

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 10

INVESTIGAȚII HORMONALE. PRINCIPIUL IMUNOCOMPETIȚIEI. DETERMINĂRI HORMONALE CU IMPLICAȚII ÎN STOMATOLOGIE. DETERMINAREA PARATHORMONULUI.

1. Investigații hormonale

Un hormon este un compus chimic eliberat de una sau mai multe celule care reglează activitatea altor celule. Este în esență un mesager chimic care transmite un semnal de la o celulă la alta. Hormonii tind să coordoneze diferite procese metabolice din organism. Toate organismele multicelulare produc hormoni; hormonii vegetali se mai numesc fitohormoni. Hormonii sunt transportați în sânge. În sânge, hormonul se leagă de proteina transportoare plasmatică specifică, formând un complex, care este apoi transportat în plasmă către celulele țintă.

Celulele prezintă receptori specifici pentru hormoni. Hormonul se leagă de receptor și activează un mecanism de transducție al semnalului care duce în cele din urmă la răspunsuri specifice tipului de celule. Reglarea secreției unor hormoni din glandele endocrine este controlată printr-un mecanism de „feedback negativ”: hormonul eliberat dintr-o glandă reglează eliberarea unui alt hormon dintr-o a doua glandă, care apoi controlează producția de hormoni din glanda endocrină (axa de reglare hipotalamus-hipofiză-glandă endocrină). Nivelul plasmatic al hormonului sau al unei substanțe produse de țesutul țintă ca răspuns la hormon poate inhiba eliberarea ulterioară a hormonului.

Există trei clase de hormoni în funcție de locul de sinteză și de locul de acțiune:

- Hormoni autocrini: cei care acționează asupra acelorași celule care îi sintetizează;
- Hormoni paracrini: cei care sunt sintetizați foarte aproape de locul lor de acțiune
- Hormoni endocrini: cei care sunt sintetizați de glandele endocrine și transportați în sânge către celulele țintă care conțin receptori.

Există patru clase de hormoni bazate pe structura chimică:

- Peptide sau hormoni proteici: ex. hormon care eliberează tirotropină (TRH), insulină, gonadotropine hipofizare;
- Derivați de aminoacizi: ex. adrenalina, catecolamine, hormoni tiroidieni;
- Derivați ai acizilor grași: ex. eicosanoide (prostaglandine);
- Hormoni steroizi: aceștia sunt derivați ai colesterolului; ex. estradiol, testosteron, cortizol, aldosteron;

Investigarea funcției unei glande endocrine urmărește prezența simptomelor clinice de hiper sau hipofuncție a glandei endocrine.

Pentru evaluarea funcției endocrine, sunt necesare următoarele măsurători fie ca atare, fie în asocieri:

- concentrația plasmatică a hormonului
- excreția urinară fie a hormonului, fie a produșilor de catabolism
- dinamica secreției hormonului
- rezerva hormonală și reglarea hormonală prin teste dinamice

- nivelul receptorilor hormonal
- efectele selective ale hormonului asupra țesuturilor țintă

Cele trei tehnici majore utilizate pentru măsurătorile endocrine sunt următoarele:

• **Testele imunologice** bazate pe complexul imun antigen-anticorp, dintre care există două subcategorii:

- imunocompetiție
- tip sandwich
- Analize cromatografice
- Spectrometrie de masă

2. Principiul metodei de imunocompetiție

Imunodeterminările sunt metode analitice cantitative bazate pe reacția dintre un antigen (Ag) și anticorpul specific (Ab), caracterizate printr-o sensibilitate și specificitate ridicate.

Imunodeterminările pot fi clasificate în două tipuri: bazate pe competiția imună și cu două situsuri. Ambele metode folosesc un marker. Markerul poate fi: un atom, un ion sau o moleculă, care este legat fie de Ab fie de Ag și care are proprietatea de a da un semnal care poate fi măsurat cantitativ. Markerii folosiți sunt de 3 tipuri: radioactiv, enzimatic sau luminiscent.

Competiția imună reprezintă competiția care apare între un antigen (Ag) și un antigen marcat (Ag *) pentru legarea de anticorp (Ab), formând un complex imun (Ag-Ab și Ag * - Ab) .

După stabilirea echilibrului în reacția imună, se folosește o metodă pentru a separa fracția nereacționată de Ag și Ag * de fracția legată în complexe imune. Apoi, se măsoară semnalele emise.

Utilizând standarde de Ag, se construiește o curbă de calibrare. Concentrația de Ag într-o probă biologică poate fi determinată folosind această curbă de calibrare.

