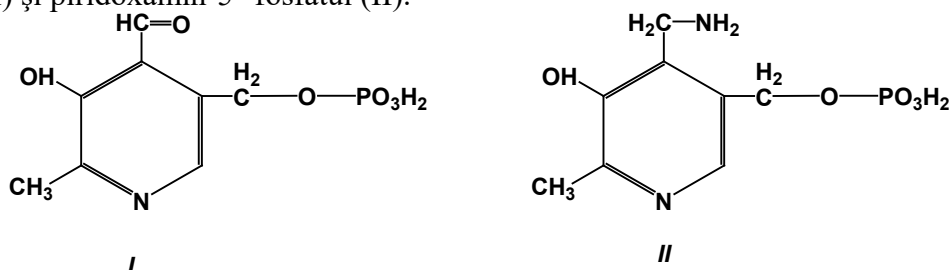


DETERMINAREA ACTIVITĂȚII AMINOTRANSFERAZELOR

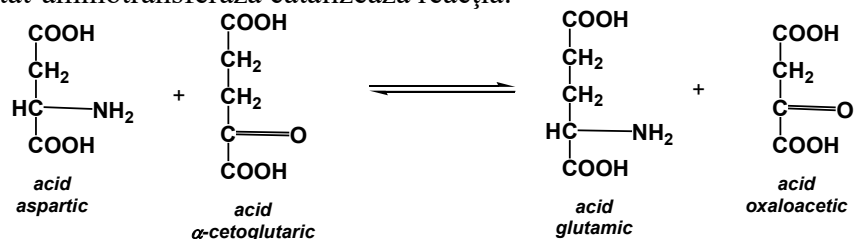
Aminotransferazele (transaminazele) catalizează în organismul viu procesul de transaminare, adică reacția de transfer reversibil a grupării aminice între aminoacizi și cetocizi. Aminotransferazele sunt enzime bicomponente care au drept coenzimă piridoxal-5'-fosfatul (I) și piridoxamin-5'-fosfatul (II).



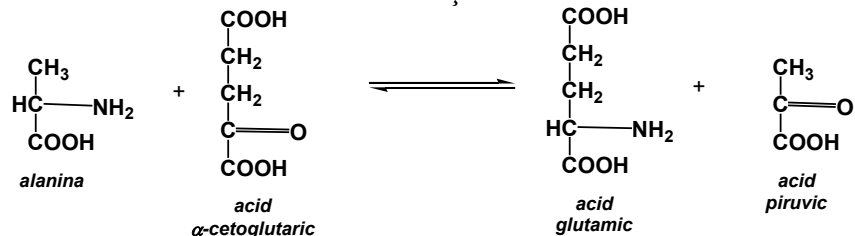
Denumirea diferitelor aminotransferaze derivă de la numele aminoacidului care cedează gruparea amino și numele cetoacidului acceptor al acestei grupări.

Între aminotransferazele cunoscute un interes deosebit prezintă aspartat-aminotransferaza (AspT) sau glutamico-oxaloacetataminotransferaza (GOT), cu codul EC 2.6.1.1. și alanin-aminotransferaza (alaT) sau glutamico-piruvat-aminotransferaza (GPT), având codul EC 2.6.1.2.

Aspartat-aminotransferaza catalizează reacția:



Alanin-aminotransferaza catalizează reacția:

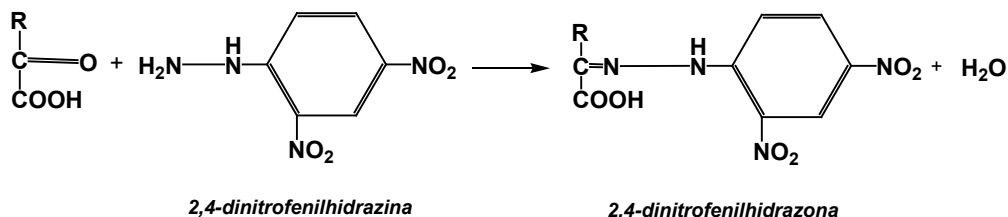


Aceste două aminotransferaze posedă o activitate catalitică pronunțată și sunt larg răspândite în diferite organe animale: ficat, miocard, mușchi scheletici, rinichi etc. în serul sanguin, de asemenea, în țesuturile vegetale activitatea celor două aminotransferaze este mai scăzută.

