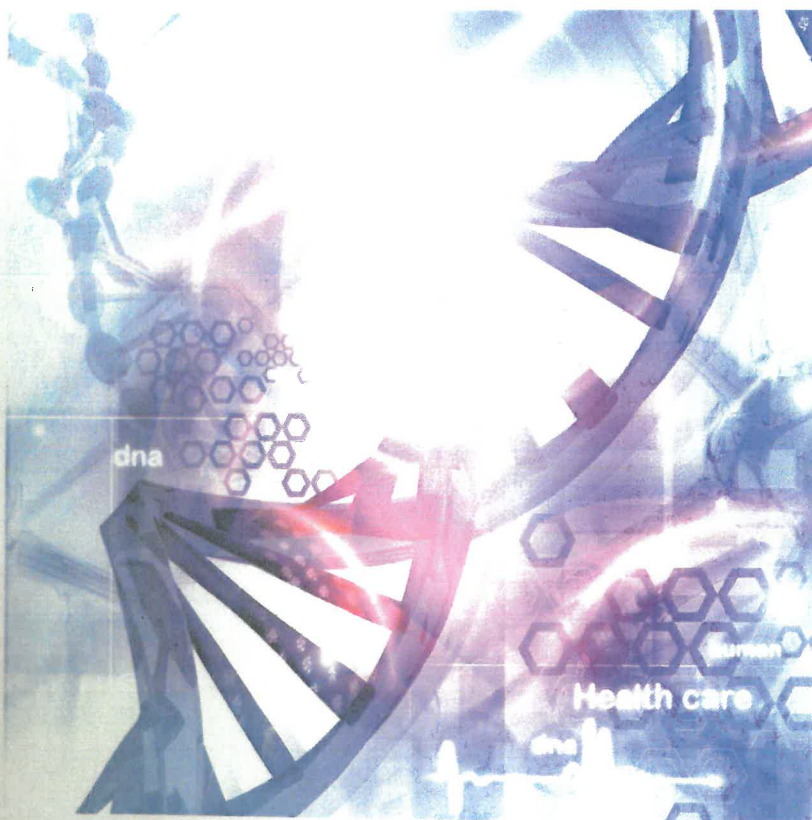


*sub redacția Minodora Dobreanu*

# Biochimie clinică

## Implicații practice

Ediția a III-a Vol. 1



2015



**Biochimie clinică**  
**Implicații practice**

Doătoru Ana Maria



*Minodora Dobreanu*

# **Biochimie clinică**

## **Implicații practice**

*Ediția a III-a*

**Vol. 1**



2015



*“Cărțile sunt cei mai tăcuți și constanți prieteni;  
sunt cei mai accesibili și înțelepți consilieri,  
și cei mai răbdători profesori.”  
– Charles William Eliot*

Biochimie clinică: implicații practice. Ediția a III-a (2 volume)  
Sub redacția Minodora Dobreanu

ISBN 978-973-169-357-6

**Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României**

**DOBREANU, MINODORA**

**Biochimie clinică : implicații practice / Minodora Dobreanu. –**

Ed. a 3-a, rev.. - Târgu-Mureș : University Press, 2015

Bibliogr.

Index

ISBN 978-973-169-357-6

577.1:616

**Referenți:**

Prof. Univ. Dr. Eugen Carasevici, UMF „Gr. T. Popa”, Iași

Prof. Univ. Dr. Marius Sabău, UMF Târgu Mureș

**Macheta grafică și tehnoredactare computerizată:**

Valentin Nădășan

**Grafică:**

Dr. Zoltán Sárkány

**Coperta I:** Digital illustration of DNA molecules background.

ID 50166786 © Hywards | Dreamstime.com

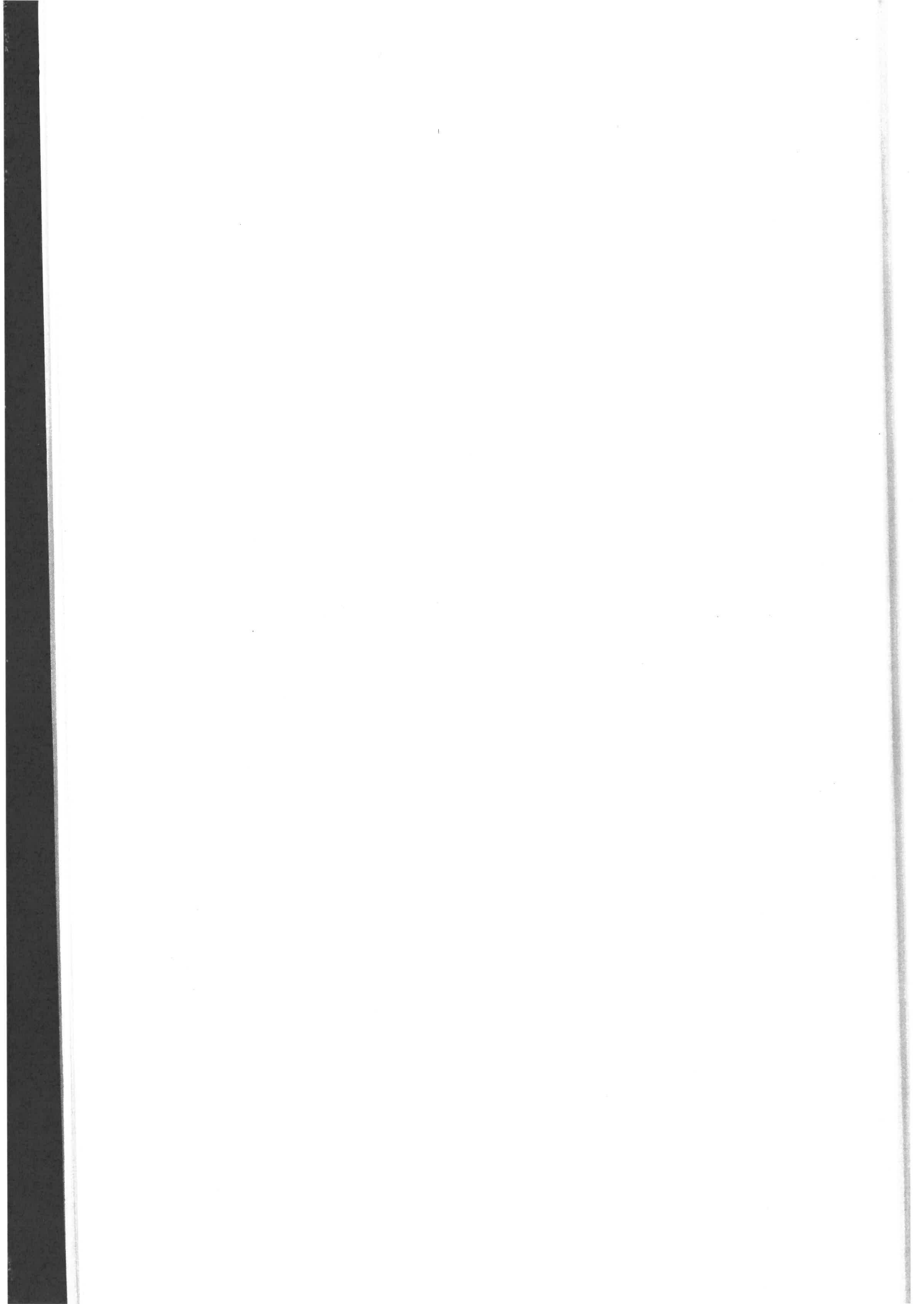
**Copyright:**

Toate drepturile editoriale aparțin în exclusivitate autorilor, publicația fiind protejată integral de legislația internă și internațională. Orice valorificare a conținutului, integral sau parțial (traducere, multiplicare etc.), fără permisiunea scrisă a autorilor, se pedepsește conform legislației în vigoare.

# Autorii

în ordine alfabetică:

Claudia Bănescu  
Gabriela Bordeianu  
Ioana Brudașcă  
Simona Cernea  
Mircea Cucuianu  
Daniela Cristina Dimitriu  
Dan Dobreanu  
Minodora Dobreanu  
Andrea Marta Fodor  
Annamaria Földes  
Ileana Funduc  
Alina Mărginean  
Enikő Nemes- Nagy  
Elena Petrescu-Dănilă  
Ariadna Rădulescu  
Alina Scridon  
Raluca Stănescu  
Didona Ungureanu



# Cuprins

## **Volumul 1**

<b>Introducere la ediția a III-a.....</b>	<b>xv</b>
<b>Capitolul 1. Aspecte moleculare ale vieții. Compoziția chimică și organizarea materiei .....</b>	<b>1</b>
<i>Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 2. Echilibrul hidro-electrolitic.....</b>	<b>7</b>
<i>Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 3. Echilibrul acido-bazic al organismului.....</b>	<b>35</b>
<i>Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 4. Metabolismul calciului, fosforului și magneziului.....</b>	<b>53</b>
<i>Ioana Brudașcă, Mircea Cucuianu, Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 5. Aminoacizii: structură, clasificare, metabolism.....</b>	<b>83</b>
<i>Didona Ungureanu</i>	
<b>Capitolul 6. Proteine – structură, funcții și metabolism.....</b>	<b>119</b>
<i>Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 7. Metode de separare și caracterizare a proteinelor.....</b>	<b>153</b>
<i>Ileana Funduc</i>	
<b>Capitolul 8. Investigarea biochimică și citologică a lichidului cefalorahidian.....</b>	<b>187</b>
<i>Ariadna Rădulescu, Ileana Funduc, Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 9. Patochimia funcțiilor renale.....</b>	<b>203</b>
<i>Minodora Dobreanu, Ileana Funduc, Annamaria Földes</i>	
<b>Capitolul 10. Concepte de bază în interpretarea variațiilor patologice ale enzimelor serice.....</b>	<b>251</b>
<i>Mircea Cucuianu, Ioana Brudașcă</i>	
<b>Capitolul 11. Biochimia, fiziologia și patologia hemostazei.....</b>	<b>301</b>
<i>Ioana Brudașcă</i>	
<b>Capitolul 12. Patochimia funcțiilor hepatice.....</b>	<b>357</b>
<i>Andrea Marta Fodor, Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 13. Hemoproteine și metabolismul fierului. Aspecte fiziologice și patologice.....</b>	<b>387</b>
<i>Enikő Nemes-Nagy</i>	
<b>Capitolul 14. Biochimia sindroamelor anemice.....</b>	<b>425</b>
<i>Gabriela Bordeianu, Daniela Cristina Dimitriu</i>	
<b>Anexa 1. Abrevieri .....</b>	<b>443</b>
<b>Anexa 2. Index de subiecte .....</b>	<b>449</b>

## **Volumul 2**

<b>Capitolul 15. Metabolismul carbohidraților.....</b>	<b>1</b>
<i>Minodora Dobreanu, Simona Cernea</i>	
<b>Capitolul 16. Metabolismul lipidelor/ lipoproteinelor și ateroscleroza .....</b>	<b>45</b>
<i>Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 17. Biochimia inimii .....</b>	<b>99</b>
<i>Dan Dobreanu, Alina Scridon</i>	
<b>Capitolul 18. Receptorii celulari și mecanismele de transducție a semnalului.....</b>	<b>129</b>
<i>Alina Scridon</i>	
<b>Capitolul 19. Hormonii hipotalamo-hipofizari – aspecte biochimice și fiziopatologice .....</b>	<b>167</b>
<i>Didona Ungureanu</i>	
<b>Capitolul 20. Hormonii tiroidieni.....</b>	<b>187</b>
<i>Elena Petrescu-Dănilă</i>	
<b>Capitolul 21. Hormonii sexuali - aspecte biochimice, fiziologice, fiziopatologice.....</b>	<b>211</b>
<i>Didona Ungureanu, Raluca Stănescu</i>	
<b>Capitolul 22. Hiperuricemia - Mecanisme de producere și implicații în patologia clinică .....</b>	<b>229</b>
<i>Mircea Cucuianu, Ioana Brudașcă</i>	
<b>Capitolul 23. Aspecte paraclinice și metabolice în proliferările maligne.....</b>	<b>243</b>
<i>Alina Mărginean, Minodora Dobreanu</i>	
<b>Capitolul 24. Mutațiile genice .....</b>	<b>303</b>
<i>Claudia Bănescu</i>	
<b>Capitolul 25. Anomalii genetice în cancer. Analize genetice în cancer .....</b>	<b>321</b>
<i>Claudia Bănescu</i>	
<b>Capitolul 26. Tehnici de diagnostic molecular.....</b>	<b>335</b>
<i>Claudia Bănescu</i>	
<b>Anexa 1. Abrevieri .....</b>	<b>365</b>
<b>Anexa 2. Valorile normale și limitele de decizie clinică ale testelor de laborator.....</b>	<b>371</b>
<b>Anexa 3. O cronologie a biochimiei.....</b>	<b>377</b>
<b>Anexa 4. Index de subiecte .....</b>	<b>381</b>

# Cuprins volum 1

129	Introducere la ediția a III-a .....	xv
167	<b>Capitolul 1. Aspecte moleculare ale vieții. Compoziția chimică și organizarea materiei vii .....</b>	<b>1</b>
187	1.1 Compoziția elementară .....	1
211	1.2 Conținutii fundamentali.....	1
229	1.3 Organismul viu ca sistem organizat .....	3
243	1.4 Aspecte moleculare ale vieții: spațiu, timp, energie .....	4
303	<b>Capitolul 2. Echilibrul hidro-electrolitic .....</b>	<b>7</b>
321	2.1 Apa și viața .....	7
335	2.2 Distribuția apei și electroliților în organism.....	7
365	2.3 Proprietățile apei.....	10
371	2.4 Schimburile hidrodinamice. Forțele care coordonează mișcarea apei și electroliților între compartimente .....	11
377	2.5 Homeostazia sodiului și apei .....	15
381	2.6 Tulburări ale metabolismului apei și sodiului .....	23
	2.7 Homeostazia potasiului .....	27
	2.8 Homeostazia hidro-electrolitică a pacientului chirurgical .....	29
	2.9 Determinarea în laboratorul de analize a statusului hidro-electrolitic.....	30
	2.10 Prezentări de caz .....	31
	<b>Capitolul 3. Echilibrul acido-bazic al organismului .....</b>	<b>35</b>
	3.1 Mecanisme implicate în homeostazia acido-bazică .....	36
	3.2 Variații fiziologice și patologice ale parametrilor echilibrului acido-bazic.....	45
	3.3 Potasemia și echilibrul acido-bazic .....	49
	3.4 Prezentări de caz .....	49
	<b>Capitolul 4. Metabolismul calciului, fosforului și magneziului.....</b>	<b>53</b>
	4.1 Metabolismul calciului.....	53
	4.2 Metabolismul fosforului .....	71
	4.3 Metabolismul magneziului .....	74
	4.4 Prezentări de caz .....	77

<b>Capitolul 5. Aminoacizii: structură, clasificare, metabolism</b> .....	<b>83</b>
5.1 Structură.....	83
5.2 Proprietăți acido-bazice ale aminoacizilor.....	83
5.3 Peptidele .....	87
5.4 Metabolismul aminoacizilor .....	88
 <b>Capitolul 6. Proteine – structură, funcții și metabolism</b> .....	<b>119</b>
6.1 Structura proteinelor.....	119
6.2 Proprietățile generale ale proteinelor .....	122
6.3 Clasificarea proteinelor .....	123
6.4 Proteinele plasmatiche .....	126
6.5 Cazuri clinice comentate .....	148
 <b>Capitolul 7. Metode de separare și caracterizare a proteinelor</b> .....	<b>153</b>
7.1 Electroforeza.....	153
7.2 Cromatografia.....	168
7.3 Metode imunologice .....	177
 <b>Capitolul 8. Investigarea biochimică și citologică a lichidului cefalorahidian</b> .....	<b>187</b>
8.1 Introducere.....	187
8.2 Formarea lichidului cefalorahidian .....	187
8.3 Recoltarea.....	188
8.4 Caracterele fizico-chimice.....	188
8.5 Analiza citologică a LCR .....	195
8.6 Protocol practic pentru examenul LCR .....	200
 <b>Capitolul 9. Patochimia funcțiilor renale</b> .....	<b>203</b>
9.1 Elemente de structură renală .....	203
9.2 Metabolismul renal .....	210
9.3 Funcțiile renale .....	210
9.4 Explorarea de laborator a funcțiilor renale .....	215
9.5 Sindroame nefrologice .....	237
9.6 Prezentări de caz .....	245
 <b>Capitolul 10. Concepte de bază în interpretarea variațiilor patologice ale enzimelor serice</b> .....	<b>251</b>
10.1 Date generale privind enzimele.....	251
10.2 Activitatea enzimatică în celulele vii.....	263
10.3 Bazele fiziopatologice ale diagnosticului enzimatic.....	274

... 83	<b>Capitolul 11. Biochimia, fiziologia și patologia hemostazei.....</b>	<b>301</b>
... 83	11.1 Hemostaza – noțiuni introductive .....	301
... 83	11.2 Hemostaza primară .....	303
... 87	11.3 Coagularea.....	315
... 88	11.4 Mecanisme anticoagulante fiziologice .....	329
119	11.7 Fibrinoliza .....	334
119	11.8 Particularități ale hemostazei în diferite stări fiziologice și patologice.....	340
122	11.9 Trombozele .....	346
123	11.10 Cazuri clinice comentate .....	350
126	<b>Capitolul 12. Patochimia funcțiilor hepatice.....</b>	<b>357</b>
148	12.1 Elemente structurale și funcționale.....	357
153	12.2 Explorarea de laborator a funcțiilor hepatice.....	366
153	12.3 Patochimia icterelor .....	373
168	12.4 Prezentați de caz .....	382
177	<b>Capitolul 13. Hemoproteine și metabolismul fierului.</b>	
187	<b>Aspecte fiziologice și patologice .....</b>	<b>387</b>
187	13.1 Hemoglobina și mioglobina .....	387
187	13.2 Metabolismul fierului .....	407
188	13.3 Degradarea hemului. Ictere.....	414
188	13.4 Incompatibilitatea de Rh și de grupă ABO .....	416
195	13.5 Prezentați de caz .....	419
200	<b>Capitolul 14. Biochimia sindroamelor anemice .....</b>	<b>425</b>
203	14.1 Anemia feriprivă .....	426
203	14.2 Anemii megaloblastice .....	427
210	14.3 Anemii prin defect de membrană.....	431
210	14.4 Anemii hemolitice prin deficite enzimatiche .....	433
215	14.5 Anemii hemolitice dobândite .....	438
237	<b>Anexa 1. Abrevieri .....</b>	<b>443</b>
245	<b>Anexa 2. Index de subiecte .....</b>	<b>449</b>
251		
251		
263		
274		



## Introducere la ediția a III-a

Expansiunea crescândă a tehnologiei de specialitate în laboratorul clinic, care crează o presiune suplimentară asupra personalului, accentuează importanța aspectelor analitice și interpretative în rutina diagnosticului de laborator. Dacă partea analitică presupune identificarea și cuantificarea prin diverse tehnici a componentelor fluidelor și țesuturilor, partea interpretativă examinează rezultatele și le utilizează în screening-ul susceptibilităților la boală, în confirmarea diagnosticului diverselor afecțiuni și / sau monitorizarea evoluției afecțiunilor și a eficienței tratamentelor. Ori performanțele interpretative se bazează pe cunoașterea mecanismelor de boală în contextul sindromului clinic. Așezarea interacțiunilor biochimice pe suportul mecanismelor fiziopatologice și a semnelor clinice, realizează una din cele mai practice asocieri în educația medicală de specialitate.

Intenția acestei a III-a ediții a cărții ***Biochimie Clinică – implicații practice***, este de a aduce la zi și consolida informațiile prezentate în edițiile anterioare, prin completarea cu o serie de capitole noi, de interes în pregătirea specialiștilor în medicina de laborator din România.

Considerăm materialul de față o bază solidă pentru cei care doresc să dobândească cunoștințe de biochimie clinică. Lucrarea oferă o paletă complexă de informații actuale în domeniu, cu aportul unor specialiști de renume de la UMF Târgu Mureș, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, UMF „Grigore T. Popa” Iași, Institutul Clinic Fundeni, care și-au reunit eforturile sub patronajul Asociației de Medicină de Laborator din România (AMLR), cu scopul de a produce un material de referință pentru instruirea specialiștilor care lucrează în laboratoarele medicale, dar și pentru aceia din alte specialități care resimt nevoia unui text la care să poată face constant apel la nevoie.

Adresăm mulțumirile noastre colegilor care au participat cu experiența lor profesională și comentarii pertinente la îmbunătățirea aspectului și a conținutului materialului.

