

Diagnostic enzimatic III. Transferaze.

**Determinarea activității
transaminazelor. Determinarea
activității creatin kinazei.**

Transferazele sunt enzime care transferă diferite grupe (-NH₂, -CHO, -CH₃) între două substraturi, având diferite coenzime (acizi folici, coenzima B12, piridoxal fosfat

Se denumesc în funcție de natura grupei transferate (de ex., aminotransferaze (transaminaze), metiltransferaze, fosfotransferaze etc).

Activitatea plasmatică a celor două enzime este redusă în condiții normale, deoarece sunt enzime celulare.

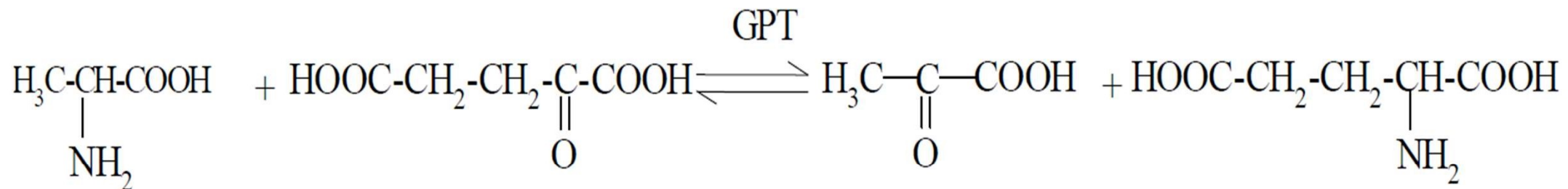
Prezența lor în plasmă în cantitate crescută se înregistrează în cazul unor afecțiuni când, datorită unor modificări de permeabilitate a membranelor celulare, ies în spațiul extracelular și ajung în sânge.

În aceste situații activitatea lor plasmatică poate să crească de 100 – 200 ori față de valorile normale.

- ▶ Transaminazele sunt enzime care transferă grupe amino de pe un aminoacid pe un cetoacid.
- ▶ Cei mai importanți donori de grupe amino sunt acidul aspartic și acidul glutamic, iar acceptori de
- ▶ grupe amino sunt acidul piruvic, acidul α -cetoglutamic și acidul oxalilacetic.



Transaminaza ALT (GPT, TGP) catalizează următoarea reacție:

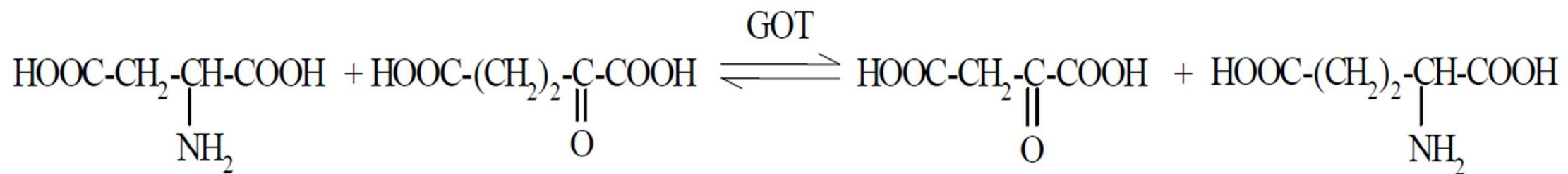


ALT = alanin aminotransferaza

GPT = glutamat piruvat transaminaza

TGP = transaminaza glutamic piruvică

Transaminaza AST (GOT, TGO) catalizează reacția:



AST = aspartat aminotransferaza

GOT = glutamat oxalilacetat transaminaza

TGO = transaminaza glutamic oxalilacetică

Repartizarea transaminazelor în țesuturi și organe este diferită:

- ▶ ALT= ficat, rinichi, inimă, mușchi, pancreas.
- ▶ AST= inimă, ficat, mușchi, rinichi, splină.

Cele două enzime diferă și ca localizare intracelulară.