3. Determinări hormonale în stomatologie

Manifestările orale mai frecvente la pacienții cu tulburări endocrine sunt:

- în hipertiroidism: erupție dentară accelerată, osteoporoză, mărirea țesutului tiroidian extraglandular, carii și boli parodontale.
- În hipotiroidism: hipoplazia smalțului, macroglosie.
- în hiperparatiroidism: tumoră brună, pierderea densității osoase, calcifierea țesuturilor moi și anomalii dentare.
- în hipoparatiroidism: anomalii dentare, întârzierea sau încetarea creșterii și dezvoltării dentare, parestezii ale limbii sau buzelor și alterarea mușchilor faciali.
- Glandele suprarenale: în boala Addison: pete negre-albastrii în mucoasa bucală.

Hormonii investigați sunt: hormonii tiroidieni, parathormonul (PTH), cortizolul, testosteronul, estradiolul, progesteronul, dehidroepiandrosteronul (DHEA), hormonul luteinizant.

4. Hormonul paratiroidian

Hormonul paratiroidian (PTH) este secretat de **celulele glandelor paratiroide** sub forma **unui polipeptid care conține 84 de aminoacizi**. PTH stimulează resorbția intestinală a calciului, acționând în strânsă corelație cu vitamina D; scade eliminările urinare de calciu, stimulând eliminările de fosfați și potasiu, prin scăderea reabsorbției lor tubulare.

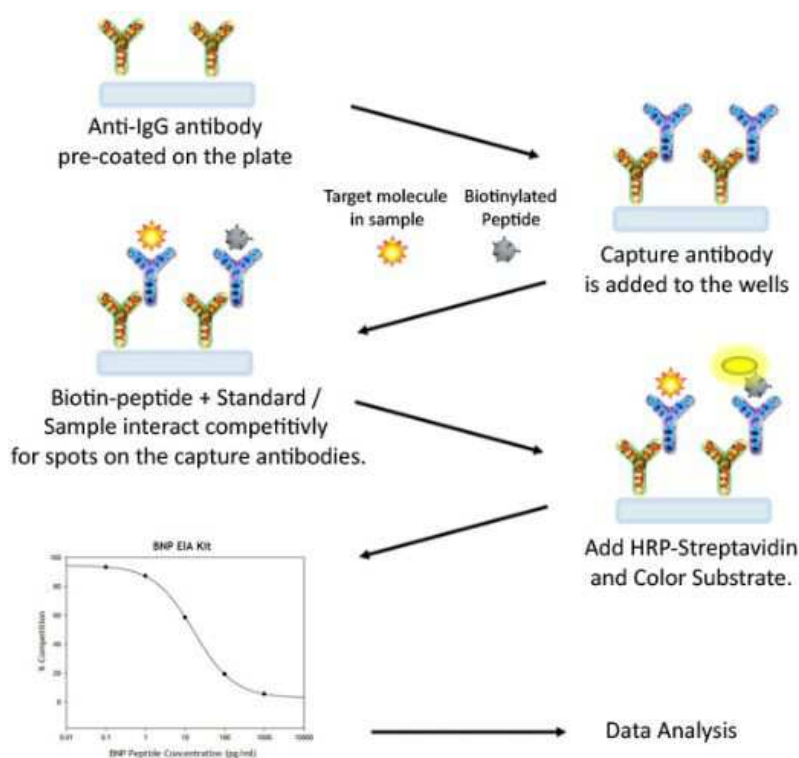
La nivelul oaselor, PTH mobilizează sărurile fosfocalcice, prin creșterea numărului și stimularea activității osteoclastelor. Urmarea acestor efecte sunt **creșterea calcemiei și scăderea fosfatemiei**. PTH **crește** activitatea enzimei, care transformă 25-hidroxicolecalciferolul în 1,25-dihidroxicolecalciferol, **forma activă a vitaminei D**.

PTH are aplicații clinice semnificative. Un nivel ridicat de PTH în sânge este cunoscut sub numele de hiperparatiroidism. Cauzele hiperparatiroidismului primar sunt adenomul paratiroidian, hiperplazia paratiroidiană și cancerul paratiroidian. Cauza hiperparatiroidismului secundar este adesea datorată insuficienței renale cronice.

Secreția parathormonului este determinată de concentrația serică de calciu prin feedback negativ. Celulele paratiroidiei prezintă receptori pentru calciu pe suprafață. PTH este secretat atunci când concentrația de Ca^{2+} este scăzută, iar calcitonina este secretată atunci când nivelurile de calciu serice sunt crescute.