Comentarii sau sugestii sunt binevenite pe adresa: [minodora.dobreanu@umftgm.ro](mailto:minodora.dobreanu@umftgm.ro)

Minodora Dobreanu  
12 aprilie 2015



# 1

## Aspecte moleculare ale vieții. Compoziția chimică și organizarea materiei vii

Minodora Dobreanu

### 1.1 COMPOZIȚIA ELEMENTARĂ

Organismele vii sunt alcătuite din elemente chimice comune sistemelor anorganice, care vor fi numite bioelemente (elemente biogene). Compoziția organismelor vii reflectă compoziția mediului înconjurător lor, între cele două existând schimburi de substanță, energie și informație alcătuind așa numitele cicluri ale elementelor (C, N, Fe etc).

Elementele constitutive se clasifică în funcție de proporția lor, în:

- macroelemente (până la 99% din structura organismelor vii): O, C, H, N, P, Ca;
- oligoelemente (0,05-1% din structura organismelor vii): Na, K, Cl, Mg, Fe, S;
- microelemente (<0,05% din structura organismelor vii): Zn, Mn, Cu, Co, F, I, Mo.

Macro- și oligoelementele au rol structural și funcțional, iar microelementele au rol catalitic.

Carbonul este elementul cel mai caracteristic pentru materia vie. Rolul biologic al carbonului este determinat de structura electronică și proprietățile chimice particulare: element tetravalent, are posibilitatea de a forma legături chimice simple, duble și triple, concretizate în organism în structuri catenare lineare/ ramificate, lungi/ scurte, închise/ deschise, aromatice, extrem de diverse, cu aspect tridimensional complex. Carbonul se combină în legături covalente și cu N, O, H, P, S.

În organismele vii hidrogenul și oxigenul se găsesc predominant asociați sub formă de apă ( $H_2O$ ), care este mediu biogen prin excelență.

Azotul în formă liberă nu întreține viața, în combinații însă este indispensabil sistemelor vii: proteinele și acizii nucleici sunt principalii purtători ai informației biologice, astfel încât, prin intermediul lor, azotul reprezintă de fapt suportul material al vieții.

### 1.2 CONSTITUENȚII FUNDAMENTALI

Prin asocierea bioelementelor în organism apar combinații chimice minerale și organice. Combinațiile minerale cele mai importante sunt apa și electroliții (sărurile minerale).

Apa, cel mai abundent constituent al majorității organismelor vii (40-95%), poate fi considerată mediu de dispersie pentru elementele componente ale organismului (organismul este „un sistem dispers”).

Apa influențează profund interacțiunea moleculară în sistemele biologice prin cele două proprietăți de bază:

**1. Polaritatea** - molecula de apă este un dipol electric (deși nu are sarcină electrică netă).

**2. Coeziunea internă** - moleculele de apă aflate în vecinătate, exercită o forță de atracție mare una asupra celorlalte, de aceea punctul de topire, de fierbere, căldura de evaporare, de fuziune și tensiunea superficială, sunt mai mari decât ale altor hidruri ( $H_2S$ ,  $NH_3$ ) sau ale altor lichide comparabile. Aceste proprietăți se datorează distribuției specifice a electronilor în molecula de apă: perechile de electroni puse în comun de atomul de oxigen și cei doi atomi de hidrogen nu aparțin în egală măsură partenerilor; nucleul oxigenului are o forță de atracție mai mare decât al hidrogenului, astfel atomul de oxigen are o încărcătură locală parțial negativă  $\delta^-$ , iar atomii de hidrogen au o încărcătură locală parțial pozitivă  $\delta^+$ , având drept consecință forma triunghiulară a moleculei și apariția dipolului electric. Analize spectroscopice și de raze X au demonstrat că unghiul legăturilor covalente H-O-H este de  $104,5^\circ$  - amănunt care (alături de aranjamentul electronilor în moleculă) conferă moleculei apei asimetria electrică.

Atracția electrostatică dintre două molecule de apă are ca rezultat redistribuirea încărcăturii electronice a ambelor molecule, ducând la o asociere electrostatică complexă (Figura 1.1) numită "legătura de hidrogen"; datorită distribuției tetraedrice a electronilor în jurul atomului de oxigen, fiecare moleculă de apă este potențial capabilă să formeze legături de hidrogen cu 4 molecule de apă învecinate. Acest lucru are loc în gheața cristalină la  $0^\circ C$ , în care legăturile de hidrogen au maxim de stabilitate, fiind coliniare cu o legătură covalentă O-H a moleculei de apă învecinate; în apa lichidă fiecare moleculă formează legături de hidrogen cu alte 3,6 molecule învecinate; pe măsură ce temperatura crește, scade numărul legăturilor de hidrogen intermoleculare. Legătura de hidrogen nu este specifică doar apei (apare și în interiorul proteinelor, acizilor nucleici, etc).

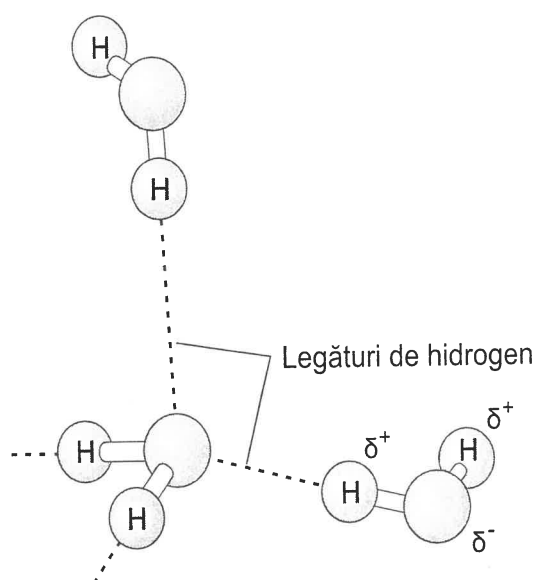


Figura 1.1 Molecula de apă și legătura de hidrogen

$$F = \frac{e_1 \cdot e_2}{D \cdot r^2},$$

unde:

$F$  = forța de atracție a doi ioni cu încărcătură electrică opusă;

$e_1, e_2$  = sarcinile ionilor;

$r$  = raza dintre ioni;

$D$  = constanta dielectrică a solventului (80 D, pentru apă).

Caracteristicile structurale enunțate determină proprietățile apei: este solvent pentru săruri cristaline, pentru compuși polari neionici (glucide, alcooli, aldehide etc.), interacționează cu molecule amfipatice (acizi grași liberi, fosfolipide).

Substanțele dizolvate exercită la rândul lor un efect asupra moleculelor de apă: scad punctul de înghețare, cresc punctul de fierbere, scad presiunea de vapori și conferă soluției proprietatea de a avea presiune osmotică.

Sărurile minerale au roluri variate: rol structural (Ca, P în oase), rol catalitic (Fe, Mg, Zn) și importanță fizico-chimică prin prezența  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  (echilibrul osmotic, acido-bazic, electric în țesuturi).

După rolul lor, combinațiile organice (biomoleculele) se împart în: constituenți organici fundamentali ai materiei vii (glucide, lipide, proteine, acizi nucleici) și efectori biochimici (enzime, hormoni, vitamine etc.).

### 1.3 ORGANISMUL VIU CA SISTEM ORGANIZAT

Sistemul organizat este un complex de elemente aflate în interacțiune: substanțele organice și anorganice constituie structuri spațiale tridimensionale între care au loc reacții într-o succesiune și interdependență riguros determinate.

Organismele vii sunt sisteme biologice organizate cu o capacitate funcțională substanțial mai mare decât suma algebrică a funcțiilor structurilor constitutive și cu proprietatea de autoreglare.

Sistemele biologice se diferențiază prin nivele de organizare ierarhizată: organism → organe → țesuturi → celule → agregate moleculare → molecule → atomi.

Pentru menținerea, funcționarea și regenerarea continuă a sistemelor vii, acestea realizează schimburi continue de energie, substanță și informație cu mediul înconjurător. Totalitatea transformărilor de substanță, energie, informație dintr-un organism viu poartă numele de metabolism. Metabolismul are două componente: catabolismul (faza degradativă), prin care din molecule mai mari rezultă molecule mai mici și se produce energie și anabolismul (faza constructivă), prin care din molecule mici, cu consum de energie, se formează produși complecși. Metabolismul asigură homeostazia organismului respectiv (starea de echilibru structural și funcțional) prin echilibrul între intrări și ieșiri.

Obiectul biochimiei clinice urmărește studierea proceselor metabolice care au loc în condiții blânde de temperatură, pH și presiune din organismele vii, în contextul homeostaziei sau tulburării acesteia.

#### 1.4 ASPECTE MOLECULARE ALE VIETII: SPAȚIU, TIMP, ENERGIE

Spațiul biologic este volumul ocupat de micro- și macrostructuri. Acesta variază de la nivelul legăturilor chimice la limitele de vizibilitate ale microscopului optic ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  m = 0,1-10  $\mu$ m) și până la de 105 ori mai mult (Figura 1.2):

- legături chimice: covalentă  $\sim 1$  Å; electrostatică  $\sim 2$ -3 Å; de hidrogen  $\sim 2,5$ -3 Å; van der Waals  $< 3$ -4 Å;
- molecule: glucoza  $< 1$  nm ( $\sim 2,5$  Å); hemoglobină - diametru 6,5 nm;
- organite: ribozomi  $\sim 0,05$   $\mu$ m ( $\sim 50$  nm); virusuri: 10-100 nm;
- elemente celulare: bacterii  $\sim 1$ -2  $\mu$ m; leucocite  $\sim 10$   $\mu$ m.

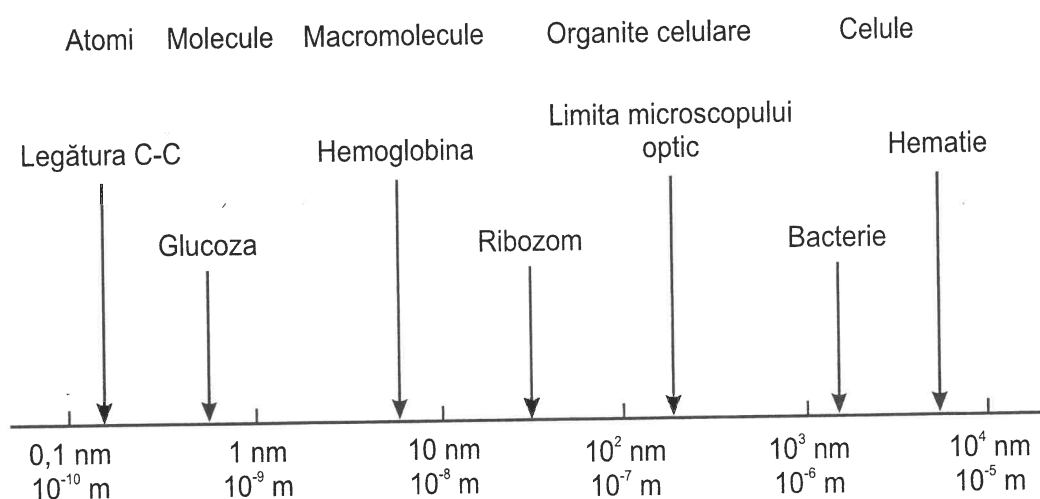


Figura 1.2 Scara dimensiunilor unor biostructuri din natură

Timpul biologic este durata în care au loc anumite transformări și interacțiuni limitate în spațiu (Figura 1.3). De exemplu, recepționarea energiei transportate de un foton în celulele cu conuri din retină ( $10^{-12}$  s = 1 ps); mișcarea monomerilor proteici în cadrul structurii cuaternare ( $10^{-9}$  s = 1 ns); despiralizarea ADN-ului dublu catenar în structura a-helix corespun-

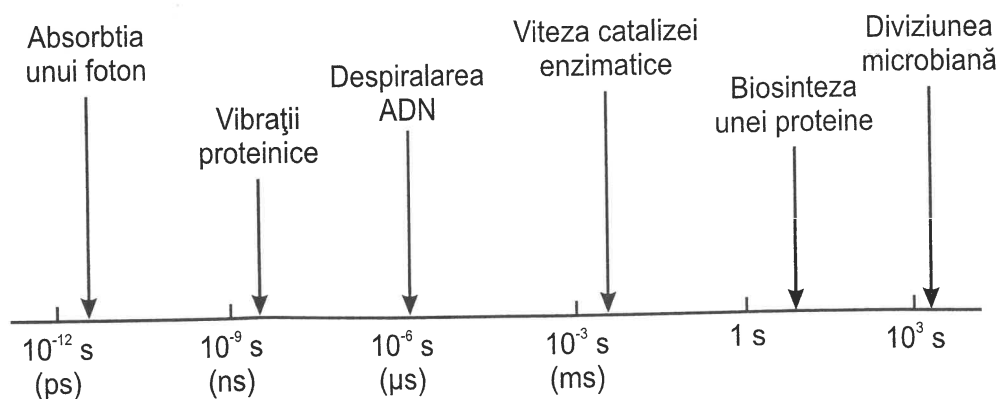
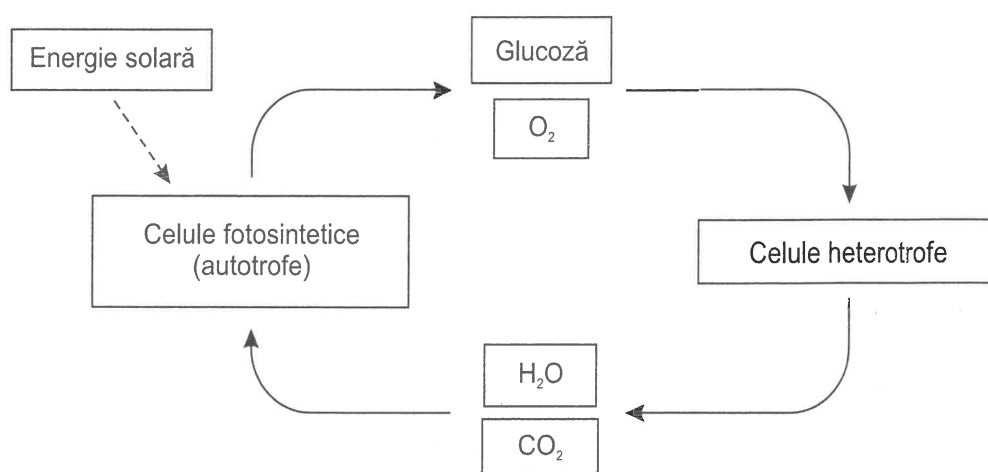


Figura 1.3 Scara desfășurării în timp a unor reacții biologice

zătoare unei gene ( $10^{-6} \text{ s} = 1 \text{ ms}$ ); reacții catalizate de enzime ( $10^{-3} \text{ s} = 1 \text{ ms}$ ); sinteza proteică (60 - 120 s); multiplicarea bacteriilor (1 - 2 ore).

Menținerea homeostaziei sistemelor vii se realizează printr-un aport continuu de energie. Sursa energetică principală pentru organismele vii este radiația solară; aceasta este folosită în mod direct de organismele autotrofe: plantele verzi fotosintetizează substanțe organice, înmagazinează energia solară în legăturile chimice ale substanțelor sintetizate. Din  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  și cu aportul luminii solare, se formează substanțe organice (carbohidrați, proteine, lipide) și oxigen (*Figura 1.4*). Organismele superioare sunt în general heterotrofe: utilizează energia înmagazinată în legăturile chimice ale substanțelor (glucide, proteine, lipide) sintetizate de organismele autotrofe prin fotosinteză.



**Figura 1.4** Ciclurile carbonului și oxigenului în biosferă

Substanțele nutritive obișnuite sunt clasificate în trei categorii: glucidele polizaharidice și monozaharidice (hexoze, pentoze), proteinele sunt degradate în aminoacizi, iar lipidele - în acizi grași și alcooli/amine. Prin descompunerea enzimatică a acestora în 3 etape catabolice (*Figura 1.5*), se eliberează inițial unitățile constituente (etapa I), ulterior energia înmagazinată în legăturile chimice fiind transferată prin intermediul legăturilor fosfat macroergice (ATP) consumatorilor (se regăsește sub forma contracției musculare, transportului membranal, biosintezei diverșilor compuși etc). Etapa a II-a constă în transformarea unităților constituente în intermediari mai simpli (piruvat, acetil-coenzimă A), care sunt utilizați în etapa a III-a, în căile catabolice comune (ciclul Krebs și lanțul de oxidare biologică) în scopul eliberării energiei. Căile catabolice sunt convergente: pleacă de la produși variați spre o cale comună simplă (reacții exergonice). Anabolismul (biosinteza) are dimpotrivă, un aspect divergent: pornește de la un număr restrâns de precursori din care rezultă un număr foarte mare de produși finali, cu prețul unui însemnat aport energetic (reacții endergonice).

Eliberarea energiei în organism are loc cu randament diferit, în funcție de tipul anaerob ( $h = 4\%$ ) sau aerob ( $h = 40\%$ ) al reacțiilor catabolice.

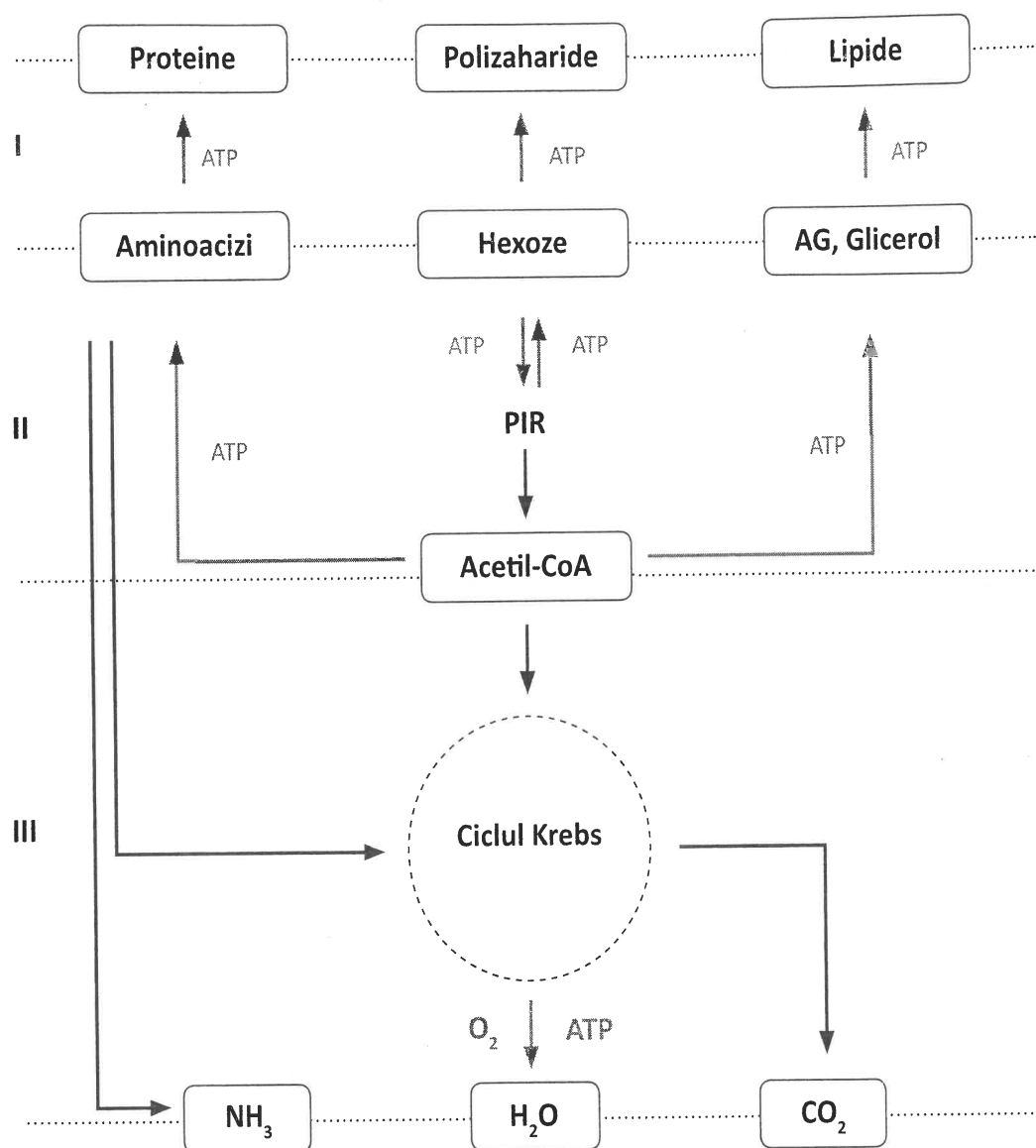


Figura 1.5 Schema generală a metabolismului

# 2

## Echilibrul hidro-electrolitic

Minodora Dobreanu

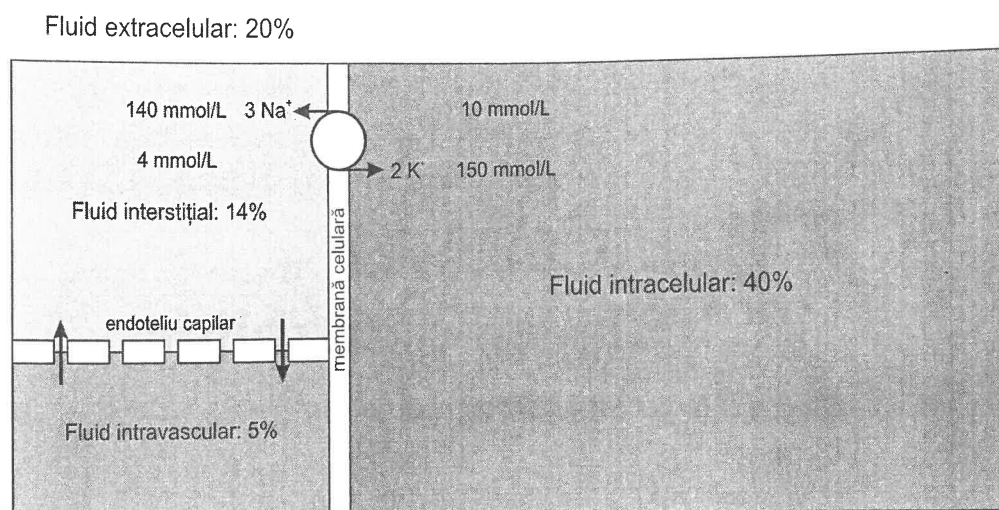
### 2.1 APA ȘI VIAȚA

Apa este un component esențial al tuturor viețuitoarelor, de la procariotele simple până la organismele superioare. În contrast cu viețuitoarele unicelulare care trăiesc într-un mediu apos și sunt nevoite să se adapteze în continuu la modificările fizice și chimice ale acestuia, organismele multiceulare superioare își asigură condițiile optime pentru existență, prin crearea unui mediu intern lichid, a cărui compoziție și volum se mențin între limite foarte stricte. Conținutul în apă al embrionului uman scade treptat de la 95% la 85%, în cursul vieții intrauterine. Nou-născutul are un conținut în apă de 82-72%, acesta scăzând la adult paralel cu înaintarea în vârstă, până la 55-50%. La femei, proporția apei în organism este de obicei mai mică, datorită conținutului mai mare în grăsimi. Metabolismul apei și sodiului sunt legate clinic și fiziologic, de aceea se impune studierea lor concomitentă.