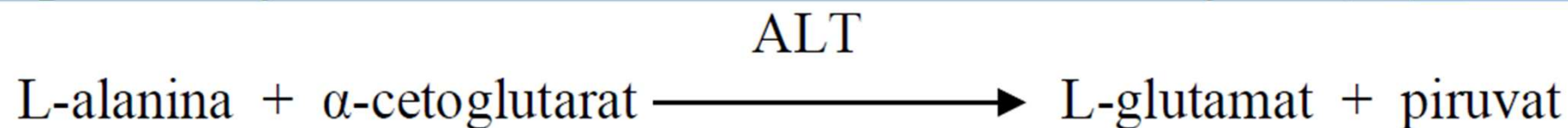
ALT este enzimă citoplasmatică, în timp ce AST este enzimă cu localizare mixtă (atât citoplasmatică, cât și mitocondrială).

Determinarea activității transaminazelor ALT și AST prin metoda cinetică

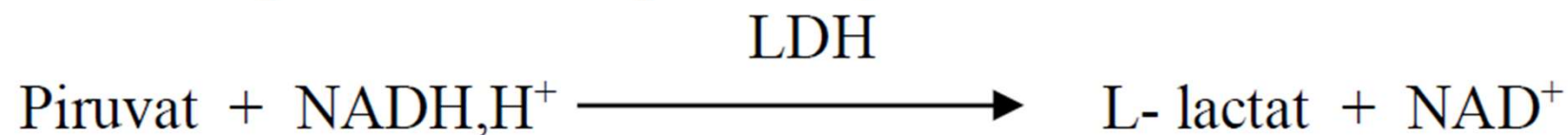
În cazul enzimelor care nu reacționează cu NAD^+ , se poate cupla reacția catalizată de acestea cu o reacție indicatoare catalizată de o dehidrogenază NAD - dependentă.

Produsul format prin acțiunea enzimei a cărei activitate dorim să o determinăm este dozat cu ajutorul dehidrogenazei.

Principiu. Reacțiile care stau la baza determinării activității ALT sunt următoarele:



Piruvatul este apoi determinat prin reacția:



Fiecare mol de piruvat oxidează un mol de NADH,H+ și este redus la lactat, astfel că scăderea extincției măsurate la 340 nm este direct proporțională cu viteza reacției de transaminare.

Reactivi:

- ▶ 1. R1 – reactiv enzimatic (TRIS pH 7,5 100 mmol/l, L-Ala 500 mmol/l, LDH>1200 U/l)
- ▶ 2. R2 –substrat (α -cetoglutarat 15 mmol/l, NADH,H+ 0,18 mmol/l, tampon pH 7,6,0,1 mmol/l, piridoxal-5-fosfat 13,8 mmol/l).
- ▶ Prepararea reactivului de lucru: se amestecă 4 părți reactiv R1 cu 1 parte reactiv R2.
- ▶ Mod de lucru:

Reactivii trebuie aduși la temperatura de lucru: 37C

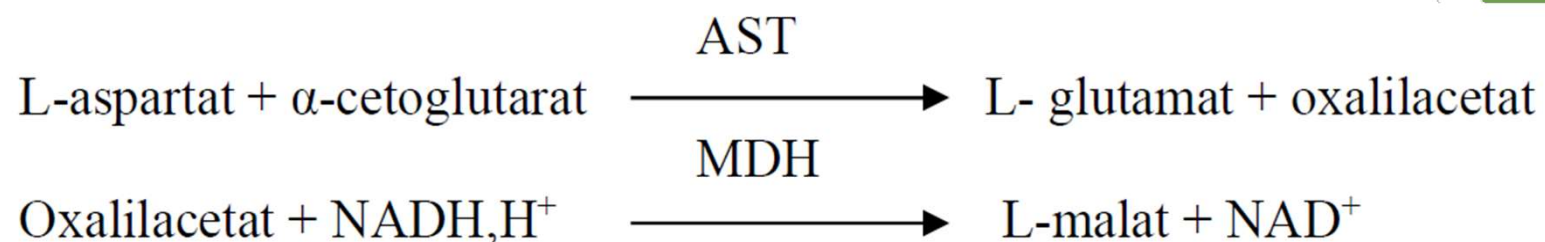
Reactivi	Probă
Ser	0,1
Reactiv de lucru	1

Se agită eprubetele și se introduc în baia de apă. După 1 minut se citește absorbția A1P la 340 nm. Se reintroduc eprubetele în baia de apă și se mai țin încă trei minute. Se citește absorbția A2P.