Aplicația practică

Kitul RayBio PTH (ELISA) este un test cantitativ, in vitro, pentru determinarea PTH, bazat pe principiul imunocompetiției cu marker enzimatic. Un anticorp monoclonal specific anti-PTH a fost depus pe godeurile plăcii ELISA. O reacție de competiție imuna apare între PTH marcat cu biotină și PTH nemarcat (din standarde sau probe) pentru anticorpul specific anti-PTH. După incubare, conjugatul nelegat este spălat. Apoi, se adaugă streptavidina conjugată cu peroxidază de hrean (HRP) la fiecare godeu și se incubează. Streptavidina este o proteina cu afinitate mare de legare pentru biotina. Astfel, cantitatea de conjugat HRP legat este invers proporțională cu concentrația de PTH endogen (nemarkat cu biotina) din probă. Apoi se adaugă soluția de substrat TMB (tetrametilbenzidina) asupra careia acționează peroxidaza de hrean HRP formând un produs colorat. Intensitatea culorii formate este invers proporțională cu concentrația de PTH endogen din probă și direct proporțională cu cantitatea de PTH marcat cu biotina. Concentrația de PTH din probe se determină folosind o curbă de etalonare.



Reactivi:

1. ELISA Microplate
2. Soluție tampon de spălare
3. Standard de peptidă PTH
4. Anticorpi anti-PTH policlonali
5. Soluție de diluție A
6. Soluție de diluție B

7. Peptidă biotinilată PTH
8. Enzimă HRP-Streptavidină
9. Control pozitiv
10. Substrat TMB
11. Soluție stop

Materiale:

1. Cititorul de microplăci care măsoară absorbanta la 450 nm
2. Micropipetă cu precizie de 2 µl până la 1 ml
3. Pipete de 1-25 ml pentru prepararea reactivilor
4. Cilindru gradat de 100 ml și 1 litru
5. Hârtie de filtru
6. Apă distilată
7. SigmaPlot software
8. Eprubete
9. Agitator Orbital
10. Folie de aluminiu

Mod de lucru:

1. Reactivii se țin în gheață în timpul etapelor de pregătire. Se recomandă ca toate standardele și probele să fie rulate cel puțin în duplicat.
2. Se adaugă 100 µl de anticorpi anti-PTH la fiecare godeu. Se incubează timp de 1,5 ore la temperatura camerei cu agitare blândă (1-2 cicluri / sec). De asemenea, se poate incuba peste noapte la 4 ° C.
3. Se spală godeurile de 4 ori cu soluție tampon de spălare (200-300 µl fiecare).
4. Se adaugă 100 µl din fiecare standard, control pozitiv și probă la godeurile corespunzătoare. Se acoperă godeurile și se incubează timp de 2,5 ore la temperatura camerei cu agitare ușoară (1-2 cicluri / sec) peste noapte sau la 4°C.
5. Se spală de 4 ori.
6. Se adaugă 100 µl soluție preparată de HRP-Streptavidină la fiecare godeu. Se incubează timp de 45 de minute la temperatura camerei cu agitări blânde. Se recomandă ca timpul de incubație să nu fie mai scurt sau mai lung de 45 de minute.
7. Se spală de 4 ori.
8. Se adaugă 100 µl de substrat TMB la fiecare godeu. Se incubează timp de 30 de minute la temperatura camerei la întuneric, cu agitare blândă (1-2 cicluri / sec).
9. Se adaugă 50 µl de soluție de oprire la fiecare godeu. Se măsoară absorbanta la 450 nm.

Valori normale:

10-65 pg/mL

Hiperparatiroidismul se caracterizează prin hipersecreția hormonului paratiroidian, cauzată de:

- o tumoare sau hiperplazie a glandei care produce excesiv PTH, este caracterizată de demineralizări osoase dure, cu deformări și fracturi, creșteri ale calcemiei și depuneri fosfocalcice în țesuturile moi sau formare de calculi renali.

- sindrom de malabsorbție intestinală sau insuficiență renală cronică, ceea ce duce la o scădere a producției de vitamina D sau hipocalcemie care determină o cantitate mare de PTH.

În cavitatea bucală, cele mai frecvente manifestări clinice ale HPT sunt pierderea densității osoase, malocluzii, calcifieri ale țesuturilor moi și anomalii dentare, cum ar fi defecte de dezvoltare.

Hipoparatiroidismul este o tulburare metabolică caracterizată prin hipocalcemie și hipofosfatemie datorată unei deficiențe sau absenței secreției de hormoni paratiroidieni. Hipoparatiroidismul poate provoca hipocalcemie cu parestezii, tetanie și convulsii. Poate apărea o întârziere sau încetarea creșterii și dezvoltării dentare, candidoza cronică a mucoasei bucale și a unghiilor, parestezia limbii sau a buzelor. Această patologie este diagnosticată pe baza nivelului seric de calciu și al parathormonului. Principalele tratamente disponibile sunt vitamina D sau analogii săi, sărurile de calciu și medicamentele care cresc reabsorbția tubulară renală a calciului, pentru a obține un nivel normal de calciu seric.