### 2.2 DISTRIBUȚIA APEI ȘI ELECTROLIȚILOR ÎN ORGANISM

#### 2.2.1. DISTRIBUȚIA APEI

În organismul viu apa este principalul component (reprezentând aproximativ 60% din greutatea unui adult de vârstă medie, normal conformat), fiind repartizată în diferite compartimente, delimitate prin membrane biologice lipidice. Cea mai mare parte - 40% din greutatea corpului (350-450 mL/kg) se află în celule, formând compartimentul intracelular; în acest compartiment se delimitează și spațiile de apă din interiorul microorganitelor celulare (mitocondriile, aparatul Golgi, lizozomii, nucleul). Partea rămasă, reprezentând 20% din greutatea corpului (150-250 mL/kg) formează compartimentul hidric extracelular (Fluide Extracelulare = FEC), împărțit în trei fracțiuni: compartimentul interstițial sau intercelular (14%), compartimentul intravascular - volumul sanguin fluid și volumul limfatic (5%), respectiv apa paracelulară (sau transcelulară ~ 2%) - lichidul cefalorahidian, conținutul tractului digestiv și genito-urinar. Apa prezentă în circulație influențează în mod substanțial volemia,



Apa totală = ~60% din greutatea organismului

**Figura 2.1 Repartizarea compartimentelor hidrice și a principalilor electroliți în organism**

adică volumul plasmatic. Repartiția apei și a principalilor cationi în compartimentele hidrice din organism, precum și raporturile procentuale ale acestora, sunt prezentate în Figura 2.1.

Conținutul în apă al diferitelor țesuturi și organe diferă semnificativ: țesutul nervos conține aproximativ 90% apă, în timp ce țesutul adipos are mai puțin de 10%.

Volumul plasmatic poate fi determinat prin analiza gradului de diluție în plasma circulantă a unui colorant macromolecular (albastru Evans), sau a albuminei umane marcate cu iod radioactiv. Volumul spațiului interstițial poate fi determinat prin analiza gradului de diluție în plasma circulantă ale unor substanțe neutre (ca inulina, manitolul și tiosulfatii), care deși părăsesc circulația, nu pot pătrunde în celule. Pentru determinarea volumului total al apei din organism se folosesc substanțe care traversează liber membranele celulelor, de exemplu apa grea ( $\text{D}_2\text{O}$  sau  $\text{T}_2\text{O}$ ). Deși volumul intracelular nu poate fi determinat în mod direct, poate fi calculat prin scăderea volumului extracelular din valoarea volumului hidric total.

### 2.2.2. DISTRIBUȚIA ELECTROLIȚILOR

Cantitatea sodiului din organism este de aproximativ 3700 mmol, din care 25% se află sub formă complexată în oase, iar 75% este supus schimburilor libere între lichidul intracelular (10 mmol/L) și extracelular (140 mmol/L).

Potasiul este distribuit predominant intracelular (150 mmol/L) și mai puțin extracelular (4 mmol/L).

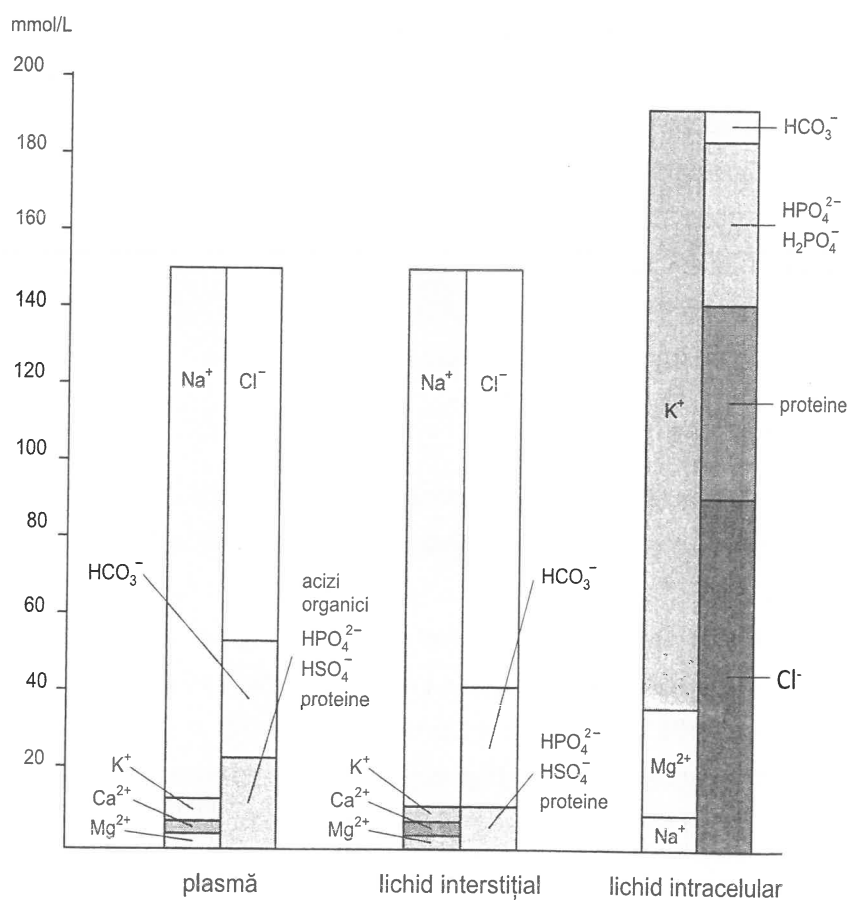
În orice compartiment hidric din organism este valabilă legea electroneutralității: diferențele care apar în Tabelul 2.1 între sumele concentrațiilor cationilor și anionilor, se datorează acizilor organici care formează lacuna anionică.

Mișcarea spontană a acestor cationi are loc în sensul gradientului de concentrație, astfel sodiul are tendința de a pătrunde în compartimentul intracelular, iar potasiul iese pasiv în spațiul extracelular. Menținerea gradientului de concentrație între cele două compartimente se realizează prin mecanism activ, cu ajutorul unei pompe ionice,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATP-aza.

Concentrațiile exprimate în mmol/L ale electroliților și proteinelor din plasmă, lichidul interstițial și celule, sunt reprezentate grafic în *Figura 2.2* (Diagrama Gamble) și cifric în *Tabelul 2.1*.

**Tabelul 2.1** Concentrația medie a electroliților (mmol/L) și a proteinelor în plasmă, lichid interstițial și în interiorul celulelor

Componenți	Plasmă sanguină	Lichid interstițial	Celule
<b>Cationi:</b>			
Na <sup>+</sup>	140	140	10
K <sup>+</sup>	4	4	150
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2	1
Mg <sup>2+</sup>	1	1	20
Total cationi:	147,5	143	181
<b>Anioni:</b>			
Cl <sup>-</sup>	100	100	10
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25	25	16
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2	2	100
HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1	1	20
Anioni organici	18,7	14,9	20
Proteine	0,8	0,1	15
Total anioni:	147,5	143	181



**Figura 2.2** Diagrama lui Gamble pentru spațiile celular, interstițial și plasmatic

Compoziția diverselor lichide biologice în principalii electroliți este redată în *Tabelul 2.II*. Este posibil să se anticipeze tipul dezechilibrului hidro-electrolitic, după tipul de lichid biologic pierdut excesiv: pierderea de fluide cu compoziție în electroliți similară cu cea a plasmei, reprezintă deshidratări cu valori normale de concentrație ale electroliților în plasmă; dacă conținutul în sodiu al fluidului pierdut este mai mic decât al plasmei (de exemplu în transpirație excesivă), deshidratarea se asociază cu hipernatremie; pierderea de fluide intestinale, bogate în potasiu, conduce la deshidratare cu hipokaliemie, fără să afecteze semnificativ natremia.

**Tabelul 2.II Concentrația medie a principalilor electroliți în diverse lichide biologice (mmol/L)**

Lichid/Ioni	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>
Plasma	140	4	25	100
Suc gastric	60	15	0-15	55
Suc intestinal	140	10	variabil	70
Scaun diareic	50-140	30-70	20-80	variabil
Bila, lichid peritoneal	140	5	40	100
Transpirație	12	10	-	12

## 2.3 PROPRIETĂȚILE APEI

Prezența ubicuitară a apei în organisme vii, precum și participarea sa la toate fenomenele vieții, poate fi explicată prin următoarele proprietăți:

- Prin caracterul său polar/dipolic, apa reprezintă un mediu ideal, atât pentru dizolvarea substanțelor polare care nu ionizează și a celor electrolitice, cât și pentru disocierea electrolitică a celor din urmă. Apa se mișcă liber prin porii membranelor biologice semipermeabile, contribuind la instalarea osmozei.
- Datorită căldurii specifice mari, la încălzire apa absoarbe lent cantități mari de căldură și le eliberează la fel de lent în cursul răcirii - aspect important în menținerea homeotermiei organismelor superioare.

### 2.3.1 CARACTERUL POLAR AL APEI - APA CA SOLVENT

Apa este una dintre substanțele anorganice cu structură simplă, moleculele sale fiind formate dintr-un singur atom de oxigen, cuplat prin legături covalente cu doi atomi de hidrogen. Din punct de vedere electrostatic, moleculele de apă sunt neutre. Deși moleculele de apă nu dispun de sarcini electrice libere, dispun de un câmp electric, cu intensitatea de 10-18 Coulomb/cm. Această forță electrostatică este creată de așezarea asimetrică a celor 3 atomi în moleculă. Legăturile covalente dintre oxigen și cei doi atomi de hidrogen formează un unghi de 104.5°. Ca urmare, repartiția electronilor în molecule devine inegală: densitatea electronilor va fi mai mare la polul oxigenului și mult mai mică la polul celor doi atomi de hidrogen, moleculele astfel polarizate numindu-se dipoli. Datorită caracterului său dipolic, apa este un solvent ideal pentru substanțele polare. Moleculele de apă se orientează cu

polul lor negativ spre polul pozitiv al moleculei/ ionului învecinat și invers. Substanțele apolare (grăsimile, lipidele) sunt insolubile în apă și formează emulsii apoase numai în prezența unor detergenți amfipatici.

### 2.3.2 CĂLDURA SPECIFICĂ A APEI

În cazul în care moleculele de apă învecinate se găsesc suficient de aproape (la o distanță maximă de  $0,28 \text{ nm} = 2,8 \text{ \AA}$ ), între ele se pot forma punți de hidrogen. Această orientare ordonată a ansamblului moleculelor de apă este cu atât mai constantă, cu cât temperatura mediului este mai mică. La o temperatură sub  $0^\circ\text{C}$ , toți atomii de hidrogen sunt legați prin punți de hidrogen. Din această cauză fiecare atom de oxigen, fixează prin legături de hidrogen încă 4 molecule de apă, cu apariția unei structuri hexagonale caracteristice. Din cauza spațiului închis în mijlocul structurii, volumul gheții este cu 11% mai mare decât volumul apei lichide. Este cunoscut faptul că densitatea apei este maximă la temperatura de  $+4^\circ\text{C}$  și că aceasta are o importanță fundamentală pentru animalele acvatice. La temperatura de  $40^\circ\text{C}$  aproximativ 50% din legăturile de hidrogen intermoleculare se descompun și apa va fi "mai fluidă". Această temperatură reprezintă "cel de-al doilea punct de topire al apei", care este (poate nu întâmplător) foarte aproape de temperatura optimă la care se desfășoară fenomenele vitale în organismele superioare.

## 2.4 SCHIMBURILE HIDRODINAMICE. FORȚELE CARE COORDONEAZĂ MIȘCAREA APEI ȘI ELECTROLIȚILOR ÎNTRE COMPARTIMENTE

Apa difuzează liber prin membranele celor mai multe celule, însă mișcarea electrolitilor și a moleculelor neutre este restricționată. Distribuția apei între compartimentele hidrice este controlată de factori fizici, în particular de conținutul în substanțe dizolvate și de presiunea hidrostatică din vase.

### 2.4.1 DIFUZIUNEA ȘI OSMOZA

Distribuția apei între mediul intracelular și extracelular este determinată de forțele osmotice. Osmolaritatea este expresia conținutului de substanțe dizolvate într-un volum de solvent dat. Dacă două soluții cu concentrații diferite sunt separate între ele printr-o membrană semipermeabilă (permeabilă doar pentru moleculele solventului), moleculele solventului vor trece dinspre compartimentul mai diluat spre acela mai concentrat până când presiunea osmotică, respectiv concentrația celor două compartimente se egalizează. Presiunea osmotică este presiunea care trebuie aplicată unei soluții separate de solventul său printr-o membrană semipermeabilă pentru ca solventul să fie împiedicat să treacă în soluție. La temperatura constantă de  $0^\circ\text{C}$  (273 Kelvin) și la presiunea exterioară de 1 bar, valoarea presiunii osmotice a unei soluții cu concentrația de 1 mol/L este de 22,41 bar (1 osmol/kg). Efectul osmotic al unei substanțe dizolvate este determinat de numărul de particule din soluție (mol/L) și nu de concentrația procentuală de masă sau de volum: un litru de soluție cu activitatea osmolară de un osmol, conține un număr de  $6,023 \times 10^{23}$  particule dizolvate (numărul lui Avogadro). În

cursul dizolvării, moleculele de apă și particulele substanțelor dizolvate intră în interacțiuni multiple, din care cauză proprietățile soluțiilor se deosebesc de cele ale solventului pur. Presiunea vaporilor soluțiilor este întotdeauna mai mică decât cea a solventului pur. Această scădere este direct proporțională cu concentrația molară a substanțelor dizolvate, din care cauză temperatura de fierbere va fi mai mare și cea de congelare va fi mai mică, decât cele ale solventului pur: o soluție apoasă cu concentrația de 1 mol/L are punctul ebulioscopic la  $+100,52^{\circ}\text{C}$  și punctul crioscopic la  $-1,85^{\circ}\text{C}$ . În contrast cu soluțiile neelectrolitice (glucoză, ureea), soluțiile apoase ale electrolitilor vor prezenta valori crioscopice sau ebulioscopice de mai multe ori mai mari, decât cele calculate. De exemplu, punctul crioscopic al unei soluții de NaCl 1 mol/L este de  $-3,7^{\circ}\text{C}$  în loc de  $-1,85^{\circ}\text{C}$ , datorită numărului dublu de particule prezente în soluție: în cursul dizolvării NaCl disociază electrolitic, ionii componenți izolându-se prin învelișul hidratant, format în jurul lor de stratul dipolilor de apă.

Substanțele cu masă atomică / moleculară mică ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , glucoza, ureea) au un aport substanțial (90%) în determinarea presiunii osmotice plasmatice, comparativ cu substanțele cu masă moleculară mare (cum ar fi de exemplu proteinele). Substanțele care disociază electrolitic la pH fiziologic vor forma o cantitate de particule corespunzătoare numărului de ioni din care este alcătuită substanța respectivă.

Se utilizează osmolalitatea în aprecierea conținutului în substanțe dizolvate (exprimată în mmol/kg soluție). Osmolalitatea plasmei este de aproximativ 285-310 mmol/kg, realizând o presiune osmotică de 285-310 mOsm/kg. Osmolalitatea plasmei este dată practic de ioni și moleculele mici, astfel încât în lipsa ebulioscopului sau crioscopului, din concentrația plasmatică – exprimată în mmol/L - a unor compuși osmotici activi (glucoza,  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$ ), poate fi calculată o valoare a osmolalității destul de apropiată de cea reală, cu ajutorul formulei:

$$2([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) + [\text{Glucoză}]/18 + [\text{Uree}]/6$$

Dublarea sumei cationilor se face pentru a lua în considerare ionii  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  și ceilalți anioni asociați. Discrepanțe semnificative (lacuna osmolară) apar în situații patologice în care specii osmotice active, nefiziologice ajung în circulație (în diverse intoxicații de exemplu), dar și în hiperlipidemii și hiperproteinemii severe.

Deși ureea (prin concentrația molară asemănătoare cu a glucozei) are un aport semnificativ la osmolalitatea mediului extracelular, tonicitatea (osmolalitatea efectivă, care influențează schimburile hidrice între compartimente) nu este afectată de concentrația acesteia, deoarece ureea difuzează în egală măsură intra- și extracelular (concentrația fiind egală în cele două spații).

$$\text{Tonicitatea} = \text{Osmolalitate} - [\text{Uree}]/6$$

Dacă osmolalitatea urinei primare este identică cu cea a plasmei, osmolalitatea urinei definitive variază de la 80-1200 mmol/L, funcțiile de absorbție și secreție tubulare, fiind esențiale pentru compoziția finală a urinei.

### 2.4.2 PRESIUNEA COLOID-OSMOTICĂ (ONCOTICĂ)

Presiunea oncotică se datorează prezenței într-un compartiment lichidian a substanțelor macromoleculare (proteice), care spre deosebire de ioni și molecule de apă, nu traversează membranele celulare și capilarele sanguine (decât într-o măsură foarte mică și în condiții particulare). Având masa moleculară mare, ele nu contribuie la osmolalitate decât într-o măsură nesemnificativă, dar prin faptul că rămân în vasele de sânge, dețin un rol important în distribuția fluidelor între spațiul intravascular și cel interstițial. Presiunea oncotică plasmatică este de 22-27 mmHg.

### 2.4.3 PRESIUNEA HIDROSTATICĂ

Presiunea hidrostatică este presiunea din vasele sanguine, rezultat al presiunii mecanice generate de cord. În arterele mari această presiune este aproximativ 100 mmHg, scăzând până la capătul arteriolar al capilarelor la 35 mmHg, iar la nivelul capătului venos al capilarelor este de 15 mmHg. Endoteliul capilarelor se prezintă ca un tub continuu, cu numeroase canale intercelulare, permeabile pentru apă și electroliți. Presiunea efectivă de filtrare în vase este egală cu diferența între presiunea hidrostatică și presiunea osmotică, aceasta fiind contrabalansată de suma presiunii hidrostatice și osmotice interstițiale. Având în vedere valoarea presiunii efective de filtrare în cele două compartimente, la capătul arterial al capilarelor, apa și electroliții părăsesc vasul spre interstițiu, iar la capătul venos al capilarelor apa și electroliții se întorc în vas. O parte din lichidul interstițial se întoarce pe cale limfatică.