Există mai multe metode de determinare a activității aminotransferazelor. Foarte comodă și accesibilă este metoda colorimetrică cu 2,4-dinitrofenilhidrazină.

DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ASPARTAT- ȘI ALANIN-AMINOTRANSFERAZELOR ÎN SERUL SANGUIN

Principiul metodei. În urma transaminării realizate sub acțiunea AspT și AlaT se formează acizii oxaloacetic și piruvic. Acidul oxaloacetic poate să se decarboxileze în cursul reacției enzimatice în acid piruvic. Prin adăugarea soluției acide de 2,4-dinitrofenilhidrazină la sistemul de reacție se întrerupe procesul enzimatic și se formează dinitrofenilhidrazonile acizilor α -cetoglutaric, oxaloacetic și piruvic, colorate în mediul alcalin:



Pentru a nu interfera în măsurarea activității aminotransferazelor, acidul α -cetoglutaric se adaugă în cantitate mică, iar extincția probelor se citește la lungimea de undă de 546 nm, unde fenilhidrazona acidului α -cetoglutaric absoarbe slab. Pe măsura creșterii conținutului de acid piruvic și diminuării corespunzătoare a cantității de acid α -cetoglutaric extincția amestecului de fenilhidrazone crește. Creșterea extincției este proporțională cu sporirea concentrației acidului piruvic în probă, care este dependentă de activitatea aminotransferazelor.

Reactivi.

1. Soluție tampon de fosfați 0,1M cu pH 7,4. Se dizolvă 1,5045g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ și 0,1288g KH_2PO_4 în 50 ml apă bidistilată la balon cotat.

2. Soluție de NaOH 1N. Se dizolvă 11g NaOH în 250 ml apă distilată. Se stabilește factorul soluției de hidroxid de sodiu cu ajutorul acidului oxalic și se face corecția necesară pentru a obține o soluție de NaOH exact 1N.

3. Soluție substrat pentru AspT. Într-un pahar mic peste 7,5mg de acid α -cetoglutaric și 665mg de acid DL-aspartic (333mg acid L-aspartic) se adaugă soluție de NaOH 1N până la dizolvarea completă a celor două substrate, apoi 10 ml soluție tampon de fosfați 0,1M și se corectează pH-ul la 7,4, utilizând un pH-metru. Soluția se transvazează într-un balon cotat de 25ml, se spală paharul cu soluție tampon de fosfați 0,1M (pH 7,4) și se completează conținutul la semn tot cu soluție tampon. Soluția de substrat se agită, se adaugă o picătură de cloroform și se păstrează în frigider.

4. Soluție substrat pentru AlaT. Se introduc într-un pahar mic 7,5mg de acid α -cetoglutaric și 445mg de DL-alanină (223mg D-alanină). Apoi se adaugă soluție de NaOH 1N până la dizolvarea completă a celor două substrate, după care 10 ml soluție tampon de fosfați 0,1M și se corectează pH-ul la 7,4, utilizând un pH-metru. Soluția se transvazează într-un balon cotat de 25ml, se spală paharul cu soluție tampon de fosfați 0,1M (pH 7,4) și se completează conținutul la semn tot cu soluție tampon. Soluția de substrat se agită, se adaugă o picătură de cloroform și se păstrează în frigider.

5. Soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină 1mM în soluție de HCl 1N. se dizolvă 20mg de 2,4-dinitrofenilhidrazină în 100ml HCl 1N.

6. Soluție de NaOH 0,4N. se prepară prin amestecarea a 200ml soluție de NaOH 1N cu 300ml apă distilată.

7. Soluție etalon de piruvat de sodiu 0,001M. se dizolvă 11mg de piruvat de sodiu în 100ml apă distilată la balon cotat. Un ml soluție etalon conține 110 micrograme piruvat de sodiu, ceea ce corespunde la 88 micrograme sau 100 micromoli de acid piruvic.

Tehnica determinării activității aspartat-aminotransferazei.