Calcul:

- ▶ $[U/l] = F \times [(A1P - A2P)]/3$, unde F este 1745 la 370C
- ▶ Valori normale: femei < 42 U/l bărbați < 32 U/l la 370C

Principiu. Reacțiile care stau la baza determinării activității AST sunt următoarele:



Reacția catalizată de malat dehidrogenază (MDH) este reacția indicatoare și se măsoară scăderea absorbției la 340 nm timp de trei minute.

Reactivi:

1. R1 – reactiv enzimatic (TRIS pH 7,8, 80 mmol/l, L-Aspartat 240 mmol/l, MDH>600U/l)
2. R2 – substrat (α -cetoglutarat 12 mmol/l, NADH,H⁺ 0,18 mmol/l, tampon pH 7,6, 0,1 mmol/l, piridoxal-5-fosfat 13,8mmol/l).

Prepararea reactivului de lucru: se amestecă 4 părți reactiv R1 cu 1 parte reactiv R2.

Mod de lucru:

Reactivii trebuie aduși la temperatura de lucru: 37C

Reactivi	P robă
Ser	0,1
Reactiv de lucru	1

Se agită eprubetele și se introduc în baia de apă. După 1 minut se citește absorbția A1P la 340 nm.

- ▶ Se reintroduc eprubetele în baia de apă și se mai țin încă trei minute. Se citește absorbția A2P.
- ▶ Calcul: $[U/I] = F \times [(A1P - A2P)]/3$, unde F este 1745 la 370C
- ▶ Valori normale: femei < 37 U/l bărbați < 31 U/l la 370C

Variații patologice. Activitatea acestor enzime crește diferit în unele afecțiuni:

- ▶ GPT: hepatită virală, icter mecanic, pancreatită acută
- ▶ GOT: hepatită acută (mai puțin ca GOT), hepatită cronică, ciroză hepatică, infarct miocardic recent.

În general, în afecțiunile hepatice inflamatorii $ALT > AST$ (raportul de Rittis este subunitar).

- ▶ Lipsa tendinței de normalizare a transaminazelor serice în 8-10 săptămâni de boală este un indiciu de evoluție spre cronicizare, vindecarea completă a unei afecțiuni hepatice fiind completă la revenirea transaminazelor la valorile normale.
- ▶ În necroza hepatică, $AST > ALT$.
- ▶ În infarct miocardic, transaminaza AST (GOT) înregistrează o creștere marcată după 8-12 ore
- ▶ atingând maximul de activitate cam după 24 ore, activitatea sa normalizându-se în 4-7 zile după infarct.
- ▶ Determinarea sa nu este atât de utilă ca cea a CK și LDH.

Creatin kinaza (CK sau CPK) este o enzimă care este asociată cu regenerarea ATP în sistemele contractile sau de transport.