Lichidul tisular sau interstițial formează acea parte a compartimentelor de apă care se situează în afara celulelor, dar și a circulației sanguine. Deși circulă în sisteme proprii, limfa este încadrată la acest compartiment. Lichidul interstițial este despărțit de plasma sanguină prin peretele endotelial al capilarelor. Celulele endoteliale sunt fixate între ele printr-o rețea glicoproteică formată de adevărate cupluri. Cuplarea celulelor endoteliale este însă discontinuă, deoarece între ele apar niște orificii cu diametrul între 3,0 – 4,5 nm (30 - 45 Å). Din această cauză peretele capilar se comportă ca o membrană poroasă. În mediu apos, schimburile de substanțe prin porii unor asemenea membrane se pot manifesta atât printr-un schimb hidrodinamic al lichidelor din compartimente, cât și printr-o difuziune simplă, fără modificarea volumului. Ambele forme au la bază două mecanisme deosebite:

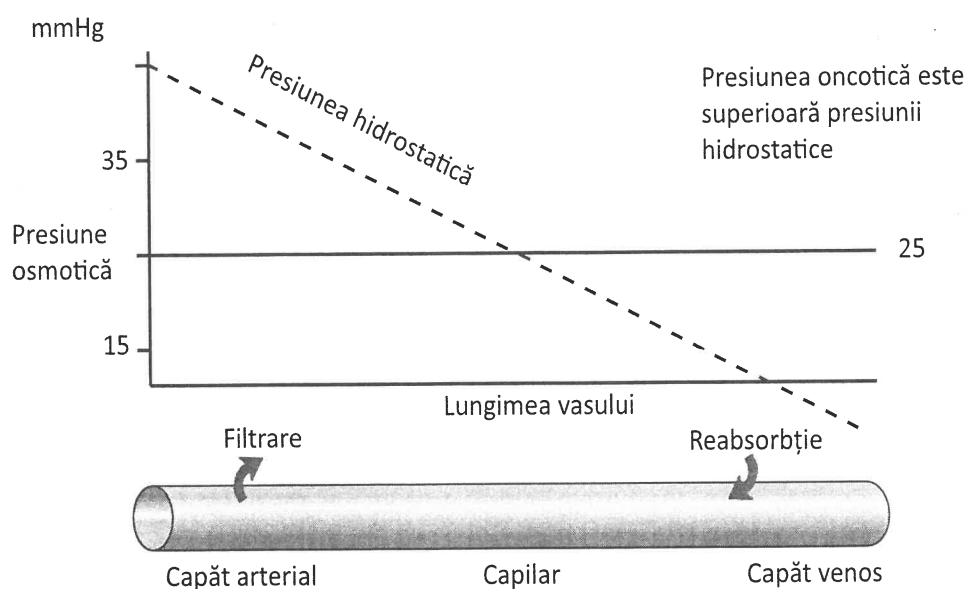
- Moleculele substanțelor liposolubile și ale gazelor moleculare (oxigenul, bioxidul de carbon) traversează în mod direct / liber membrana;
- Moleculele de apă, electroliții și neelectroliții polari ajung în lichidul interstițial, respectiv înapoi în plasmă, prin traversarea porilor interendoteliali.

Membranele lipidice dispun de numeroși pori permeabili pentru apă (cu dimensiunea de 0,7 nm), astfel modificările osmolarității mediului intra- sau extracelular se repercutează asupra conținutului în apă și al volumului celular.

În cazul unui schimb hidrodinamic, cele două compartimente hidrice sunt despărțite de o membrană poroasă, permeabilă atât pentru apă, cât și pentru substanțele micromoleculare dizolvate. În cazul în care diametrul porilor este suficient de mare (peste 3 nm),

deplasarea apei și a substanțelor dizolvate are loc pe baza gradientelor de concentrație, iar dacă într-unul din cele două compartimente se manifestă o presiune hidrostatică, aceasta forțează deplasarea soluției cu toți componenții săi. Dacă microporii au diametrul mai mic de 3 nm, traversarea acestora de către proteinele din soluție va fi împiedicată de măsura dimensiunilor lor moleculare. Între cele două compartimente se va stabili astfel un gradient proteinic și concomitent unul coloid-osmotic. Tot din cauza acestei difuziuni împiedicate, similară filtrării, concentrația proteinelor din lichidele tisulare este substanțial mai mică (10-15 g/L), decât în plasmă (60-80 g/L).

Presiunea coloid-osmotică este relativ constantă în toată plasma circulantă, având valoarea normală de aproximativ 25 mmHg. În partea arterială a capilarelor, presiunea sistemică determină filtrarea din plasmă în țesuturi a unei cantități definite de lichid și substanțe dizolvate. Spre porțiunea venoasă însă, presiunea sistemică scade sub valoarea presiunii coloid-osmotice. Ieșind de sub suprimare, aceasta din urmă va realiza redifuziunea în plasmă a apei și a substanțelor dizolvate. În urma creșterii presiunii sistemice filtrante (stază) sau a scăderii presiunii coloid-osmotice (hipoproteinemie) se produc edemele. Desfășurarea schimburilor hidro dinamice între plasma sanguină și lichidul tisular, în funcție de raportul dintre presiunea sistemică și cea coloid-osmotică, este prezentată în *Figura 2.3*.



**Figura 2.3 Schimburile hidro dinamice între plasmă și lichidul interstițial (Starling)**

Difuziunea moleculelor de apă și de substanțe dizolvate are la bază mișcarea termică a acestora, ele tinzând să umple în întregime spațiul disponibil. Din această cauză, difuziunea are loc totdeauna în sensul stabilit de gradientul de concentrație.

Desfășurarea continuă a schimburilor de apă și de substanțe micromoleculare între două compartimente nu se oprește în urma stabilirii stării de echilibru. Din momentul echilibrării reciproce a gradientelor de concentrație, se stabilește o stare staționară aparentă, dar pe baza unui echilibru dinamic, caracterizat prin realizarea în ambele sensuri și în egală măsura a schimburilor.

Ținând cont de volumul plasmatic relativ redus (1650 mL), în acest compartiment creșterea volumului și scăderea osmolarității (hipervolemie hipoosmotică) ar fi posibile chiar și în urma unui consum moderat de lichide. Compartimentele hidrice sunt însă delimitate între ele prin membrane poroase, ceea ce face ca echilibrarea prin difuziune a volumelor de apă și a concentrațiilor de substanțe să aibă loc continuu între ele. Astfel, cantitățile de apă, de electroliți și neelectroliți de dimensiune mică, nu se distribuie numai în volumul plasmatic, ci și în spațiul interstițial (acesta din urmă, având volumul total de 8-10 ori mai mare decât al plasmăi). Acest volum este numit și “volumul prerenal”, deoarece depozitează temporar (dar imediat) cantități considerabile de apă și substanțe dizolvate, până la excreția definitivă renală a acestora.

În concluzie, schimburile care au loc la nivelul capilarelor, între plasmă și interstițiu, sunt influențate de:

- diferențele de presiune osmotică și coloid-osmotică între plasmă și lichidul interstițial;
- presiunea hidrostatică a sângelui capilar;
- drenajul limfatic;
- tensiunea în țesuturi - aceasta fiind mai mare la nivelul musculaturii și țesutului interstițial palmar, aici nu se formează edeme; în schimb tensiunea fiind scăzută la nivelul gleznelor și pleoapelor, aceste regiuni sunt locurile predilecte pentru formarea edemelor.
- permeabilitatea capilară – măduva osoasă și ficatul conțin capilare fără membrană bazală, cu spații largi interendoteliale.

Schimburile între lichidul interstițial și lichidul intracelular depind de:

- integritatea membranei celulare;
  - forțele osmotice și electrochimice;
  - permeabilitatea selectivă pentru ioni, tendința de migrare a acestora fiind în sensul gradientului de concentrație (de la concentrația mai mare spre cea mai mică).
- Menținerea homeostaziei celulare presupune menținerea unui gradient electrochimic între spațiul intra- și extracelular, realizat în special cu ajutorul pompei de  $\text{Na}^+$ .

## 2.5 HOMEOSTAZIA SODIULUI ȘI APEI

La animalele superioare menținerea homeostaziei, adică a volumului și compoziției constante a mediului intern, este asigurată prin funcționarea unor mecanisme de reglare complicate și organizate pe nivele multiple. Aceste mecanisme mențin:

- izovolemia, adică volumul optim al lichidelor din organism;
- izoosmoza și izoionia sau cantitatea optimă a neelectroliților și electroliților cu molecularitate redusă;
- izohidria, adică reacția (aciditatea, concentrația ionilor de  $\text{H}^+$ ) normală a mediului.

Izoosmoza reprezintă una din condițiile de bază ale păstrării integrității biostructurilor. Într-un mediu hiperosmotic, celulele cedează apa spre exterior și pierd volum. În medii hipoosmotice însă, din cauza pătrunderii excesive a apei în interiorul lor, se balonează, chiar

până la citoliză. Soluția izoosmotică de (NaCl) conține 9 g sare la un litru, adică câte 154 mmol/L de  $\text{Na}^+$  și tot atât de  $\text{Cl}^-$ ; această soluție are punctul crioscopic de  $-0,56^\circ\text{C}$ , osmolaritatea de 302,6 mosm/L.

Stabilitatea mediului intern presupune constanța activității osmotice (osmolarității) și a volumului plasmatic (izovolemia). În cursul schimburilor hidrodinamice patologice, acești parametri se pot modifica atât în sensul scăderii, cât și al creșterii lor, fenomene care afectează profund stabilitatea structurilor celulare și subcelulare, precum și activitatea numeroaselor sisteme enzimatice de care depinde metabolismul organismului.

### **2.5.1 CONTROLUL HOMEOSTAZIEI SODIULUI - CONSERVAREA SĂRURILOR**

Aportul alimentar de sodiu este foarte variabil (2-15 g  $\text{Na}^+$ /zi), reglarea homeostaziei realizându-se la nivelul eliminării acestuia din organism; sodiul se elimină pe următoarele căi:

- 95% - renală, cantitatea eliminată fiind sub controlul aldosteronului,
- 4,5% - prin fecale și
- 0,5% - prin transpirație.

#### **2.5.1.1 Controlul renal al homeostaziei sodiului – sodiul și volumul lichidului extracelular**

Zilnic sunt filtrați 20000 - 30000 mmol de sodiu, din care doar 100 - 200 mmol ajung în urina finală, adică doar 1% din cantitatea filtrată.

În tubul contort proximal, 70% din  $\text{Na}^+$  filtrat se absoarbe activ, prin canale ionice specifice (la schimb cu protoni) și în cotransport cu glucoza, aminoacizii, unii anioni (fosfați,  $\text{Cl}^-$  și mai puțin  $\text{HCO}_3^-$ ) paralel cu absorbția pasivă a apei. Rata de filtrare glomerulară (care depinde de presiunea hidrostatică și oncotică) influențează la acest nivel reabsorbția de sodiu. Conținutul în substanțe dizolvate neabsorbite (de exemplu manitolul) sau în exces (glucoză, corpi cetonici) influențează reabsorbția de sodiu, reținând apa în tub. Prin acest mecanism apare poliuria datorită diurezei osmotice în cetoacidoza diabetică.

În ansa ascendentă a tubului Henle, 25% din  $\text{Na}^+$  filtrat se absoarbe activ, fără apă; lichidul care părăsește această zonă este hipoton. Se crează un gradient osmotic în interstițiul renal, care crește dinspre corticală spre medulară (la nivelul medularei acesta poate ajunge la 200-1000 mOsm/L) și asigură absorbția apei în tubii colectori.

În tubul contort distal, 4 - 4,5% din  $\text{Na}^+$  filtrat se reabsoarbe, la schimb cu  $\text{K}^+$  și  $\text{H}^+$ , acest proces fiind controlat de aldosteron. Acest segment este responsabil de echilibrul final al sodiului în organism și prin reglarea conținutului în apă al compartimentului circulant, reglează presiunea sanguină.

#### **2.5.1.2 Sistemul Renină - Angiotensină – Aldosteron (SRAA)**

Aldosteronul este un hormon produs în zona glomerulară a corticosuprarenalei, secreția lui fiind controlată de sistemul renină-angiotensină. Este responsabil de reglarea volumului lichidian al spațiului extracelular și controlează homeostazia potasiului.

Rinichii participă la osmoreglare printr-un mecanism propriu. Aparatul juxtaglomerular este situat în apropierea glomerulilor (între arteriolele aferentă, eferentă și porțiunea inițială a tubului contort distal), fiind format dintr-un ansamblu de celule musculare netede transformate în peretele vaselor preglomerulare (celule juxtaglomerulare) și celule epiteliale mai dense (macula densa) din peretele tubular distal. Aceste celule dispun de receptori sensibili față de modificările presiunii sanguine și osmolarității lichidului care trece prin tubul urinifer. Celulele juxtaglomerulare sintetizează și depozitează în citoplasma lor, sub formă de granule, o enzimă proteolitică numită renină. În cazul scăderii irigației sanguine renale sau a conținutului în sodiu al tubului contort distal, renina se eliberează prin degranulare. Această protează descompune o  $\alpha$ -2-glicoproteină plasmatică (de origine hepatică), numită angiotensinogen (alcătuită din mai mult de 400 Aa, cu greutate moleculară variabilă, însă), cu eliberarea unui decapeptid, numit angiotensină-I. Aceasta este încă inactivă, dar sub acțiunea unei alte peptidaze produse în vasele pulmonare, numită angiotensinază sau convertază (Angiotensin Converting Enzyme, ACE), prin eliberarea proteolitică a doi aminoacizi terminali, se transformă într-un octapeptid, numit angiotensină-II (AT II), care este purtătorul de semnal propriu-zis al sistemului osmoreglator.

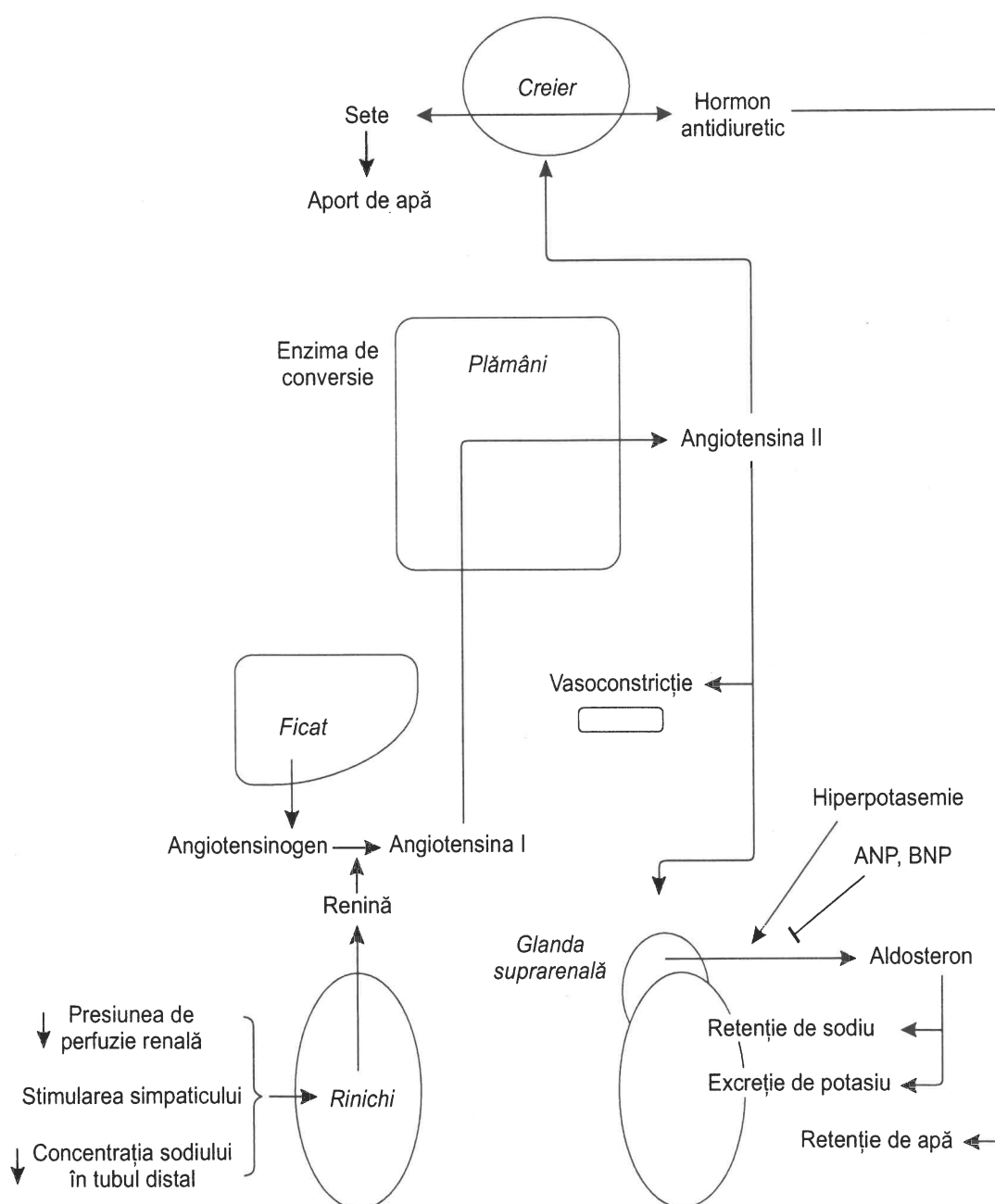
Acțiunea vasoconstrictoare a angiotensinei-II se manifestă pe de o parte la nivelul pereților arteriolelor precapilare, ducând la creșterea marcată și generalizată a presiunii arteriale sistemice. Acest lucru se realizează prin intermediul receptorilor membranari AT 1 R, care transmit semnalul prin proteinele G și fosfolipaza C; DAG și IP3 eliberate duc la mobilizarea  $\text{Ca}_2^+$  din reticulul sarcoplasmic, inițiind astfel răspunsul contractil al musculaturii netede vasculare (complexul calmodulină –  $4 \text{Ca}_2^+$  activează kinaza lanțurilor de miozină ușoară, care fosforilează lanțurile ușoare de miozină și crește tonusul musculaturii netede vasculare). AT II se formează și la nivel renal (celulele endoteliale glomerulare, dar și cele tubulare, produc ACE), unde influențează reabsorbția tubulară și tonusul vascular renal printr-o acțiune auto- și paracrină.

Pe de altă parte, AT II stimulează puternic producția de aldosteron în celulele zonei glomerulare a corticosuprarenalei. Prin creșterea reabsorbției sodiului și a excreției potasiului la nivelul tubilor renali distali și colectori, acest hormon produce o hipersodemie și o hipopotasemie marcată. Celulele producătoare de aldosteron, recepționează direct modificările concentrației sanguine a sodiului. În urma scăderii acesteia crește imediat producția de aldosteron, care acționează în special la nivelul celulelor tubulare renale distale și a celulelor din tubii colectori, prin fixarea pe un receptor citosolic, care se deplasează în interiorul nucleului celular, afectând expresia unor gene responsabile de activitatea proteinelor canal de sodiu și a ATP-azei  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Consecința este creșterea retenției tubulare a sodiului, ceea ce conduce la corectarea hipoosmozei. Reabsorbția tubulară a sodiului este urmată în mod pasiv de reabsorbția cantităților echivalente de ioni de clorură, care, fiind puternic hidratați, aduc în circulație cantități considerabile de apă, din care cauză va crește și volumul plasmatic. Concentrația plasmatică bazală a aldosteronului se situează în intervalul 0,05-0,15 mg/L, iar timpul de înjumătățire plasmatic este de 3-6 ore, inactivarea realizându-se la nivel hepatic.

AT II are un timp de înjumătățire plasmatic foarte scurt (1-2 minute), pe lângă efectul hipertensiv imediat, având și un efect de stimulare directă a secreției de hormon antidiuretic (ADH) și aldosteron.

În ciuda efectelor sale vasoconstrictoare puternice, se pare că rolul fiziologic primordial al sistemului renină - angiotensină constă totuși în reglarea volemiei și a osmolarității plasmatice, prin acțiunile cunoscute ale aldosteronului, manifestate la nivelul tubilor renali distali. Schema funcționării sistemului renină - angiotensină - aldosteron și relația cu homeostazia apei, sunt prezentate în *Figura 2.4*.