În două eprubete se măsoară câte 0,5 ml substrat pentru AspT și se incubează la 37°C timp de 5 minute. Apoi, în prima eprubetă (proba) se adaugă 0,1ml ser sanguin nehemolizat și se continuă incubația 60 minute. La sfârșitul acestui interval de timp eprubetele se scot din termostat și imediat se adaugă în fiecare din ele câte 0,5ml soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină. În eprubeta 2 (martor) se pipetează 0,1ml ser. Se agită și se lasă timp de 20 minute la temperatura camerei. După aceasta se introduce în fiecare eprubetă câte 5ml soluție de NaOH 0,4N, se agită cu atenție și se lasă la temperatura camerei timp de 10 minute

pentru dezvoltarea culorii. Extincția probei și martorului se citește la un fotoelectrocolorimetru, utilizând filtrul verde (546nm) și apa ca lichid de compensație.

Tehnica determinării activității alanin-aminotransferazei

În două eprubete se pipetează câte 0,5 ml soluție substrat pentru AlaT și se incubează la 37°C timp de 5 minute. Apoi în una din eprubete se măsoară 0,1ml ser (proba) și se introduce iarăși în termostat pentru 30 minute.

Mai departe se procedează în mod identic ca la determinarea activității AspT.

Calculul rezultatelor.

Diferența între extincția probei și extincția martorului indică o schimbare a intensității lichidelor din eprubetă în urma desfășurării reacțiilor catalizate de aminotransferazele respective.

Activitatea AspT și AlaT se poate exprima în unități convenționale de extincție care se calculează după formula:

$$(E_{\text{probă}} - E_{\text{martor}}) \times 100.$$

Însă mai corect este ca activitatea aminotransferazelor să se exprime în miliunități enzimatică (mU) într-un ml de ser (1 mU corespunde unei activități a enzimei care în condițiile experimentale date catalizează formarea unui micromol de acid piruvic într-un minut), conform recomandărilor I.U.B. (Uniunea Internațională de Biochimie).

În acest caz calculul activității aminotransferazelor se efectuează folosind curba de etalonare construită cu ajutorul soluției etalon de piruvat de sodiu. La construirea curbei etalon se poate utiliza schema redată în tabelul următor:

Schema pentru construirea curbei etalon la determinarea activității aminotransferazelor

Reactivi		Proba						
		1	2	3	4	5	6	7
Conținutul de acid piruvic în probă	γ	4,4	8,8	13,2	17,7	22,0	26,4	0
	μM	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0
Soluție etalon de piruvat de Na (ml)		0,05	0,010	0,15	0,20	0,25	0,30	0
Apă distilată (ml)		0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,6

În eprubete separate se măsoară ingredientii menționați în tabelul de mai sus, se adaugă câte 0,5 ml soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină și se agită. Exact după 20 minute de repaus, în fiecare eprubetă se pipetează 5ml soluție de NaOH 0,4N, se amestecă și se lasă la temperatura camerei timp de 10 minute. Se citesc extincțiile probelor la 546nm față de proba 7.

La trasarea curbei etalon se înscrie pe abscisă concentrația acidului piruvic în micromoli, iar pe ordonată extincțiile corespunzătoare.

Calculul final se face cu ajutorul formulei:

$$\frac{mU}{1mlser \times 1min} = \frac{a}{0,1.t}$$

unde:

a- numărul micromolilor de acid piruvic, găsit pe curba etalon;
t-timpul de incubație, în minute.

Observații.

1. Serul trebuie să fie proaspăt și nehemolizat.
2. Dacă serul posedă o activitate aminotransferazică mare, aceasta se diluează cu soluție de albumină 5% în ser fiziologic. Rezultatele obținute se vor înmulți cu coeficientul de diluare corespunzător.

Valori fiziologice.

În serul sanguin al oamenilor sănătoși activitatea AspT oscilează între 2-16 mU/ml, iar activitatea AlaT- între limitele 2-12 mU/ml.

Nivelul normal al aminotransferazelor serice este, în general, constant. Variații mari ale activității aminotransferazelor sanguine se observă în bolile ficatului, în infarctul miocardic etc. determinarea activității aminotransferazelor în serul sanguin constituie un indicator fin al acuității proceselor patologice în ficat și de aceea are o mare importanță pentru diagnosticarea diferențiată a bolilor respective. Nu mai puțină însemnătate are determinarea activității transaminazelor în stabilirea diagnosticului bolilor de inimă.