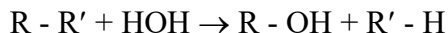


Laborator 10 Medicină

Diagnostic enzimatic IV: hidrolaze cu valoare diagnostică.

Determinarea activității amilazei. Izoenzime. Determinarea activității fosfatazelor.

Hidrolazele sunt enzime ce catalizează scindarea diferitelor substraturi cu fixarea componentelor apei la nivelul punctului de scindare hidrolitică conform ecuației:



Sunt mai multe subclase, în funcție de natura substratului transformat: esteraze, glicozidaze, peptidaze, fosfataze, tiolaze, fosfolipaze, lipaze, ribonucleaze etc.

Determinarea activității fosfatazelor alcaline și acide

Fosfatazele sunt monoesteraze care scindează hidrolitic esterii fosforici. Se deosebesc fosfataze specifice și nespecifice. Fosfatazele specifice hidrolizează anumiți esterii fosforici (ex: ATP-aza), iar cele nespecifice hidrolizează esterii fosforici variați, naturali sau de sinteză.

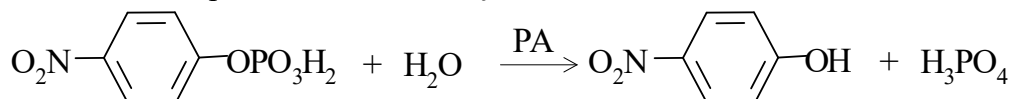
Fosfatazele diferă și în funcție de pH-ul de acțiune. Fosfatazele alcaline acționează la pH = 8,5-10 și sunt reprezentate în osteoblaste (fosfatază alcalină osoasă), ficat, intestin, rinichi, placentă. Cele mai importante izoenzime sunt cea osoasă și hepatică.

Fosfatazele acide acționează la pH = 4,5-5. Sunt conținute în cantități mari în prostată și, mult mai mici, în eritrocite, ficat, oase.

Fosfataza acidă prostatică este cea mai importantă. Este inhibată în mod selectiv de L-tartrat și este o enzimă cu valoare diagnostică în carcinomul de prostată.

Metoda cu p-nitrofenilfosfat pentru determinarea activității fosfatazei alcaline

Principiu: Fosfataza alcalină serică hidrolizează p-nitrofenilfosfatul la acid fosforic și p-nitrofenol. În mediu alcalin, p-nitrofenolul este intens colorat în galben și are maxim de absorbție la $\lambda = 405$ nm. Activitatea enzimei este proporțională cu intensitatea culorii p-nitrofenolului. Poate fi folosită atât ca metodă cu timp fix de incubare cât și ca metodă cinetică.



Reactivi:

1. R1 – Tampon: 2-amino-3-metil-1-propanol 0,35 mol/l, sulfat de magneziu 2 mmol/l, sulfat de zinc 1mmol/l, HEDTA 2 mmol/l.
2. R2 – substrat: p-nitrofenilfosfat 16 mmol/l.

Mod de lucru:

Reactivi	Probă
Ser	0,04
Reactiv de lucru	2

Se agită eprubetele și se introduc în baia de apă. După 1 minut se citește absorbția A_{1P} la 405 nm. Se reintroduc eprubetele în baie și se mai mențin încă trei minute, citindu-se din minut în minut A_{2P} .

Calcul:

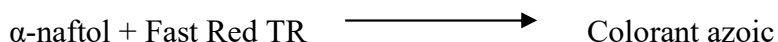
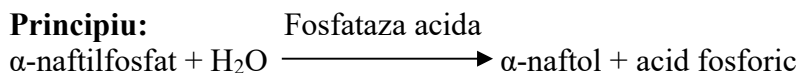
$$[U/l] = F \times \Delta A / \text{min}, \text{ unde } F \text{ este } 2757$$

Valori normale: femei 42 – 98 U/l

bărbați 53 – 128 U/l la 37°C

Valori crescute se înregistrează în: icter mecanic, hepatită colestatică, ciroze și tumori hepatice, metastaze osoase.

Metoda cinetică de determinare a activității fosfatazei acide



Reactivi:

1. R1 – Tampon citrat pH 5, 150mmol/l
2. R2 – substrat: α -naftilfosfat 10 mmol/l, Fast Red TR 6 mmol/l.
3. R3 – tartrat de sodiu 2 mmol/l.

Reactivul de lucru se prepară prin dizolvarea unei tablete într-o eprubetă ce conține 2 ml tampon R1. Reactivul de lucru este stabil 2 zile la 2 – 6 °C sau 6 ore la 15 – 25°C.