La pacienții cu insuficiență cortico-suprarenală la care se administrează terapie de substituție cu doze fixe de mineralocorticoizi, homeostazia sodiului este păstrată, ceea ce a condus



**Figura 2.4** Sistemul Renină-Angiotensină-Aldosteron

la concluzia că reabsorbția sodiului este influențată și de alți factori decât aldosteronul, cum ar fi familia peptidelor natriuretice, implicată în reglarea volumului intravascular al fluidelor. Peptidul natriuretic atrial (ANP), oligopeptid produs în pereții atriilor ca răspuns la distensie (expansiune a volumului lichidului extracelular) inițial sub formă de pro-ANP (126 aminoacizi), este activat prin două scindări proteolitice la forma activă ANP (28 Aa). Are ca principal efect intensificarea eliminării de sodiu prin scăderea reabsorbției tubulare distale a acestuia, inhibarea secreției de renină și în ultimă instanță de aldosteron; antagonizează de asemenea efectul presor al noradrenalinei și AT II. Peptidul natriuretic cerebral (BNP) este sintetizat în cantitate însemnată în special în pereții ventriculilor cardiaci, ca răspuns la supraîncărcarea de volum. Este produs inițial sub formă inactivă pro-BNP (108 Aa), iar ulterior prin două scindări proteolitice rezultă forma activă a peptidului (32 Aa), a cărei mesaj natriuretic se transmite prin intermediul unor receptori A sau NPR1 (în celulele endoteliale) și B sau NPR2 (în creier). Concentrația serică a BNP crește în insuficiența cardiacă, fiind un important element de diagnostic diferențial cu dispneea de alte cauze. Peptidul natriuretic de tip C (CNP) este prezent în concentrații mari în endoteliul vascular și este un vasodilatator, iar receptorul de tip C (sau NPR3) este implicat în clearance-ul peptidului.

### 2.5.2 CONTROLUL HOMEOSTAZIEI APEI – REGLAREA OSMOLARITĂȚII LICHIDULUI EXTRACELULAR

La persoanele sănătoase de obicei aportul hidric este excedentar necesităților, excesul fiind eliminat pe cale renală. Pierderile prin transpirație, respirație, fecale, sunt considerate minore, totuși trebuie luate în considerație mai ales în anumite circumstanțe (diaree, mediu cald și umed) – Tabelul 2.III.

**Tabelul 2.III Bilanțul hidric zilnic în condiții ambientale normale / blânde**

Pierderi prin:		Câștig din:	
Piele	200 mL	Metabolism oxidativ	400 mL
Plămâni	400 mL	Aport minim prin dietă	1100 mL
Digestive	100 mL		
Renale	800 mL		
<b>Total:</b>	<b>1500 mL</b>	<b>Total:</b>	<b>1500 mL</b>

Filtratul glomerular este de 200 l de apă pe zi, din care 80% se reabsoarbe împreună cu  $\text{Na}^+$  în tubul contort proximal; restul (19,5%) se absoarbe în tubii colectori sub acțiunea ADH (adiuretina – ADH sau Arginin Vasopresina - AVP), iar 1-2 litri se elimină.

Din cauza capacității sale strâns determinate de limitele funcționale renale, mecanismul conservării apei poate asigura echilibrarea devierilor volemiei și osmolarității plasmei numai până la o anumită limită. Pentru funcționarea optimă a mecanismului este necesar un aport zilnic suficient de apă. Cantitatea minimă de lichid eliminată la nivel renal este de 500 mL/zi. Această cantitate este volumul hidric necesar pentru eliminarea renală (la capacitatea

maximă de concentrare renală: 1200 mmol/L) a produșilor de metabolism hidrosolubili rezultați zilnic.

Reglarea homeostaziei apei este dublă:

- la nivelul aportului prin mecanismul setei;
- la nivelul eliminării renale prin intermediul receptorilor pentru ADH (hormon antidiuretic - nonapeptid).

Modificarea conținutului în apă al organismului, independent de conținutul în substanțe dizolvate, va duce la modificarea osmolarității. Creșterea osmolarității fluidului extracelular peste 282 mOsm/L produce:

- deplasarea apei din mediul intracelular spre lichidul extracelular,
- stimularea centrului setei în hipotalamus (datorită deshidratării neuronilor hipotalamici) - se manifestă prin necesitatea de a bea,
- stimularea directă a osmoreceptorilor din hipotalamus duce la sinteză și eliberare de ADH (vezi și capitolul 19.3.1).

Figura 2.5 prezintă schematic mecanismul reglării volemiei. Scăderea sub o valoare critică a volemiei sesizată de baroreceptorii aortici, carotidieni și receptorii de distensie din peretele atrial (și transmisă la hipotalamus prin intermediul nervilor IX și X) și/sau creșterea osmolarității plasmei și lichidului interstițial „sesizată” de către osmoreceptorii din neuronii

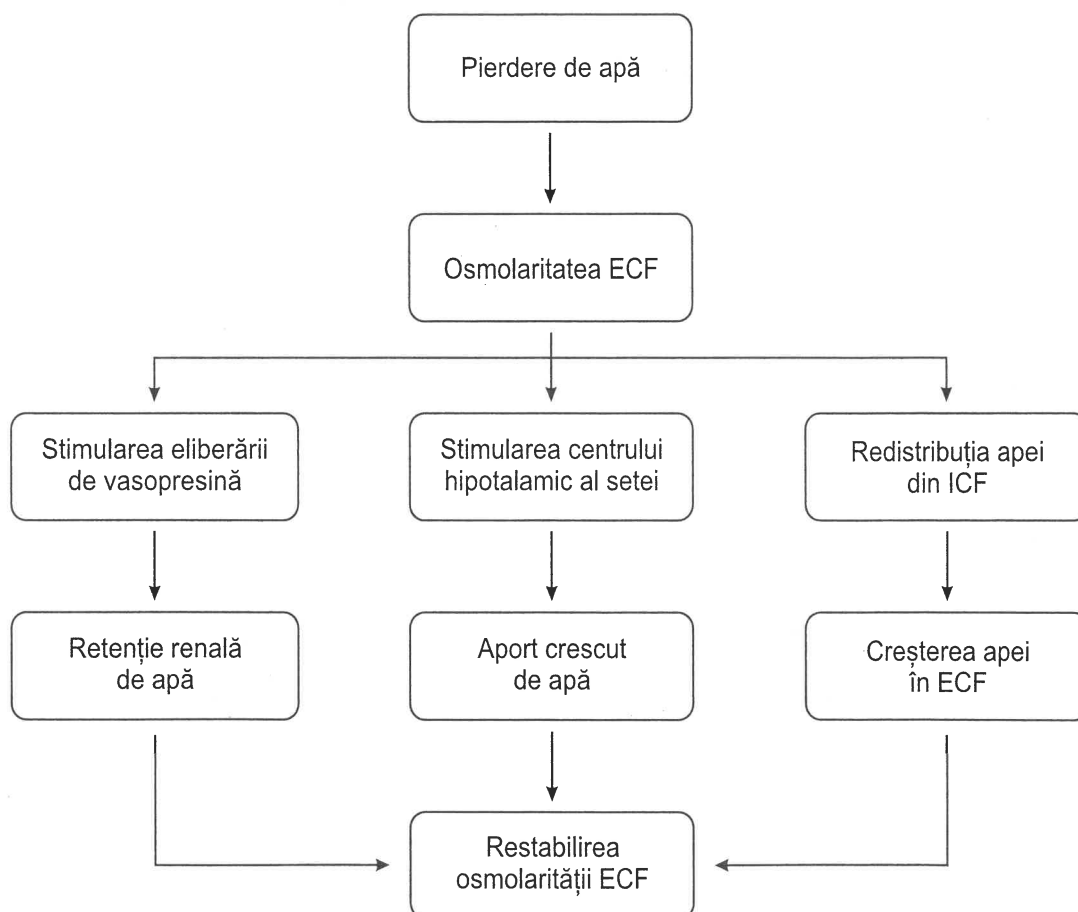


Figura 2.5 Mecanismul reglării volemiei

hipotalamici aflați în structura *Organus Vasculosus Lamina Terminalis* – OVLT, sunt factorii declanșatori ai mecanismului de reglare. Impulsurile nervoase care pornesc din OVLT înaintază spre zonele corticale senzitive, unde se manifestă senzorial (aparitia senzației de sete). În urma satisfacerii setei (consum de apă sau lichid) crește din nou volumul plasmatic, scade osmolaritatea și temporar se restabilește echilibrul între izovolemie și izoosmoză.

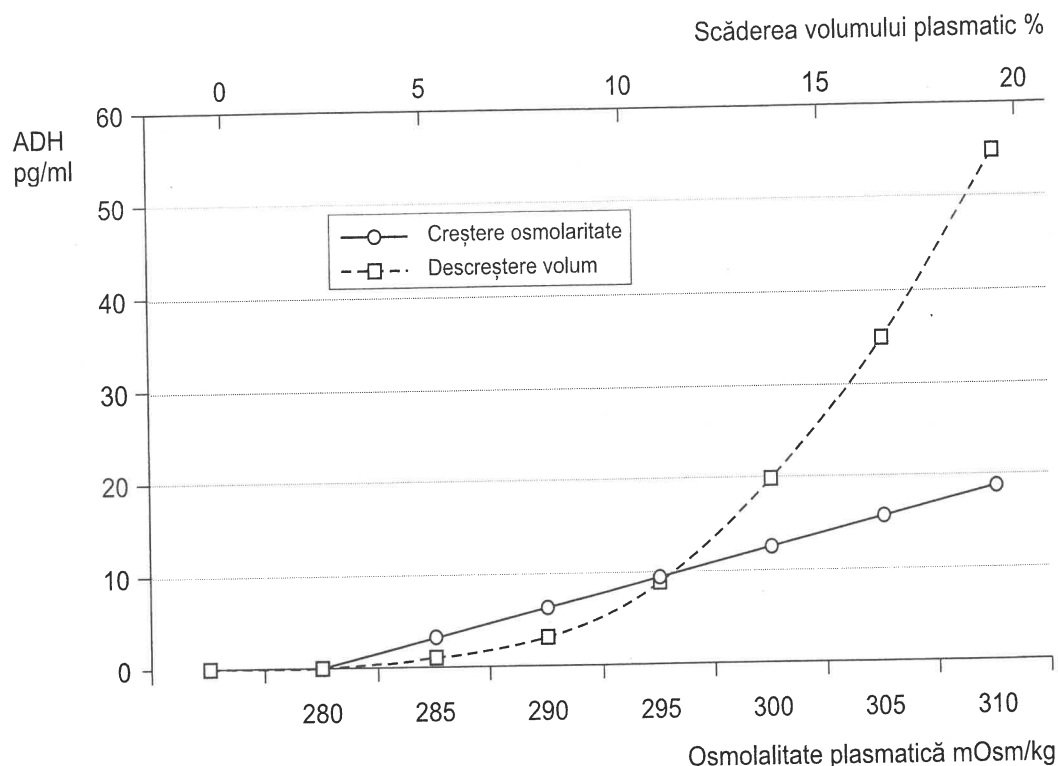
Chiar și o creștere cu 1% a osmolarității (peste 282 mOsm/L) are influență asupra hipotalamusului. Semnalele se transmit în nucleii supraoptic și paraventricular unde se produce ADH (care se depozitează ulterior în hipofiza posterioară), dar și la lobul posterior al hipofizei, unde provoacă eliberarea hormonului antidiuretic, acesta fiind depistat în plasmă. Creșterea cu 1% (~ 3 mOsm/kg) a osmolarității efective conduce la o creștere a ADH plasmatic cu 2pg/mL, ceea ce concentrează urina de trei ori (de la 200 la 600 mOsm/kg).

Dacă creșterea osmolalității plasmatice survine ca urmare a creșterii concentrației unei substanțe ce străbate liber membranele celulare (ex. ureea), osmolalitatea lichidului intracelular va crește și ea, astfel încât osmoreceptorii hipotalamici nu vor mai fi stimulați. Acțiunea ADH (legat de receptorii V2 din celulele tubulare renale) se manifestă prin creșterea permeabilității tubilor colectori (mecanism AMPc dependent – AMPc activează o proteinkinază A, care fosforilează AQP2 – aquaporine citoplasmatică care vor fi translocate membranar, rezultând o creștere a capacității de transport a apei transmembranar): apa trece în lichidul interstițial (osmolaritatea crescută în medulara renală este obținută prin “mecanismul de multiplicare în contracurent” al absorbției sodiului în ansa ascendentă a tubului Henle). Din mediul hipoosmotic intratubular, apa trece spontan (fără nici un consum energetic) în țesutul hiperosmotic interstițial, de unde pătrunde din nou în sângele vaselor recta peritubulare. Ca urmare se va elimina un volum mai mic de urină, dar mai concentrată și va crește volumul plasmatic, paralel cu scăderea consecutivă a osmolarității sale.

La concentrații mari (farmacologice, non-fiziologice), ADH se leagă și la receptorii de tip V1 din musculatura netedă vasculară, celule mezangiale și plachete, care (prin intermediul proteinelor G) activează fosfolipaza C, care eliberează IP3 și DAG din PIP2. Creșterea calciului citosolar produsă de IP3, activează protein kinaza C, care activează mai departe *myosin light chain kinaza* (MLCK) și produce contracția celulei musculare netede.

Este de remarcat că, în mod normal/ fiziologic, mecanismele de reglare sunt mai sensibile față de modificările osmolarității, hipovolemia devenind un stimul puternic pentru producerea / eliberarea de ADH doar dacă descreșterea volumului plasmatic este mai mare de 10% (*Figura 2.6*).

Dat fiind faptul că, în urma descreșterii volumului plasmatic, descrește și presiunea arterială, în reglarea volemiei sunt importante și semnalele emise de baroreceptorii (receptori sensibili la modificările presiunii sistemice) din pereții vaselor mari (aorta, carotide) și ai atriilor și transmit semnale spre centrii hipotalamici, prin intermediul nervilor IX și X. Refacerea presiunii arteriale și a conținutului în sodiu, duce la reducerea secreției ADH: arcul reflex baro-neuro-hormonal se închide cu scăderea permeabilității față de apă a pereților tubilor colectori renali. Ca urmare se va reduce și reabsorbția apei în circulație, se va elimina



**Figura 2.6** Concentrația plasmatică a ADH în funcție de volumul și osmolalitatea plasmatică

o urină voluminoasă și diluată, respectiv volumul plasmatic se va reduce paralel cu creșterea osmolarității. Factorii care influențează secreția de ADH sunt redați în *Tabelul 2.IV*.

Timpul de înjumătățire al ADH plasmatic este de 18-20 minute, inactivarea acestuia având loc la nivel hepatic și renal. Reiese că menținerea volemiei și a osmolarității optime a organismului se realizează prin funcționarea și conlucrarea unor mecanisme umorale și nervoase. Devierile osmolarității sunt compensate prin modificările corespunzătoare ale volemiei și invers.

Până în prezent au fost identificate 13 aquaporine diferite la mamifere (AQP 0-12). Insuficiența secreției de ADH, mutante ale receptorului ADH sau aquaporinei-2, pot avea ca și consecință apariția diabetului insipid nefrogen (caracterizat în principal de eliminarea masivă – 30 l/zi - a unei urini apoase și sete imperioasă).

Un deficit înăscut, destul de rar însă, este sindromul Liddle (pseudoaldosteronismul), caracterizat prin reabsorbție excesivă de sodiu și hipertensiune arterială severă, datorate unei mutații dominante a subunității beta (mai rar gama) a canalului de sodiu din tubii colectori,

**Tabelul 2.IV** Controlul secreției de vasopresină

Factori stimulatori	Inhibitori
Creșterea osmolarității LEC	Descreșterea osmolarității LEC
Hipovolemie severă (prin AT II și baroreceptorii vasculari)	Hipervolemia
Exercițiul fizic	Consum de alcool, fenitoina
Stress, durere, fumat	
Medicamente: derivați de sulfonil uree, carbamazepina, clofibrat, vincristina, analgeticele, narcoticele	

care conduce la reabsorbție excesivă a sodiului însoțită de alcaloză metabolică hipopotase-mică. De remarcat că nivelul seric al reninei și aldosteronului sunt scăzute.

### 2.5.3 DETERMINAREA STATUSULUI SODIULUI ȘI APEI

Este esențială atât evaluarea clinică, cât și cea de laborator (*Tabelul 2.V*).

**Tabelul 2.V Aspecte clinice și de laborator în pierderea preferențială de  $\text{Na}^+$  sau apă**

Pierdere de:	$\text{Na}^+$	Apă
[Na] plasmatic	N sau ↓	↑
Hematocrit	↑↑↑	N sau ușor ↑
Volum LEC	↓↓↓	N
[Uree] plasmatică	↑	N
Diureza	↓	↓↓↓
Sete	Tardiv	Precoce
Tahicardie/ hipotensiune	Precoce	Tardiv

Din punct de vedere clinic au semnificație senzația de sete, starea de hidratare a tegu-mentelor și mucoaselor (se examinează limba și se determină turgorul pielii). Se măsoară presiunea venoasă centrală (PVC) și, în caz de deshidratare severă, se constată scăderea presiunii arteriale și puls tahicardic. Se ține evidența modificării masei corporale și se notează bilanțul hidric (în urma deshidratării, apare oligurie).

Dintre determinările de laborator sunt importante nivelurile plasmatice ale  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$ . Concentrațiile lor se pot determina prin flamfotometrie, folosind ser diluat de 20 de ori (în caz de hipertrigliceridemie se vor obține valori mai mici pentru sodiu). O altă metodă prin care se poate determina concentrația cationilor este electrometria; în acest caz se lucrează din plasmă sau ser nediluat (direct), ceea ce evită artefactele rezultate din diluție. Informații importante despre starea pacientului deshidratat ne pot da valorile concentrației hemoglo-binei/ hematocritului, albuminemia, uremia, glicemia, corpii cetonici, osmolaritatea plasmei, volumul urinar/ diureza.

## 2.6 TULBURĂRI ALE METABOLISMULUI APEI ȘI SODIULUI

Volumul lichidului extracelular este direct influențat de concentrația sodiului în acest spa-țiu, aportul/ eliminarea apei fiind în sensul menținerii constante a concentrației sodiului. În general, mecanismul de control al volumului lichidului extracelular răspunde mai puțin prompt și mai puțin precis decât osmolaritatea (cu excepția pierderilor severe de lichide). Desfășurarea normală a proceselor vitale este periclitată în egală măsură, atât din cauza lipsei (hipoosmoză), cât și a excesului sărurilor (hiperosmoza). Rinichii joacă rolul fundamental în regiarea acestor parametri, cu concursul glandelor corticosuprarenale. În practica medicală apar cel mai frecvent următoarele combinații:

- a. hipovolemia izoosmotică (hemoragii);

- b. hipovolemia hiperosmotică (exicoza, pierdere de apă);
- c. hipovolemie hipoosmotică (carența, pierdere de sare) și
- d. hipervolemia izoosmotică (hiperfuncție corticosuprarenală, perfuzii excesive).

### 2.6.1 PIERDERILE COMBINATE DE APĂ ȘI SODIU

Acestea sunt cazurile cele mai frecvente. Termenul de “deshidratare” este impropriu, fiindcă înseamnă doar pierdere de volum. Caracteristicile pierderilor de apă și electroliți sunt prezentate în *Tabelul 2.VI*.

**Tabelul 2.VI Etiologia și aspecte clinice și paraclinice caracteristice pierderilor de apă și electroliți**

Cauze	Aspecte clinice și paraclinice
Creșterea eliminărilor	• Letargie
• Tegumentare: transpirații, arsuri (transpirația este hipotonă, 20-60 mOsm/L)	• Confuzie
• Gastro-intestinale: diaree, vomă, aspirații, drenaje, fistule	• Slăbiciune
• Renale: faza diuretică în necroze tubulare acute; diureză osmotică apare în DZ și în tratament cu diuretice; în boala Addison (deficit de aldosteron); în faza de uremie severă a insuficienței renale acute datorită reluării mai tardive a funcțiilor tubulare.	• Sincopă
Scăderea aportului (rar)	• Scădere în greutate
	• Corelate cu scăderea volumului circulant: tahicardie, hipotensiune, oligurie
	• Corelate cu scăderea LEC: scăderea turgorului

### 2.6.2 PIERDERI PREFERENȚIALE DE APĂ

Pierderile de apă fără pierdere concomitentă de sodiu sunt mai rare, apar de obicei când se pierd secreții sărace în electroliți (transpirația). Etiologia și aspectele clinice ale pierderilor preferențiale de apă sunt descrise în *Tabelul 2.VII*.