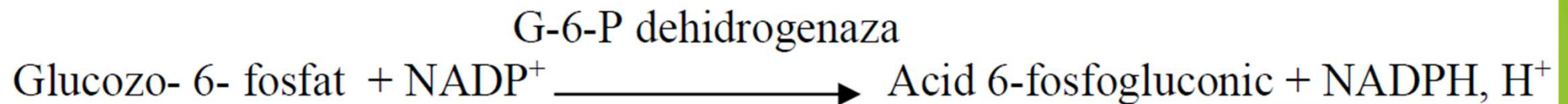
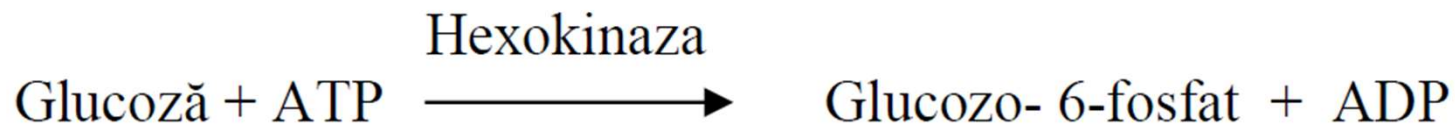
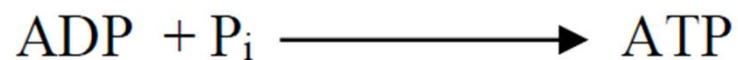
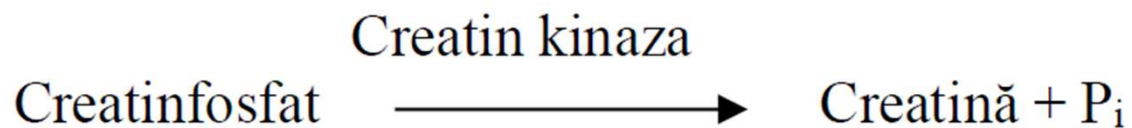
În mușchi enzima este implicată în stocarea energiei sub forma fosfocreatinei.

Creatin kinaza este larg distribuită în unele țesuturi: mușchi scheletici, miocard, creier și mai puțin în vezica urinară, placentă, uter, prostată etc.



Determinarea activității creatin kinazei prin metoda cinetică

Principiu. Reacțiile pentru determinarea activității CK sunt următoarele:



Reacția catalizată de glucozo – 6 – fosfat dehidrogenază este reacția indicatoare și se măsoară creșterea absorbției la 340 nm.

► Reactivi:

1. Tampon imidazol pH 6,7 și creatinfosfat 30 mmol/l;
2. Glucoză 20 mmol/l, N-acetilcisteină 20 mmol/l, acetat de magneziu 10 mmol/l, EDTA 2 mmol/l, ADP 2 mmol/l, NADP 2 mmol/l, Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza >1,5 kU/l, > 2,5 kU/l.

Se amestecă 4 părți reactiv 1 cu o parte reactiv 2.

- Mod de lucru: Într-o eprubetă se pipetează 1 ml reactiv (4 părți tampon R1 și o parte R2) și 0,04 ml plasmă.
- Se agită și se lasă 2 minute pe baie de apă la 37°C. Se citește absorbția la 340 nm (A1).
- După 3 minute de incubare se citește din nou absorbția (A2).

Calcul: $4127 \times (A2-A1)/3 \text{ U/l}$

- Valori normale: femei: $<165 \text{ U/l}$; bărbați: $<190 \text{ U/l}$ (la 37°C).

Variații patologice. Activitatea CK este crescută în afecțiuni ale mușchilor cardiac și scheletici.

- Nivelul CK este considerat cel mai sensibil indice pentru infarctul miocardic acut și distrofia musculară de tip Duchenne (activitatea crește de 50-100 de ori).

Apar valori crescute și în cazul unor afectări ale sistemului nervos: accidente vasculare cerebrale, degenerare nervoasă.