Mod de lucru:

Reactivi	Totală	Neprostatică
Reactiv de lucru	2	2
R3	-	0,02
Ser	0,2	0,2

Se agită eprubetele și se introduc în baia de apă la 37°C. După 5 minute se citește A₁. Se reintroduce eprubeta în baia de apă și se menține încă trei minute, citindu-se la interval de 1 minut A₂.

Calcul:

$$[U/l] = \Delta A / \text{min} \times 750$$

Valori normale: bărbați <5,4U/l;

femei < 4,2U/l;

fosfataza acidă prostatică (ACP) <1,7U/l;

ACP = fosfataza acidă totală – fosfataza acidă non prostatică

Este o enzimă cu valoare diagnostică în carcinomul de prostată

Determinarea activității amilazei

Amilazele sunt glicozidaze care catalizează scindarea legăturilor α -1,4-glicozidice din amidon formând dextrine (amilodextrine, eritrodextrine, acrodextrine) până la maltoză. Există mai multe tipuri de amilaze, în funcție de poziția legăturii glicozidice hidrolizate:

- endoamilaze (α - amilaza)
- exoamilaze (β - amilaza)

α - amilaza se găsește pancreasul animalelor superioare, salivă, în cantitate mai mică în ser, urină, ficat, mușchi. Trecerea enzimei din pancreas și glandele salivare în umori face posibilă determinarea activității amilazei în serul sanguin.

Pentru determinarea activității amilazei se folosesc diferite metode:

- a) metode colorimetrice cu amidon ca substrat (Richterich) sau cu substraturi sintetice;
- b) metode spectrofotometrice bazate pe variația absorbției la 340 nm prin cuplarea reacției catalizate de amilază cu reacții în care intervin enzime NAD – dependente.

Unele dintre acestea sunt metode cu timp fix de incubare (Richterich), altele fiind metode cinetice.

Metoda Richterich

Principiu: Se determină cantitatea de amidon rămasă nehidrolizată de enzimă prin adăugarea de iod cu care formează un compus iod-amidon de culoare albastră, a cărei intensitate este proporțională cu concentrația amidonului și invers proporțională cu activitatea enzimatică.

Reactivi:

1. Soluție de amidon 6,2 mM (substrat): 0,25 g amidon solubil în 250 ml soluție tampon;
2. Tampon TRIS-HCl pH 7,5;
3. Soluție iod-iodură de potasiu ce se diluează la întrebuințare 1:200;
4. Substrat tampon 3,1 mM: se amestecă volume egale de substrat și tampon;
5. HCl 0,5N.

Mod de lucru:

Reactivi	Probă	Probă	Martor
Soluție tampon-substrat	1	1	1
Soluție HCl 0,5N	-	-	0,5
5' la 37°C			
Plasmă	0,02	0,02	0,02
Se introduce la termostat la 37°C timp de 30 minute			
Soluție HCl 0,5 N	0,5	0,5	-
Soluție iod 1:200	10,00	10,00	10,00

Se citesc extincțiile probelor și martorului la $\lambda = 580 \text{ nm}$.

Calcul:

$$U/l \text{ (la } 37^\circ\text{C)} = ((E_M - E_P)/E_M) \times 3,1 \times (1000/0,2) \times 1/30 = ((E_M - E_P)/E_M) \times 5166,6$$

Valori normale: Amilazemie 230 - 2700 U.R

Amilazurie până la 5500 U.R

Determinarea activității amilazei prin metode cu substraturi sintetice

Principiu: Amilaza catalizează hidroliza 4-nitrofenil maltoheptaozid etilidenului (un substrat sintetic) la oligozaharide mici care sunt hidrolizate de alfa-glucozidază eliberând p-nitrofenolul. Activitatea se determină prin rata formării 4-nitrofenolului măsurată la 405 nm.

Reactivi:

1. Reactiv 1: Tampon HEPES 125 mmol/l, clorură de sodiu 62 mmol/l, MgCl_2 12,5 mmol/l;
 2. Reactiv 2: 4-nitrofenilmaltoheptaozid etiliden > 15 mmol/l
- Se amestecă patru părți reactiv 1 cu o parte reactiv 2.

Mod de lucru:

Se aduc reactivii la temperatura de lucru: 37°C.

Reactivi	Probă ser	Probă urină
Reactiv	2	2
Ser (urină)	0,04	0,04

Se citește absorbția inițială la 405 nm după 1 minut. Se repetă 3 citiri la intervale de 1 minut.