**Tabelul 2.VII Etiologia și aspecte clinice caracteristice pierderilor de electroliți**

Cauze	Aspecte clinice
Creșterea eliminărilor	• Sincopă
• Renale: faza diuretică după necroze tubulare acute, terapie diuretică, deficiență de mineralocorticoizi	• Confuzie
• Tegumentare: transpirații excesive, arsuri și dermatite extinse	• Slăbiciune
• Digestive: diaree, vomă, drenaje, fistule, ileus, obstrucții intestinale	• Scădere în greutate
Scăderea aportului	• Corelate cu scăderea volumului circulant (apar rapid): tahicardie, hipotensiune
• Apare de cele mai multe ori ca o consecință (prin nesuplimentare) a pierderilor excesive	• Oligurie moderată
	• Corelate cu scăderea LEC: scăderea turgorului

### 2.6.3 PIERDEREA PREFERENȚIALĂ DE SODIU

Pierderile de sodiu sunt însoțite obligatoriu de pierderi de apă, astfel scade lichidul extracelular, uneori chiar și cel intracelular. *Tabelul 2.VIII* cuprinde principalele aspecte legate de etiologia și manifestările clinice ale pierderilor de electroliți.

**Tabelul 2.VIII Etiologia și aspecte clinice caracteristice pierderilor de apă**

Cauze	Aspecte clinice și paraclinice
Creșterea eliminărilor	Simptome
· Renale: diabetul insipid, afecțiuni tubulare renale, creșterea osmolarității urinare (DZ, diuretice osmotice de ex. manitol)	· Sete
· Tegumentare: transpirație excesivă	· Uscăciunea gurii
· Prin plămâni: hiperventilație (febră)	· Dificultăți de deglutiție
· Digestive: diaree prelungită (la copii)	· Slăbiciune
Scăderea aportului	· Confuzie
· Inconștienți	Semne
· Disfagie	· Scădere în greutate
· Restricționarea aportului (copii, vârstnici)	· Uscăciunea mucoaselor
· Dereglarea centrului osmoreglator hipotalamic (accidente vasculare cerebrale, tumori cerebrale)	· Hiposecreție salivară
	· Oligurie însemnată (rapid)
	· Crește sodiul plasmatic; semnele depleției volumice apar tardiv (tahicardia, hipotensiunea, scăderea turgorului) și sunt mai puțin exprimate
	· Poate apare disfuncție cerebrală, comă

#### 2.6.4 EXCESUL DE APĂ

Excesul de apă este cauzat de obicei de o eliminare deficitară și mai rar, de un aport excesiv (Tabelul 2.IX).

**Tabelul 2.IX Etiologia și aspecte clinice caracteristice excesului de apă**

Cauze	Aspecte clinice și paraclinice
<b>Aport excesiv</b>	· Apare edem cerebral cu migrene, confuzie, convulsii, comă, cutia craniană fiind un spațiu rigid
· Polidipsia psihogenă	· Hiponatremia produce scăderea presiunii osmotice extracelulare, astfel apa intră în celule, are loc "edemațierea celulară"
· Eliminare deficitară	
· Secreție crescută de ADH (tumori pulmonare cu celule mici, traumatisme, leziuni chirurgicale, infecții, afecțiuni ale SNC)	
· Hipocorticism	
· Hipotiroidism	
· medicație: tolbutamida, citotoxice și imunosupresive (ciclofosfamida, vincristina)	
<b>Aport crescut și excreție scăzută</b>	
· Lichide administrate intravenos intra- și postoperator	

#### 2.6.5 HIPERNATREMIA ȘI EXCESUL DE SODIU

Hipernatremia și excesul de sodiu se datorează de cele mai multe ori pierderilor de apă, dar apare și din alte cauze (Tabelul 2.X).

Edemele apar când cantitatea de lichide ieșite la capătul arterial capilar este mai mare decât cantitatea care intră la capătul venos al capilarului. Cauza poate fi creșterea presiunii hidrostatice venoase (în deficitul de pompă al inimii), respectiv scăderea presiunii oncotice (în cazul hipoalbuminemiei). O mențiune specială merită efectul hipernatremiei asupra sistemului nervos central: ieșirea apei în sensul compensării hipertoniției extracelulare, duce la o deshidratare intensă a neuronilor. Mecanismul de adaptare constă în generarea unor

**Tabelul 2.X Etiologia și aspecte clinice caracteristice excesului de sodiu**

Cauze	Aspecte clinice și paraclinice
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Aport excesiv</li> <li>· Administrare i. v. de <math>\text{Na}^+\text{HCO}_3^-</math> la bolnavi cu acidoză metabolică</li> <li>· Eliminare renală deficitară</li> <li>· Exces de mineralocorticoizi (aldosteron) în sindromul Conn și exces de cortizol în sindromul Cushing: apare hipopotasemie și alcaloză metabolică</li> <li>· Scăderea ratei de filtrare glomerulară în IRA sau IRC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Edemele apar în zonele cu țesutul interstițial lax (pleoape, glezne)</li> <li>· Este necesar diagnosticul diferențial cu edemele din: <ul style="list-style-type: none"> <li>- sindromul nefrotic (hipoalbuminemia este cauza acestora),</li> <li>- insuficiența cardiacă congestivă (presiunea hidrostatică din venule este crescută),</li> <li>- ciroza hepatică cu hipertensiune portală (hipoalbuminemie),</li> <li>- edemele idiopatice.</li> </ul> </li> </ul>

”osmoliți” (substanțe osmotice active) care împiedică deshidratarea excesivă a celulelor nervoase. Corectarea rapidă a hipertonicității extracelulare, conduce la o mișcare rapidă a apei spre interiorul neuronilor și la edem cerebral în timp ce corecția lentă permite restabilirea tonicității fiziologice intracelulare.

### 2.6.6 HIPONATREMIA

Scăderea concentrației sodiului plasmatic nu este echivalentă cu pierderea de sodiu. Hiponatremia poate fi de trei tipuri:

1. Cu osmolalitate crescută (în cazul în care în plasmă există în concentrație exagerată, alte substanțe osmotice active: glucoză în coma hiperosmolară, manitol etc.);
2. Cu osmolalitate normală (în cazul în care în plasmă există în compensare, alte substanțe osmotice active: în hiperglicemie, hiperlipidemie severă, hiperproteinemie);
3. Cu osmolalitate scăzută și atunci hiponatremia se interpretează în funcție de modificările volumului lichidului extracelular:
  - a. Hiponatremie cu scăderea lichidului extracelular (LEC): în cazul pierderilor renale, gastrointestinale, tegumentare
  - b. Hiponatremie cu LEC normal:
    - dacă recoltarea sângelui s-a făcut pe o canulă pe care s-a injectat anterior o altă soluție;
    - în cazuri de hipertrigliceridemie, hiperproteinemie (paraproteinemie)
    - în prezența unei soluții care nu penetrează membrana celulară (ex. manitol), crește osmolaritatea LEC, apa trece din celulă în spațiul extracelular, cu scăderea aparentă a concentrației de sodiu plasmatic.
    - ”Sick cell syndrome” - resetare a osmostatului hipotalamic în afecțiuni cerebrale severe (tumori, traumatisme).
  - c. Hiponatremie cu LEC crescut: în cazul edemelor cardiogene, crește volumul interstițial, scade volumul plasmatic, stimulând receptorii de volum și astfel crește secreția de ADH, apa reținută fiind extravazată însă în spațiul interstițial, împreună cu electroliții.

Efectul hipotoniei asupra creierului poate fi de asemenea dramatic, producând edem cerebral într-o primă fază. Corectarea rapidă a hiponatremiei cauzează ieșirea masivă a apei din celula nervoasă, putând determina o scădere semnificativă a volumului creierului cu mielinoliza centrală pontină. Această complicație poate fi prevenită prin corectarea lentă în primele 24 ore (doar aproximativ 2/3 din deficitul de sodiu). Atitudinea terapeutică depinde însă și de caracterul acut sau cronic al hiponatremiei instalate (în forme acute – cu pierdere masivă de apă – se poate recurge și la o compensare de două ori mai rapidă, în special la copii).

## 2.7 HOMEOSTAZIA POTASIULUI

### 2.7.1 DISTRIBUȚIA POTASIULUI ÎN ORGANISM

Potasiul este un oligoelement prezent în organism în cantitate de aproximativ 3500 mmol (140 g), distribuția lui fiind predominant intracelulară, doar 2% fiind repartizat extracelular. Concentrația potasiului în ser este de 3,5-4,7 mmol/L, mai mare cu 0,2-0,3 mmol/L decât în plasmă (datorită eliberării  $K^+$  din plachete, după formarea cheagului). Potasiul are rol în menținerea volumului intracelular: 90% se găsește în formă liberă, 10% este potasiu legat în diverse combinații complexe (în special în hematii, țesutul osos și nervos).

Concentrația potasiului extracelular mult mai mică decât cea intracelulară, este un important determinant al potențialului de membrană al celulelor. Modificările concentrației acestui ion (mai ales în spațiul extracelular) au efecte dramatice asupra excitabilității celulare miocardice, nervoase, musculare striate. Tendința potasiului este de a trece de la concentrația mai mare (din celule) spre concentrația mai mică (în spațiul extracelular). Gradientul de concentrație este restabilit în permanență de către ATP-aza  $Na^+/K^+$ .

### 2.7.2 ECHILIBRUL POTASIULUI ÎN ORGANISM

Aportul alimentar de potasiu este foarte variabil, între 50 și 100 mmol/zi. O cantitate mare se secretă în tubul digestiv și este reabsorbit ulterior, iar o cantitate mică se elimină prin fecale și transpirație.

Controlul homeostaziei potasiului extracelular se realizează la nivelul eliminării renale. Zilnic, în urina primară trece 25% din potasiul total al organismului (800 mmol), 67% din potasiul filtrat se resoarbe pasiv în tubul contort proximal (în care concentrația potasiului rămâne aproape similară cu cea din plasmă), 20% se reabsoarbe activ (via cotransport  $Na-K-2Cl$ ) în ansa Henle (porțiunea groasă, ascendentă), iar eliminarea se reglează prin secreție activă și difuzie pasivă la nivelul tubului contort distal, (împreună cu  $H^+$ , la schimb cu  $Na^+$ ) mediată de aldosteron, astfel încât în urina finală ajunge aproximativ 10% din potasiul filtrat (mai mult când dieta este bogată în potasiu). Factorii care influențează eliminarea de  $K^+$  sunt:

- Concentrația potasiului și a protonilor în celulele tubulare (de exemplu în acidoza metabolică, scade eliminarea de potasiu, fiind prioritară eliminarea protonilor);
- Capacitatea celulelor tubulare de a elimina protoni (în acidoza tubulară renală de tip I, scade capacitatea de secreție tubulară a protonilor);

- Cantitatea de sodiu disponibil pentru reabsorbție în tubul contort distal;
- Concentrația aldosteronului circulant: aldosteronul stimulează eliminarea potasiului direct și indirect (prin schimb cu  $\text{Na}^+$ ); secreția de aldosteron la nivelul corticosuprarenalei este stimulată în mod direct de către hiperkaliemie și indirect ca răspuns la hipovolemie și/sau hiponatremie, de către sistemul renină – angiotensină;
- Creșterea ratei de filtrare glomerulară favorizează transferul potasiului în lumenul tubular.
- Capacitatea rinichiului de a conserva  $\text{K}^+$  este mai mică decât pentru  $\text{Na}^+$  (chiar fără aport, se elimină zilnic 10-20 mmol  $\text{K}^+$ ).

### 2.7.3 TULBURĂRI ALE METABOLISMULUI POTASIULUI

Concentrația serică a potasiului afectează în mod dramatic contractilitatea miocardică: atât hipokaliemia cât și hiperkaliemia pot fi amenințătoare de viață. Domeniul de „siguranță fiziologică” este relativ restrâns: concentrații mai mici de 2,5 mmol/L sau mai mari de 6 mmol/L, sunt periculoase în egală măsură.

#### 2.7.3.1 Hipokaliemia

Deficitul de potasiu în organism apare când aportul este mai mic decât eliminarea (Tabelul 2.XI). Hipokaliemia (scăderea potasiului plasmatic), nu este echivalentă cu deficitul de potasiu - ea se poate datora și unei redistribuții a potasiului prin intrarea acestuia în celule. Doar 2% din întreaga cantitate a potasiului fiind localizată extracelular (restul - intracelular), factorii care influențează distribuția între cele două compartimente au rol esențial în reglarea potasemiei.

Deficitul îndelungat de potasiu duce la instalarea unei acidoze intracelulare (prin redistribuirea potasiului la schimb cu protonii), însoțită de alcaloză extracelulară și acidurie paradoxală (cu economisirea potasiului).

Pentru corectarea hipokaliemiei, concentrația potasiului plasmatic este un indicator slab. În general, o concentrație sub 3 mmol/L sugerează un deficit de potasiu de aproximativ 300

**Tabelul 2.XI Etiologia și aspecte clinice caracteristice deficitului de potasiu**

Cauze	Aspecte clinice și paraclinice
Aport scăzut sau redistribuție:	Simptomatologie neuromusculară:
• Ingestie scăzută	• Slăbiciune, hipotonie
• Migrare intracelulară (în alcaloză metabolică, administrare de insulină, proliferări maligne)	• Depresie, confuzie
Eliminare crescută:	Semne cardiace:
• Extrarenală, prin sucuri digestive (vomă, diaree), transpirații excesive, abuz de purgative	• Tahicardie, aritmii
• Renală, în faza poliurică a IRA, după tratament diuretic, în acidoză tubulară renală, hiperaldosteronism primar sau secundar, sindromul Cushing.	• Modificări ale ECG-ului: ST subdenivelat, T inversat, PR prelungit, undă U hipertrofică.
	• Potențează toxicitatea digitalei
	Simptomatologie renală
	• Poliurie
	• Polidipsie (datorită scăderii capacității de concentrare renală)
	Alcaloză metabolică

mmol (de obicei intracelular). După administrarea de potasiu acesta ajunge inițial extracelular. Nu se administrează cantitate mai mare de 140 mmol/ 24 ore (maximum 20 mmol/oră) și se monitorizează ECG-ul în timpul tratamentului.

### 2.7.3.2 Hiperkaliemia

Principalele cauze și aspecte clinice ale hiperpotasemiei sunt amintite în *Tabelul 2.XII*.

Corectarea hiperkaliemiei se poate face prin administrare de calciu gluconic 10%, care antagonizează efectele cardiotoxice și se recomandă tratament intravenos cu glucoză și insulină (în 30 minute se administrează 500 mL de glucoză 20% și 20UI de insulină). La bolnavii în acidoză metabolică profundă, injectarea de 100-200 mL soluție bicarbonat 8,4% (conform BE – vezi Echilibrul acido-bazic) determină o mișcare a protonilor spre spațiul extracelular și a potasiului în interiorul celulelor. Se recomandă dializa la bolnavii cu insuficiență renală acută, sau în alte patologii însoțite de hiperkaliemie peste 7 mmol/L, această situație fiind o urgență medicală majoră care se poate complica cu stop cardiac în asistolie sau fibrilație ventriculară lentă.

**Tabelul 2.XII Etiologia și aspecte clinice caracteristice excesului de potasiu**

Cauze	Semne / simptome
<p>Aport excesiv, redistribuție, artefacte</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Administrare de K<sup>+</sup> parenteral (prin transfuzii), oral</li> <li>· Hemoliza probei, separarea necorespunzătoare / tardivă a serului, contaminarea probei</li> <li>· Leșirea potasiului din celule: leziuni tisulare, acidoză sistemică</li> </ul> <p>Eliminare renală deficitară</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Insuficiență renală acută sau cronică</li> <li>2. Administrare de blocați ai enzimei de conversie a angiotensinei (ACE), care blochează indirect și sinteza aldosteronului</li> <li>3. Tratament cu diuretice care economisesc potasiul (blocați receptorului de aldosteron)</li> <li>4. Deficit de mineralocorticoizi</li> </ol>	<p>Hiperpotasemia poate cauza moartea fără o simptomatologie evidentă (oprirea cordului, fibrilație ventriculară):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Datorită scăderii valorii potențialului de repaus membranar, scade durata potențialului de acțiune</li> <li>· Pe ECG apare QRS larg mai ales terminal, cu dispariția segmentului ST, unda T înaltă și ascuțită, unda P fiind aplatizată până la dispariție</li> </ul>

## 2.8 HOMEOSTAZIA HIDRO-ELECTROLITICĂ A PACIENTULUI CHIRURGICAL

În timpul intervenției chirurgicale se pierd cantități considerabile de lichide prin expunerea mucoaselor, prin transpirație, prin sângele pierdut. De aceea, înainte de orice intervenție chirurgicală, statusul hidro-electrolitic al organismului trebuie să fie echilibrat. Dacă pacientul are nevoie în urgență de o intervenție chirurgicală, administrarea de lichide parenteral este obligatorie. Determinarea ionogramei, a osmolalității plasmatice, a hemogramei, diurezei, sunt utile în aprecierea statusului hidro-electrolitic și în consecință, a tipului de lichid perfuzabil recomandat (vezi *Tabelul 2. XIII*).

Postoperator, ca urmare a răspunsului metabolic la traumă, are loc retenție de apă (consecința secreției crescute de ADH) și sodiu (datorită stresului). În primele 24 de ore post-

**Tabelul 2.XIII Compoziția unor fluide administrate parenteral**

Fluid	Compoziție	Utilizare
„Serul fiziologic” NaCl 0,9%	Na <sup>+</sup> :154 mmol/L Cl <sup>-</sup> : 154 mmol/L	Pierderi de lichide izotone
Glucoză 5%	Glucoză 278 mmol/L	Pierderi de lichide hipotone *
NaHCO <sub>3</sub> 1,26%	Na <sup>+</sup> :150 mmol/L HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 150 mmol/L	Acidoze metabolice severe
Soluție Ringer	Na <sup>+</sup> :147 mmol/L K <sup>+</sup> : 4 mmol/L Ca <sub>2</sub> <sup>+</sup> :2,25 mmol/L Cl <sup>-</sup> : 156 mmol/L	Înlocuirea pierderilor de lichide în timpul intervențiilor chirurgicale

\*Deși soluția este izotonă, datorită preluării și consumării rapide a glucozei de către celule, se poate considera că acționează ca soluție hipotonă

perator, de obicei nu se administrează mai mult de 1500 mL lichide (preferabil glucoză 5%), iar suplimentarea potasiului nu este necesară (se eliberează din spațiul intracelular în urma leziunilor chirurgicale). Ulterior, sub monitorizare strânsă a diurezei, drenajelor, aportului de lichide per os (dacă intervenția nu s-a făcut la nivelul tubului digestiv) și ionogramei, se pot administra până la 2500 mL/24 ore și se poate suplimenta potasiul (aproximativ 50-60 mmol/zi).

## 2.9 DETERMINAREA ÎN LABORATORUL DE ANALIZE A STATUSULUI HIDRO-ELECTROLITIC

Concentrația serică a sodiului este unul dintre cei mai frecvent solicitați parametri biologici, deși este un indicator slab al conținutului în sodiu al spațiul extracelular. Aspecte clinice cum ar fi modificările de diureză, masa pacientului, presiunea venoasă centrală, pot furniza informații vitale. Situațiile în care este realmente importantă dozarea concentrației sodiului sunt relativ puține: deshidratări severe, pacienți pe tratament parenteral administrat în perfuzii de lungă durată (în special dacă senzația de sete nu poate fi verificată), pacienți cu stări inexplicabile de confuzie, modificări de comportament sau iritabilitate nervoasă centrală. În aceste situații adeseori analizele cantitative în urină și alte rezultate modificate (cum ar fi cele ale potasiului sau clorului) pot completa cu succes diagnosticul.

În trecut, dozarea sodiului și potasiului se efectua prin fotometrie de flăcără – metodă care furniza concentrația acestor electroliți în ser. Metoda cea mai utilizată actualmente este cea potențiometrică (cu electrozi ion-selectivi - ISE), care determină activitatea ionilor în volumul de apă din serul pacienților (apa reprezentând aproximativ 93-95% din volumul seric). În cele mai multe circumstanțe clinice rezultatele furnizate de cele două tehnici sunt practic superpozabile pentru sodiu, potasiu și clor (electroliți aflați în formă disociată în proporție de peste 99%). Situația este diferită în stări patologice în care proporția serică a apei este semnificativ diminuată (de exemplu în hiperproteinemii sau hiperlipidemii severe), respectiv în cazul analizelor care fac diluția serului analizat (metoda indirectă).

Având în vedere că "osmometrul hipotalamic" determină în realitate osmolaritatea lichidului extracelular și nu concentrația sodiului, cea mai indicată ar fi determinarea osmolarității serice (osmometrele fiind însă destul de imprecise și dificil de automatizat în practica medicală). Situațiile în care pot exista în ser substanțe osmotice active nefiziologice (cum ar fi diversele toxice: etilglicolul, etanolul, metanolul, etc), au nevoie însă de acest tip de determinare pentru a clarifica discrepanțele dintre starea clinică a bolnavului și ionograma măsurată.

