reactivi:

1. Reactiv de lucru: Buffer TRIS pH 7,5 (150 mmol/L); 4- aminoantipirina 0,3mmol/L; lactat oxidaza (>0,3 kU/L); peroxidaza (>1,0 kU/L); TBHB 2,5 mmol/L
2. Standard de ac. lactic = 30mg/dL;
3. Apa bidistilată; ser/plasma

Tehnica de lucru:

În 3 eprubete se pipetează următoarele:

Reactivi (μL)	Proba	Standard	Martor
Reactiv de lucru	1000	1000	1000
Ser	100	-	-

Standard	-	100	-
Apa bidistilata	-	-	100

- Se incubeaza **10 min la temperatura laboratorului**
- Se citesc extincțiile probei (E_P) si standardului (E_S) față de martor la $\lambda=546 \text{ nm}$ (stabilitatea culorii este de 30 min);

$$\text{Conc. Ac. Lactic (mg/dL)} = E_P / E_S \times 30$$

Valori normale în ser/plasma = 4.5 - 20 mg/dL

Semnificații medicale:

- **Fiziologice:** creșteri la nou născut, după activitate musculară intensă, emoții puternice, în ultimul trimestru de sarcină, etc.
- **Patologice:**
 - **Hiperlactacideemiile:**
 - epilepsii, convulsii, șocul infecțios, cardiogen, postoperator, infarct miocardic, intoxicații medicamentoase cu antihistaminice, neopasme.
 - **hipolactacidemii:** insuficiența renală cronică.

I. 2. Determinarea acidului lactic prin metoda ASTRUP în urgențele medicale

METODA ASTRUP măsoară statusul O_2 și CO_2 în sângele arterial și venos.

Lactat = 0.56 - 1.39 mmol/L (prin tehnica ASTRUP lactatul se determină prin metoda enzimatică cu LDH).

Aportul celular inadecvat de oxigen determină producerea unei cantități excesive de lactat.

În situații critice, hipoxia celulară deplasează metabolismul aerob către cel anaerob, fapt ce duce la creșterea sintezei de lactat. Determinarea lactatului indică echilibrul între cererea și aportul de oxigen la nivel tisular. Lactatul monitorizează oxigenarea adecvată a țesuturilor (evaluează statusul oxigenului arterial).

Nivelul ridicat de lactat în sânge este datorat hipoperfuziei, deteriorării severe a aportului de oxigen sau efectului cumulat al celor două. Creșterea lactatului constituie un semnal de alarmă pentru medic. Monitorizarea lactatului în sânge oferă informații despre corectitudinea tratamentului aplicat pacientului în stare critică.

II. Calea pentofo-fosfaților. Testul Brewer. Glucozo-6-P-dehidrogenaza.

Calea pentofofosfaților (CPF) este o cale neenergogenă de degradare 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, de interconversiune 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 glutation, 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 (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 (reduc) 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.

Enzima cheie a căii pentozo fosfaților este **glucozo-6-P-dehidrogenaza**. 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 glutationului, având un efect inhibitor asupra regenerării acestuia, ceea ce duce la acumularea de H₂O₂ 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 enzimatice 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.

Testul Brewer

Testul Brewer este un test de reducere a methemoglobinei in vitro, în condițiile integrității enzimatice 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.

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	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.