Calcul: $U/l = F \times \Delta A/\text{min}$

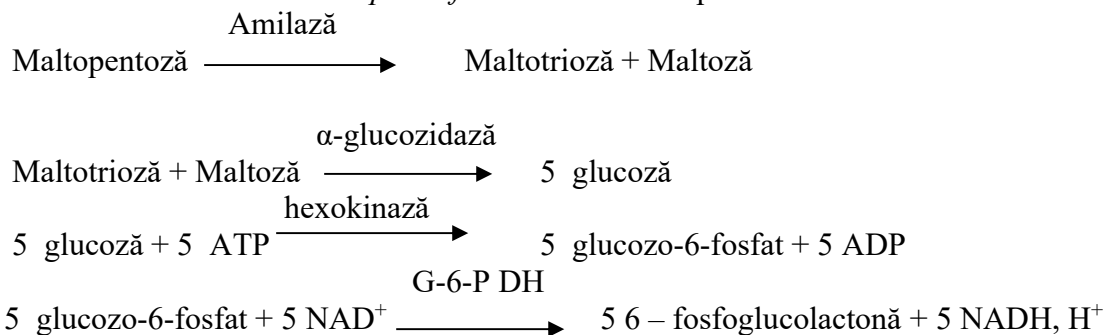
La 37°C, F este 10440 pentru determinarea activității în ser și 20675 pentru urină.

Valorile normale pentru această metodă sunt: <220 U/l în ser

<1170 U/l în urină.

Metoda este liniară până la $\Delta A/\text{min}$ de 0,3. Interferențe dau citratul, EDTA, de aceea plasma trebuie obținută prin recoltarea pe heparină.

Recent s-au introdus metode *spectrofotometrice* bazate pe următoarea succesiune de reacții:



Se măsoară intensificarea absorbției la 340 nm în timp.

Semnificația diagnostică a hidrolazelor

Afecțiuni biliare

Activitatea *fosfatazei alcaline* prezintă creșteri semnificative în cazul obstrucției căilor biliare extrahepatice (calculi biliari), în colestaza intrahepatică (determinată de medicamente) și în ciroza biliară. Activitatea *transaminazelor* este normală în cazul disfuncțiilor biliare

Afecțiuni pancreatice

Pancreatita acută apare când enzimele proteolitice și lipolitice pancreatice devin active și inițiază digestia țesutului pancreatic și a vaselor de sânge. Severitatea leziunii variază de la edem pancreatic cu risc de mortalitate între 5% și 10%, până la necroza hemoragică cu risc între 50% și 80%. Este asociată cu alcoolismul și afecțiunile biliare, deși aproximativ 20% din cazuri sunt de etiologie necunoscută.

Pentru diagnosticul de laborator al pancreatitei acute se determină activitatea *amilazei* în ser și urină, precum și în lichidele pleural și peritoneal, precum și activitatea *lipazei* serice.

Activitatea amilazei serice crește la 2 ore după atac, atinge maximul după 24 ore și revine la valorile normale în 3-5 zile. Activitatea enzimei urinare crește semnificativ și rămâne crescută până la 7-10 zile. Deoarece o disfuncție renală poate modifica raportul între concentrațiile serică și urinară, s-a introdus ca element de diferențiere raportul C_{am} / C_{cr} .

Normal: Clearance amilază / Clearance creatinină % = 2-5%. În pancreatită acută: 7-15%

Activitatea lipazei se modifică în paralel cu cea a amilazei, atingând maximul mai târziu și rămânând crescută mai mult timp.

Afecțiuni osoase

Afecțiunile osoase sunt însoțite de creșteri semnificative ale activității *fosfatazei alcaline*. Trebuie să se țină cont de faptul că în perioada creșterii activitatea enzimei este mai crescută (maxim între 11-12 ani la fete și 13-14 ani la băieți). În cazul unor afecțiuni osoase însoțite de resorbția osoasă și în metastazele osoase se înregistrează și creșteri ale activității *fosfatazei acide*.

Neoplasme

Câteva dintre enzimele și izoenzimele de interes clinic au valoare diagnostică în diferite stări maligne. Un astfel de diagnostic nu se poate pune numai pe seama determinărilor de enzime.

Fosfataza acidă crește în **carcinomul de prostată** metastazat, scăzând în cazul unei terapii eficiente. Crește și în cazul metastazelor osoase.

Fosfataza alcalină crește în carcinomul hepatic, pancreatic și al căilor biliare.