## 2.10 PREZENTĂRI DE CAZ

### 2.10.1. DESHIDRATARE PRIN APORT INSUFICIENT DE FLUIDE

Un bărbat de 80 de ani este adus în serviciul de urgență, fiind găsit de vecini pe podeaua locuinței, după ce a suferit un atac ischemic cerebral, fără să se poată clarifica perioada de timp scursă de la eveniment. Pacientul prezintă uscăciune marcată a mucoaselor, scăderea turgorului, oligurie, tahicardie și hipotensiune arterială. Analizele de laborator efectuate în urgență, au oferit următoarele rezultate:

- $\text{Na}^+$ : 152 mmol/L
- $\text{K}^+$ : 5,3 mmol/L
- $\text{HCO}_3^-$ : 30 mmol/L
- Glicemie: 60 mg/dL
- Creatinina serică: 1,15 mg/dL
- Ureea serică: 99 mg/dL
- Hematocrit: 55%
- Hemoglobină: 18 g/dL

#### Comentariu:

Valoarea crescută a hematocritului și concentrația crescută a electroliților, ureei și hemoglobinei, indică o deshidratare severă. Administrarea de fluide intravenos (preferabil soluție de glucoză 5%), corectează de obicei deficitul. Reinstalarea diurezei în limite fiziologice (1200-1500 mL/ 24 ore), indică hidratarea corespunzătoare a pacientului.

### 2.10.2. DESHIDRATARE PRIN DIAREE SEVERĂ

Un copil de un an este adus de părinți în serviciul de gardă de pediatrie, urmare a două zile cu multiple scaune diareice. Copilul are tahicardie și hipotensiune, tegumente și mucoase uscate, iar examinările paraclinice efectuate în regim de urgență au oferit următoarele rezultate:

- Ionograma:
  - $\text{Na}^+$ : 145 mmol/L (normal 135-145 mmol/L)
  - $\text{K}^+$ : 3,3 mmol/L (normal 3,3-5,3 mmol/L)
  - $\text{Cl}^-$ : 106 mmol/L (normal 95-105 mmol/L)

- Creatinina serică: 0,5 mg/dL (normal la copil 0,2-0,5 mg/dL)
- Ureea serică: 39 mg/dL (normal 16-40 mg/dL).

**Comentariu:**

La copilul mic, diareea - chiar de scurtă durată - poate conduce la deshidratare severă. Simptomatologia denotă hipovolemie, testele biochimice serice ne reprezentând modificări semnificative. Administrarea parenterală de lichide (NaCl 0,9%) și antiseptic intestinal a condus la îmbunătățirea semnificativă a stării clinice a copilului, după 2 zile.

**Atenție!** La copii, pentru mulți dintre parametrii sanguini / serici și urinari, valorile fiziologice sunt diferite de cele ale adultului.

**2.10.3 HIPOKALIEMIE PRIN ABUZ DE DIURETICE**

Pacientă de sex feminin, în vârstă de 68 ani, cu antecedente de hipertensiune arterială, în urmă cu un an a avut un episod de edem pulmonar acut. Tratament recomandat: glicozid digitalic, aspartat de Mg și K, diuretic de ansă, nitrat vasodilatator, blocant de enzimă de conversie a Angiotensinei. Pacienta a renunțat după o lună la nitrat și la aspartatul de Mg și K.

La consultul actual prezintă:

- tegumente și mucoase palide,
- constipație,
- oboseală musculară, tonus muscular diminuat, apatie,
- palpitații, puls: 95/minut, tensiunea arterială: 130/75 mmHg,
- concentrația K seric: 2,8 mmol/L

**Comentariu:**

Edemul pulmonar acut este cauzat de insuficiența cardiacă stângă decompensată.

Hipopotasemia se manifestă prin: apatie, slăbiciune musculară, diminuarea activității intestinale, tahicardie (creșterea frecvenței bătăilor cardiace). Hipokalemie apare în sindrom Cushing, diaree și vărsături foarte abundente, administrare timp îndelungat de diuretice care nu economisesc potasiul (de ex. diureticele de ansă).

**2.10.4 EDEME HIPOPROTEINEMICE**

O adolescentă de 15 ani este trimisă de medicul de familie nefrologului, ca urmare a edemelor constestate la nivelul feței și gleznelor în ultimele 2 săptămâni și a proteinuriei ++++ (>4,5 g/L) depistate la testarea rapidă (examen sumar de urină cu bandetele). Testarea proteinuriei/24 ore, a demonstrat o eliminare de 7g/24 ore.

Biopsia renală a demonstrat leziuni glomerulare minime. Acestea au condus însă la pierderi însemnate de proteine, iar scăderea presiunii coloid osmotice a plasmei a cauzat edemele. După terapie cu glucocorticoizi, situația se remite relativ rapid (în 1-2 săptămâni).

### 2.10.5 RETENȚIE ELECTROLITICĂ ȘI AZOTATĂ ÎN DISFUNȚII RENALE ACUTE

A. Pacient de sex masculin, în vârstă de 36 ani, în urmă cu două săptămâni, a avut o faringită streptococică tratată cu antibiotice de către medicul de familie. La vizita de control prezintă:

- stare generală alterată,
- edeme palpebrale,
- fasciculații musculare,
- puls: 45/minut, tensiunea arterială 150/90 mmHg
- relatează grețuri, inapetență, parestezii,
- oligurie, urină de culoare maroniu - roșu.

Examinările de laborator au arătat: hematurie macroscopică și microscopică (>50 hematii, MO x 400), proteinurie (1g/L), K seric 5,9 mmol/L, creatinină serică - 2,3 mg/dL, uree serică: 80 mg/dL.

#### **Comentariu:**

Glomerulonefrita acută este o inflamație a parenchimului renal (apare deseori după infecții respiratorii streptococice), care se caracterizează prin hematurie, proteinurie, oligurie, retenție azotată și electrolitică, edeme, creșterea presiunii arteriale. În insuficiență renală acută crește potasemia, nivelul creatininei și ureei serice datorită eliminării deficitare a acestora pe cale urinară.

Hiperpotasemia se însoțește de bradicardie, fasciculații musculare, parestezii. La valori care depășesc 8-9 mmol/L există pericolul stopului cardiac. Hiperkaliemia peste valoarea de 5 mmol/L apare cel mai des în insuficiența renală. Potasiul seric crește și în boala Addison (datorită insuficienței corticosuprarenale scade secreția de aldosteron, astfel este diminuată eliminarea renală a potasiului). Hiperkaliemie apare și în cetoacidoza diabetică (în lipsa insulinei, potasiul nu poate pătrunde în celule), în distrugerii masive de țesut, în stări de șoc.

B. Un tânăr de 26 de ani care a suferit un accident de motocicletă, este adus la serviciul de urgență în stare de șoc (hipotensiune și tahicardie severe), ca urmare a hemoragiei externe severe, cauzate de o fractură deschisă la nivelul membrului inferior drept. În ciuda realizării hemostazei eficiente și a administrării de sânge și soluții coloide, pacientul prezintă oligurie persistentă la o oră de la ieșirea din sala de operație. Determinând osmolalitatea urinară și sodiul urinar, se poate diferenția oliguria din necroza tubulară acută, de aceea din azotemia prerenală: osmolalitatea < 350 mOsm/kg în insuficiența renală acută și > 500 mOsm/kg, în azotemia prerenală, iar Na urinar > 40 mmol/L în insuficiența renală acută și < 20 mmol/L în azotemia prerenală. În ziua a treia de la internare oliguria persistă, iar concentrația creatininei și ureei serice cresc (3 mg/dL respectiv 135 mg/dL).

#### **Comentariu:**

Tânărul a dezvoltat o insuficiență renală acută, prin necroză tubulară acută – consecință a șocului hipovolemic. Hemodializa este singurul remediu în cazul de față, funcția renală fiind

reluată după două săptămâni, prin așa-numita fază poliurică (funcția glomerulară se reia înaintea funcției tubulare).

### **Bibliografie recomandată**

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – Medical Biochemistry, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.316-332.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E. - Tietz Textbook of Clinical Chemistry and molecular diagnostics. 5rd ed. WB Saunders ELSEVIER, 2012, p.
3. Cucuianu M., Crîșnic I., Pleșca-Manea Luminița – Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică, 1998, p. 323-352.
4. Kaplan A.L., Pesce J.A. – Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation, Ed.5, Mosby ELSEVIER, 2010, p. 527-549, p. 895-903, p. 998-1029.
5. Marshall W., Bangert S. Lapsley M.. – Clinical Chemistry, Ed.7, Mosby, 2012, p.13-39.
6. Marshall W., Lapsley M., Day A.P., Ayling R. – Clinical Biochemistry – Metabolic and Clinical Aspects, Ed. 3, ELSEVIER, 2014, p.27-64.
7. Nelson D., Cox M. – Lehninger Principles of Biochemistry, Ed. 4, W.H. Freeman and Company, 2005, p. 47-74.
8. Pagana Kathleen, Pagana T. - Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 414-418, 471-474.

# 3

## Echilibrul acido-bazic al organismului

Minodora Dobreanu

Procesele biologice și reacțiile enzimatică depind de concentrația protonilor în mediul de reacție. Viața este posibilă doar în limite relativ restrânse de pH (7 - 7,7 ceea ce înseamnă o concentrație a protonilor de aproximativ  $10^{-7} - 2 \times 10^{-8}$  mol/L). pH-ul lichidelor extracelulare este ușor alcalin, situat în intervalul 7,35-7,45. Având în vedere că procesele metabolice din organism produc zilnic 50-100 mmol de protoni (Tabelul 3.1), care trec în lichidul extracelular, ar rezulta o creștere a concentrației acestora cu 2,5-5 mmol/L, ceea ce ar fi incompatibil cu viața. Aceste schimbări sunt cu atât mai importante cu cât este bine cunoscut faptul că modificările cu câteva zecimale ale valorii optime a acidității mediului intern, au consecințe grave, în special prin modificarea gradului de ionizare al proteinelor (fenomen care afectează profund activitatea enzimelor).

Oxigenul și dioxidul de carbon sunt substanțe esențiale ale metabolismului celular: în timp ce oxigenul este utilizat în lanțul de oxidare biologică pentru formarea apei (cu eliberarea unei cantități însemnate de energie: doi sau trei moli de ATP/moleculă de apă formată), dioxidul de carbon rezultă în urma proceselor de decarboxilare; în țesuturi, dar mai ales în interiorul hematiei, dioxidul de carbon formează cu apa acidul carbonic, care disociază în ioni bicarbonat și protoni.

**Tabelul 3.1 Substanțe acide produse în organism**

Acidul	Sursa	Calea de eliminare	Cantitatea produsă	Concentrația plasmatică
Dioxidul de carbon	Respirația celulară	Pulmonar	20.000 mmol/zi	21-30 mmol/L
Acizi organici:				
Acid lactic	Glicoliza anaerobă	Gluconeogeneză	1.000 mmol/zi	1 mmol/L
Corpi cetonici	Spirala Lynen	Oxidare celulară		1 mmol/L
Acizi anorganici:				
Derivați de acid fosforic	Compuși cu fosfor	Renală	70 mmol/zi	
Derivați de acid sulfuric	Aminoacizi cu sulf	Renală		

### 3.1 MECANISME IMPLICATE ÎN HOMEOSTAZIA ACIDO-BAZICĂ

#### 3.1.1 PROCESE FIZIOLOGICE GENERATOARE DE PROTONI (REAȚII DE DEHIDROGENARE)

Catabolismul incomplet al carbohidraților și acizilor grași (compuși cu C, H, O) (Tabelul 3.I):

- în anaerobioză glucoza se transformă în acid lactic,
- acizii grași în perioade de inaniție generează corpi cetonici.

Catabolismul complet al compușilor organici care conțin și alte componente decât C, H, O:

- în condiții aerobe și completat cu respirația celulară, glucoza se transformă în  $\text{CO}_2$  și apă,
- prin spirala Lynen completată cu respirația celulară, acizii grași se transformă în apă și  $\text{CO}_2$ ,
- aminoacizii (prin gruparea  $\text{NH}_2^-$ ) sunt sursa de azot pentru sinteza ureei,
- grupările tiolice se oxidează în sulfați.

Ureea și sulfații sunt eliminați pe cale renală.

Majoritatea produșilor de degradare metabolici sunt acizi (acidul carbonic, corpii cetonici, acidul lactic, oxalic, uric etc.). În ciuda formării continue a acestor acizi, pH-ul sângelui și altor lichide biologice, rămâne totuși neschimbat. Ca urmare, în aceste lichide trebuie să existe și să funcționeze niște sisteme chimice, care pot neutraliza de la moment la moment creșterea concentrației  $\text{H}^+$  - sistemele tampon (buffer).

#### 3.1.2 PROCESE CARE MENȚIN CONSTANTĂ CONCENTRAȚIA PROTONILOR ÎN LICHIDUL EXTRACELULAR

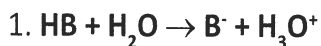
Mecanisme imediate, fizico-chimice: sistemele tampon (sunt doar o măsură temporară).

Mecanisme tardive, biologice:

- funcția respiratorie (eliminarea de  $\text{CO}_2$ );
- funcția renală (pentru eliminarea  $\text{NH}_4^+$  și  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ );
- funcția digestivă (ficatul transformă acidul lactic în piruvat și din acesta, sintetizează glucoză – gluconeogeneza - care poate fi stocată sub formă de glicogen).

##### 3.1.2.1 Mecanisme fizico-chimice de reglare a echilibrului acido-bazic. Sistemele Tampon

Sistemele tampon sunt amestecuri obținute din acizi sau baze slabe cu sărurile lor cu baze sau acizi tari și au proprietatea de a se opune variației pH-ului mediului la adăugarea limitată de acizi sau baze. Dacă acidul slab este HB, iar baza sa conjugată este B<sup>-</sup> (KB, în formă de sare), reacțiile relevante pentru disocierea acestora sunt:



Rearanjând și logaritmand expresia matematică a constantei de echilibru a primei ecuații, se obține ecuația Henderson - Hasselbalch pentru sistemele tampon:

$$K = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{[H_2O] \cdot [HA]}$$

$$K \cdot [H_2O] = K_a = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{[HA]}$$

$K_a$  = constanta de aciditate a componentei acide a tamponului.

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = - \lg [H_3O^+]$$

$$pK_a = - \lg K_a$$

Acidul slab și sarea sa se găsesc concomitent în aceeași soluție; deoarece sarea se găsește în formă aproape complet disociată (echilibrul reacției 2 este „deplasat” la dreapta), conform legii acțiunii maselor echilibrul reacției 1 va fi „deplasat” la stânga, sau cu alte cuvinte ecuația Henderson - Hasselbalch pentru sistemele tampon se poate scrie în forma următoare:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[sare]}{[acid]}$$

determinând direct doi dintre parametrii ecuației, prin calcul poate fi aflat al treilea.

Valoarea de pH a unei soluții tampon, numită aciditatea actuală, este determinată de raportul cantității componentului bazic (sarea acidului slab, formată cu o bază puternică) și acid. Această valoare rămâne constantă indiferent de cantitatea absolută a componentelor. Prin modificarea acestui raport, în limita capacității de disociere a acidului slab, pot fi alcătuite sisteme de tampon cu valori diferite de pH.

Capacitatea de tamponare (CT) a unui tampon este definită ca fiind numărul de echivalenți de  $H^+$  sau  $HO^-$  care adăugați la un litru de tampon modifică pH-ul soluției cu 1 unitate; CT este maximă dacă concentrațiile celor doi componenți ai tamponului sunt egale (la pH-ul soluției egal cu  $pK_a$ ); prin diluție pH-ul soluției rămâne același, CT însă scade; un sistem tampon acționează optim în intervalul de  $pH = pK_a \pm 1$ .

În organism funcționează patru sisteme tampon:

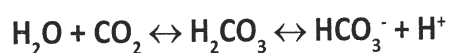
- tamponul bicarbonat / acid carbonic ( $HCO_3^- / H_2CO_3$ ) -  $pK_{H_2CO_3} = 6,1$ ;
- hemoglobina ( $Hb / KHbO_2$ ):  $pKHb = 7,3$ ;  $pK_{HbO_2} = 7,16$ ;
- proteinele ( $Prot^- / HProt$ );
- tamponul fosfat ( $HPO_4^{2-} / H_2PO_4^-$ ):  $pK_{H_2PO_4^-} = 6,8$ ;

Primele două sunt tampoane predominant extracelulare, iar ultimele două tamponează mai ales intracelular și în urină (fosfații).

**Tamponul bicarbonat / acid carbonic** - este cel mai important tampon sanguin, atât prin capacitatea mare de tamponare (asigură ~ 52-55 % din CT a sângelui: 40% în plasmă și

15% intraeritrocitar), cât și prin rapiditatea regenerării componentelor sale ( $\text{CO}_2$  se elimină respirator, iar  $\text{HCO}_3^-$  se recuperează și se neoformează la nivel renal).

Limitele stabilizării acidității actuale (capacitatea de tamponare a sistemului), sunt dependente de cantitatea componentelor. În cazul sistemului tampon bicarbonat / acid carbonic, această dependență se explică prin faptul că în soluție apoasă ambii componenți disociază electrolitic. Spre deosebire de ionii specifici ai componentelor ( $\text{Na}^+$  din sarea bazică și  $\text{H}^+$  din acidul slab, care determină și aciditatea actuală a sistemului tampon), ionii de  $\text{HCO}_3^-$  sunt furnizați de ambele substanțe. Dat fiind că bicarbonatul de Na este un electrolit puternic (care disociază 100%) suprimă disocierea acidului carbonic, astfel încât concentrația actuală a  $\text{HCO}_3^-$  este determinată de cantitatea sării, iar cea a  $\text{H}^+$  este dependentă exclusiv de gradul disociației acidului carbonic în condițiile existente:



În cazul acestui sistem tampon, valorile celor doi parametri pot fi calculate în felul următor: conform legii acțiunii maselor (Guldberg-Waage), valoarea raportului produsului concentrațiilor  $\text{H}^+$  și  $\text{HCO}_3^-$  și al acidului carbonic nedisociat este constantă.

$$K_a = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

Din această formulă poate fi exprimată valoarea concentrației ionilor de  $\text{H}^+$ :

$$[\text{H}^+] = K_a \cdot \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{HCO}_3^-]}$$

Deoarece logaritmul negativ al valorilor concentrațiilor  $\text{H}^+$  indică valoarea cifrică a pH, prin logaritmare a ecuației de mai sus se poate obține valoarea acidității actuale. Ecuația Henderson - Hasselbalch pentru acest sistem tampon:

$$\text{pH} = \text{p} K_a + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

Ca urmare, valoarea acidității actuale (pH) a unei soluții tampon poate fi calculată din raportul concentrațiilor componentului bazic și acid, iar aciditatea titrabilă (capacitatea de tamponare), din suma concentrațiilor acestora.

$$\text{pH} = 6,1 + \lg \frac{[\text{HCO}_3^-]}{\text{pCO}_2 \cdot 0,03}$$

Concentrația  $\text{H}_2\text{CO}_3$  nu se determină în mod direct, este exprimată însă prin produsul dintre presiunea parțială a  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2 \sim 40 \text{ mmHg}$ ) și coeficientul de solubilitate al acestuia în apă (0,03). Cifra 6,1 este valoarea  $\text{p} K_a$  a acidului carbonic, iar 1,3 este logaritmul în baza zece al raportului de concentrație bicarbonat / acid carbonic (ideal = 24/1,2). Având în ve-

dere faptul că  $pK_a$  pentru acest tampon este destul de depărtat de pH-ul fiziologic, raportul între componenta metabolică ( $HCO_3^-$ ) și cea respiratorie ( $CO_2$ ) a tamponului în plasmă este 20; deci concentrația  $HCO_3^-$  este 23 - 25 mmol/L. Aceste date cifrice sugerează că tamponul  $HCO_3^- / H_2CO_3$  nu funcționează ideal (mai ales în alcaloze), oricum însă organismul este un producător de acizi – tendința naturală este spre acidoză.

pH-ul sângelui și lichidului extracelular depinde de reglarea raportului  $HCO_3^- / H_2CO_3$ , reglaj realizat rapid de plămân prin eliberarea  $CO_2$  și de rinichi, prin reabsorbția și neoformarea  $HCO_3^-$ , respectiv prin eliminarea  $H^+$  (sub formă de  $NH_4^+$  și  $H_2PO_4^-$ ).

**Hemoglobina** asigură ~ 38 % din CT a sângelui, capacitatea sa de tamponare fiind asigurată de grupările polare ale aminoacizilor din structura globinei; este o cromoproteină cu rol tampon important, datorită concentrației mari pe care o are în sânge, rolului de transportor al gazelor sanguine și abundenței histidinei în structura sa ( $pK_{His} \sim 7$ ).