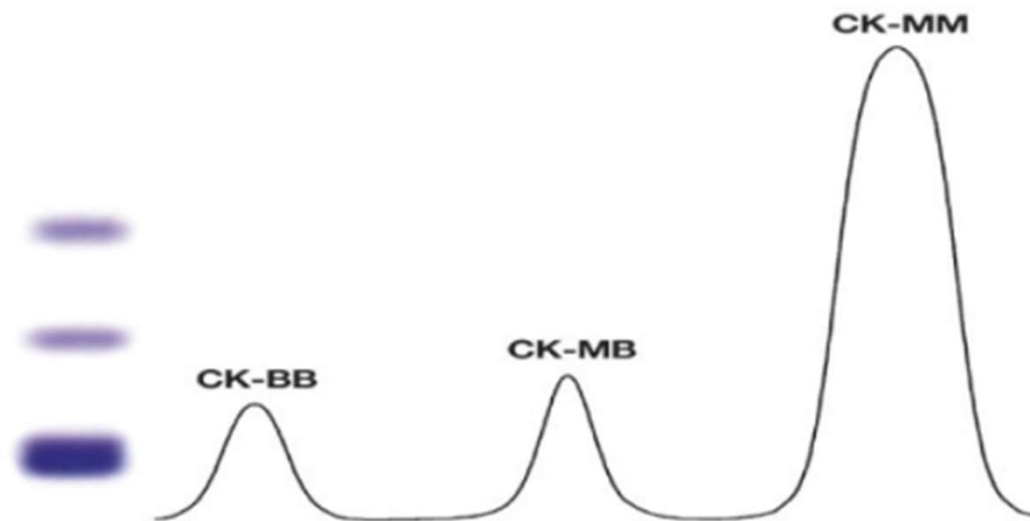
- În infarct miocardic, creatin kinaza (CK) crește cu câteva ore înainte de declanșarea crizei propriu-zise, atinge maximul după 16 ore și revine apoi la valorile normale în 1-2 zile. Importanță deosebită prezintă creșterea izoenzimei CK-MB peste 6% din activitatea enzimei totale.
- În afecțiunile musculare se determină activitatea CK, a izoenzimei CK-MM și a AST.

Izoenzime CK.

Creatin kinaza există ca dimer ce prezintă mai multe izoenzime: CK-BB (tip creier), CK-MB (tip hibrid), CK-MM (tip mușchi).

La electroforeză, CK-BB va migra cele mai repede spre anod (CK1), fiind urmată de CK-MB (CK2) și ultima CK-MM (CK3).

CK-MB se găsește în miocard și mușchii scheletici și reprezintă până la 6% din activitatea totală a enzimei dintr-un ser normal, cea mai activă fiind CK-MM (aprox. 94%).



Gama-glutamyltransferaza este o enzimă implicată în sinteza peptidelor și proteinelor, reglarea glutationului tisular și transportul aminoacizilor prin membrana celulară.

Se găsește în canaliculele hepatice și biliare, mai puțin în rinichi, creier, pancreas.

Se folosește ca indice de diagnostic pentru afecțiuni hepatobiliare și monitorizarea consumului de alcool.

- ▶ Determinarea activității gama-glutamyltransferazei
- ▶ Principiu: γ -Glutamyltransferaza (γ – GT) catalizează transferul acidului glutamic de pe un donor (sintetic, γ -glutamil-p-nitroanilidă sau derivați ai acesteia) pe un acceptor (sintetic, glicil-glicină).
- ▶ În urma reacției se formează p-nitroanilină (sau derivați ai acesteia), colorată în galben.

Reactivi:

1. Tampon Tris 100mmol/l, pH 8,2 și glicilglicină 100 mmol/l;
2. Gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilidă 4 mmol/l.

Mod de lucru: Într-o eprubetă se pipetează 1 ml reactiv format din 4 părți tampon și o parte reactive 2 și se adaugă 0,1 ml plasmă.

Se agită și după un minut de incubare la 37 oC se citește absorbția la 405 nm (A1).

Se incubează din nou 3 minute, apoi se citește absorbția A2.

► Calcul: $1158 \times (A2-A1)/3$ U/l

Valori normale: 15-60 U/l la bărbați, 10- 40 U/l la femei.

Gama-GT este un test deosebit de sensibil de retenție biliară.

Valori crescute se întâlnesc și în hepatite cronice, neoplasm primitiv sau metastazic al ficatului, insuficiență cardiacă cu stază hepatică sau în leziuni pancreatice.

Crește la alcoolici sau după administrare de barbiturice.