**Proteinele plasmatic** (altele decât hemoglobina), asigură 5 - 10 % din CT sanguină; proteinele sunt importante mai ales ca tampon intracelular.

**Tamponul fosfat**, prin  $K_a$  a  $H_2PO_4^-$  pare mai potrivit pentru domeniul de pH al organismului, însă este modest reprezentat cantitativ în sânge (~ 2 % din CT sanguină), dar foarte bine reprezentat intracelular și în urină.

### 3.1.2.2 Parametrii echilibrului acido-bazic (EAB)

Servesc la aprecierea statusului acid-bază în sânge și depind de locul de recoltare al sângelui (arterial / capilar / venos = A/C/V):

- pH-ul actual este valoarea pH-ului sângelui recoltat în condiții de anaerobioză; depinde de temperatura la care se lucrează;  $pH_{37^\circ C} = 7,45 / 7,40 / 7,35$  (A/C/V);
- presiunea parțială a  $CO_2$  ( $pCO_2$ ) servește la determinarea componentei acide a tamponului;  $pCO_2 = 35/40/45$  mmHg (A/C/V);
- bicarbonatul actual (BA) este concentrația bicarbonatului la  $37^\circ C$ , în sângele recoltat anaerob; normal:  $24 \pm 2 / 25 \pm 2$  mmol/L (A / V);
- bicarbonatul standard (BS) este concentrația în bicarbonat a plasmei echilibrate la  $37^\circ C$ , cu  $pCO_2 = 40$  mmHg (valoarea din alveolele pulmonare) și o saturație în  $O_2 = 100\%$ ; la  $pH = 7,4$ ,  $BS = 24$  mmol/L;
- $CO_2$  total, TCO<sub>2</sub> (rezerva alcalină), reprezintă conținutul în  $CO_2$  al BA și  $H_2CO_3$  din plasma separată anaerob la  $37^\circ C$ ; normal:  $25 \pm 2 / 26 \pm 2$  mmol/L (A/V) sau 55 vol. %  $CO_2$ .
- bazele tampon (BT = BB = buffer base) reprezintă suma anionilor tampon (BA+Hb+Prot); normal:  $48 \pm 2$  mmol/L
- bazele tampon standard reprezintă suma anionilor tampon, în situația ideală (BA = BS, Hb = 14g/dL, Prot = 70g/L):
- $BB_{st} = BS + Hb + Prot = 48$  mmol/L
- baze exces (BE) reprezintă abaterea pozitivă (exces de baze, +BE) sau negativă (deficit de baze, -BE) a  $BB_{actual}$  de la  $BB_{standard}$ ; normal:  $\pm 2$  mmol/L
- presiunea parțială a oxigenului:  $pO_2 = 75 / 90 / 105$  mmHg (V / C / A).

- saturația în oxigen a hemoglobinei: 94-100%/ 60-85% (A / V)
- lacuna anionică, LA (anion gap), reprezintă suma anionilor plasmatici, alții decât  $\text{Cl}^-$  și  $\text{HCO}_3^-$  (lactat, corpi cetonici nevolatili, sulfati, fosfati, alți acizi organici); se calculează din ecuația:

$$\text{LA} = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-] - [\text{HCO}_3^-]; \text{ în sângele venos} = 5 - 14 \text{ mmol/L.}$$

### 3.1.2.3 Mecanisme biologice (fiziologice) de reglare a echilibrului acido-bazic

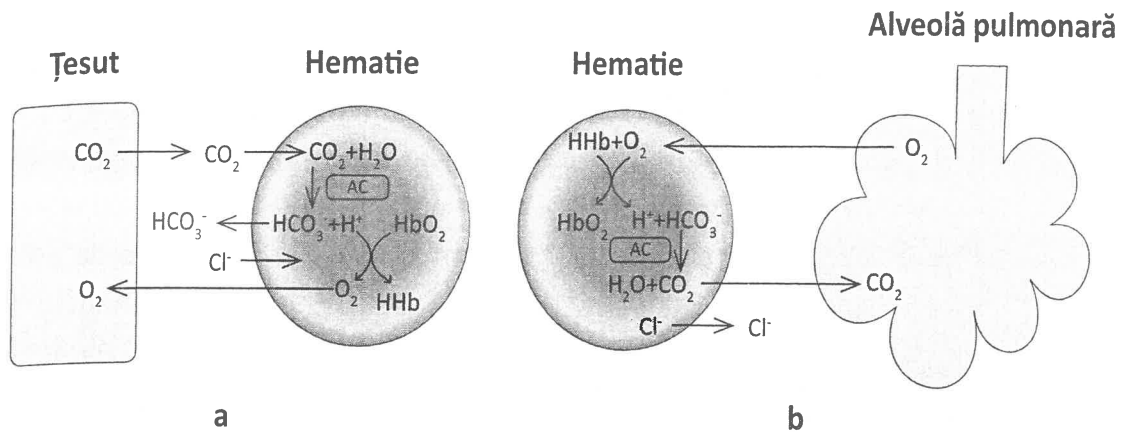
Capacitatea de tamponare a sângelui poate neutraliza producții de degradare cu caracter acid numai pentru o scurtă perioadă. De exemplu, cantitatea de acid lactic produsă prin arderea a 12 g glucoză, consumă întreaga capacitate de tamponare a volumului sângelui circulant. Din acest motiv, capacitatea de tamponare a sângelui se epuizează rapid și asigură numai neutralizarea imediată și temporară a metaboliților acizi. Valoarea practic constantă a capacității de tamponare a sângelui se menține totuși prin regenerarea continuă a acesteia. Această regenerare se realizează prin două mecanisme: mecanismul respirator elimină excesul bioxidului de carbon prin expirația pulmonară, iar mecanismul metabolic (renal) recuperează cantitatea consumată a bicarbonaților (rezervei alcaline). Tamponul bicarbonat este unic: rămânând în echilibru cu aerul atmosferic, se crează un sistem deschis cu o capacitate de tamponare mult mai mare decât a oricărui sistem închis.

Hematiile, plămânii și rinichii dețin rolurile centrale în regenerarea sistemelor tampon ale organismului.

#### a. Rolul hematiilor și al plămânilor - transportul și eliminarea $\text{CO}_2$

Marea capacitate a plămânilor de compensare a acidității actuale și titrabilă reiese din faptul că în urma unei alimentații fiziologice (2.000 kcal/zi), se formează zilnic în organism cca. 500 g bioxid de carbon și 42 g  $\text{H}^+$ . Bioxidul de carbon, ca produs final al arderii carbonului, fiind un gaz molecular neelectrolitic prezent în exces în lichidul interstițial și sânge, trece ușor prin membrane, inclusiv cea a hematiilor. În interiorul acestora și în prezența apei (sub acțiunea anhidrazei carbonice – AC – enzimă zinc-dependentă) bioxidul de carbon se transformă în acid carbonic. Din disocierea electrolitică a acestuia din urmă, se pun în libertate ioni de  $\text{HCO}_3^-$  și  $\text{H}^+$ . Protonii se fixează temporar de molecula hemoglobinei reduse, care se comportă ca un acid slab ( $\text{pK}_a = 7,3$ ), prin cedarea în schimb a ionilor de  $\text{K}^+$  pentru neutralizarea bicarbonaților, care trec din hematii în plasmă, pe seama unui schimb reciproc cu clorurile (Figura 3.1a). Cu învelișul lor bogat hidratat, acestea introduc în hematii cantități însemnate de apă, ducând la creșterea volumului eritrocitar și a valorii hematocritului în sângele venos (fenomenul de membrană al lui Hamburger).

Din interstițiul alveolar pulmonar oxigenul molecular ( $\text{O}_2$ ) trece în plasmă, apoi în hematii. Hemoglobina redusă se oxigenează, devine mai acidă ( $\text{pK}_a = 7,16$ ) și capabilă să elibereze prin disociere protonii fixați, în schimbul refixării ionilor de  $\text{K}^+$  cedați în sângele venos (Figura 3.1b). Protonii eliberați formează cu bicarbonații acid carbonic, care sub acțiunea anhidrazei

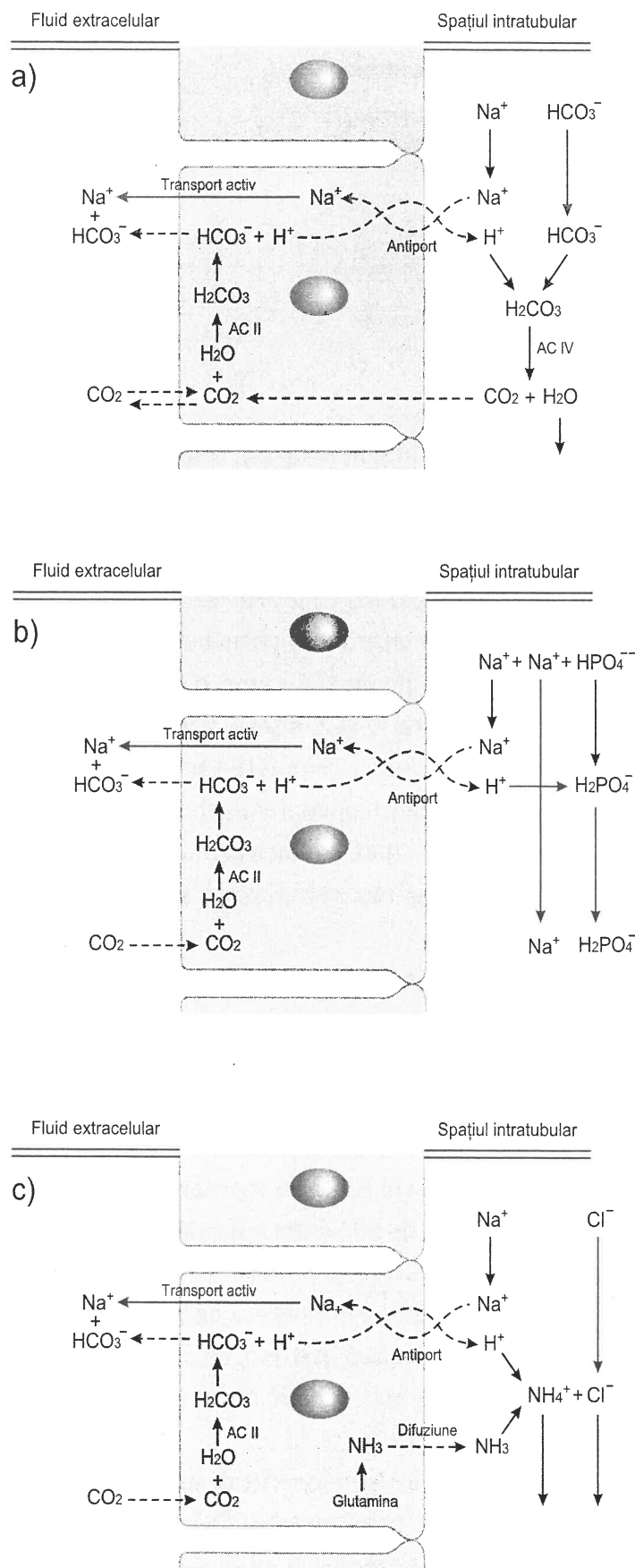


**Figura 3.1** Schimburile gazoase între țesuturi și hematii (a), respectiv între hematii și alveole pulmonare (b)

carbonice se descompune în bioxid de carbon și apă. Bicarbonații descompuși intraeritro-citar se înlocuiesc cu bicarbonații din plasmă, paralel cu ieșirea cantităților echivalente de cloruri. Astfel, în sângele arterial, pe de o parte bicarbonații plasmatici în exces se descompun (în hematii) în bioxid de carbon și apă, iar pe de altă parte, din cauza ieșirii clorurilor puternic hidratate din hematii, volumul acestora se va micșora, paralel cu scăderea valorii hematocritului din sângele arterial. În sfârșit, gradul eliminării sau retenției bioxidului de carbon este condiționat de intensitatea respirației: hipoventilația duce la creșterea presiunii parțiale tisulare-sanguine a bioxidului de carbon ( $\text{pCO}_2$ ), adică la manifestarea unei acidoze respiratorii (prin hipercapnie), iar în urma unei respirații forțate se manifestă o alcaloză respiratorie (prin hipocapnie).

Elementele cheie care determină schimburile și transporturile gazoase la nivelul plămânilor și țesuturilor sunt:

- În țesuturi se formează  $\text{CO}_2$  și acizi, deci pH-ul este scăzut; în acest mediu oxihemoglobina cedează oxigen și se protonează.
- În plămâni are loc oxigenarea hemoglobinei și cedarea protonilor.
- Permeabilitatea selectivă a membranelor celulare și a membranei hematiilor pentru  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  și  $\text{Cl}^-$ . Valoarea constantei de difuziune a bioxidului de carbon este de 200 mL/min/barr, iar a oxigenului este de 10 ori mai mică.
- Anhidraza carbonică (AC) accelerează de 100 de ori viteza de formare a  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . AC se găsește în hematii, celulele parietale ale mucoasei gastrice, celulele tubilor uriniferi.
- Hemoglobina: oxihemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) are  $\text{pKa}$  mai mic decât  $\text{HbH}$  (cedează mai ușor  $\text{H}^+$ ).
- Transportul bioxidului de carbon prin sânge se face în trei moduri diferite: dizolvat în plasmă (2-3 ml / 100 ml), sub formă de bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), combinat cu proteine, legat covalent la capătul lor amino terminal (proteine +  $\text{CO}_2 \rightarrow$  proteine-NH-COOH).
- Ventilația: centrul respirator din trunchiul cerebral este sensibil la scăderea pH-ului, a  $\text{pO}_2$  și la creșterea  $\text{pCO}_2$ .



**Figura 3.2** a) Recuperarea bicarbonatului la nivelul tubului contort proximal, b), c) Neoformarea de bicarbonat în tubul contort distal

- Surfactantul pulmonar este substanța fosfolipidică cu efect tensioactiv care împiedică colabarea pereților alveolari.
- Gradientul de presiune parțială al bioxidului de carbon ( $\text{pCO}_2$ ): 40 mmHg în sângele arterial și 46 mmHg în cel venos (în atmosferă  $\text{pCO}_2 = 0,3$  mmHg).

### b. Rolul rinichilor

Rinichii elimină acizii nevolatili rezultați din catabolismul aminoacizilor sulfurați ( $\text{HSO}_4^-$ ), fosfolipidelor ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), acizilor grași (corpi cetonici).

La nivel renal are loc reabsorbția/ recuperarea bicarbonaților filtrați (în tubul proximal), secreția protonilor (în tubii distali)/ neoformarea bicarbonatului (Figura 3.2).

Dacă pH-ul urinar este sub 6, concentrația  $\text{HCO}_3^-$  urinar este foarte scăzută ( $< 0,1$  mmol/L). Ultrafiltratul glomerular are 24 mmol  $\text{HCO}_3^-$ /L (4500 mmol/zi), cea mai mare parte fiind reabsorbită (90% în tubul contort proximal). Protonii secretați de celulele tubulare (majoritatea la schimb cu  $\text{Na}^+$  și doar o mică parte de o  $\text{H}^+$ -ATP-ază) interacționează cu  $\text{HCO}_3^-$  filtrat, formând  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . În prezența anhidrazei carbonice (tip IV)  $\text{H}_2\text{CO}_3$  din lumen se transformă rapid în  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ .  $\text{CO}_2$  penetrează liber membrana celulei tubulare renale spre interior, refăcând  $\text{H}_2\text{CO}_3$  sub acțiunea anhidrazei

carbonice (tip II). Prin disocierea  $\text{H}_2\text{CO}_3$  se formează  $\text{H}^+$  și  $\text{HCO}_3^-$ , protonii se reîntorc în lumenul tubular (la schimb cu sodiul), iar bicarbonatul părăsește celula prin membrana bazolaterală, în cotransport cu Na (rezultatul net fiind transferul  $\text{NaHCO}_3$  din lumenul tubular în sângele capilarelor peritubulare). Inhibitorii de anhidrază carbonică (acetazolamida), interferează cu reabsorbția proximală a  $\text{NaHCO}_3$ , inducând o diureză osmotică a acestuia.

Producerea  $\text{HCO}_3^-$  de novo se face pe seama formării / eliminării ionului amoniu și a acidității titrabile.

### Excreția $\text{NH}_4^+$

La nivelul tubului contort distal se eliberează amoniacul ( $\text{NH}_3$ ) din glutamină sub acțiunea glutaminazei și eliminarea amoniacului cuplat cu protoni în urină, sub formă de ioni de amoniu.

Producerea renală a amoniacului are loc în celulele tubulare proximale, din glutamina care intră în celule din filtratul glomerular, dar și din sângele capilarelor peritubulare. În interiorul celulei glutamina intră în mitocondrie, unde este dezaminată în două etape (sub acțiunea dezaminazei I și glutamico-dezaminazei), rezultând doi ioni amoniu ( $\text{NH}_4^+$ ) și un anion alfa-cetoglutarat.  $\text{NH}_4^+$  este secretat în lumenul tubular (cu concursul schimbului  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ ), iar anionul alfa-cetoglutarat este oxidat la  $2 \text{HCO}_3^- + 4 \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ . Bicarbonatul iese din celulă la nivelul membranei bazolaterale, prin co-transport cu  $\text{Na}^+$  (pentru fiecare ion  $\text{NH}_4^+$  excretat, un ion  $\text{HCO}_3^-$  intră în lichidul extracelular).

În jur de 40 mmol de protoni se elimină zilnic în felul acesta. Această cantitate poate crește chiar de 10 ori în acidozele din diabetul zaharat. Acest mecanism funcționează la nivelul tubilor renali distali prin reacții metabolice cuplate cu schimburile ionice active între  $\text{H}^+$  intracelular și  $\text{Na}^+$  intratubular, respectiv prin difuziunea neionică a  $\text{NH}_3$  din interiorul celulelor tubulare în lichidul tubular și transformarea lui prin fixarea unui proton în ion de amoniu ( $\text{NH}_4^+$ ). Pe seama fiecărui proton fixat poate fi reabsorbit și urmat de bicarbonat, încă un ion de  $\text{Na}^+$ . Membrana celulelor tubulare este impermeabilă pentru ionii de amoniu (în contrast cu moleculele neionizate ale amoniacului), din cauza caracterului lor de electrolit slab. Astfel, fiecare moleculă de amoniac excretat fixează câte un proton, prin care reduce aciditatea urinei, neutralizând acizii organici (uric și oxalic). Ionii de  $\text{H}^+$  folosiți pentru schimburile  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  provin și în acest caz din disocierea electrolitică a acidului carbonic, format (sub acțiunea carboanhidrazei) din bioxid de carbon și apă. Ionii de  $\text{H}^+$  se excretă în lichidul tubular, fiind schimbați cu câte un ion de  $\text{Na}^+$ .

În acidoze acute, eliminarea renală a  $\text{NH}_4^+$  poate crește pe seama  $\text{NH}_3$  din sângele venos renal. Un pH acid intracelular activează transportul mitocondrial al glutaminei și dezaminarea /oxidarea acesteia.

În acidoze cronice are loc activarea transportorilor bazolaterali și mitocondriali ai glutaminei, dar și a glutaminazei și a altor enzime care participă la oxidarea glutaminei. Această adaptare la acidoza cronică, permite excreția urinară a unei mari cantități de  $\text{NH}_4^+$ , la orice pH, chiar neutru.

### Eliminarea acidității titrabile

Principalul tampon urinar este tamponul fosfat. La pH 7,4 (în filtratul glomerular), doar 20% din totalul fosfaților sunt în formă diacidă ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), restul fiind monoacizi ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Protonii excretați în lichidul tubular renal proximal, pe de o parte transformă fosfații primari ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) în fosfați secundari ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) și duc la creșterea progresivă a acidității urinii (la pH 6,8 cele două specii ionice se găsesc în proporție egală). Pe de altă parte ionii de  $\text{Na}^+$  reabsorbiți, împreună cu ionii de bicarbonat reținuți în celulele tubulare, sunt eliminați spre sângele vaselor recta peritubulare, ridicând astfel capacitatea lui de tamponare. Prin transformarea  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  în  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  aproximativ 30 mmol protoni se elimină zilnic.

Secreția protonilor în tubii colectori, sub acțiunea ATP-azei pentru protoni, poate acidifica urina la pH < 6; la pH < 4,6 practic toți ionii fosfat se găsesc în formă  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

Excreția  $\text{HCO}_3^-$  se produce doar dacă concentrația bicarbonatului plasmatic depășește 28 mmol/L. Capacitatea regeneratoare a rinichilor poate fi apreciată având în vedere faptul că, în urma consumării unui regim alimentar obișnuit, rinichii excretă prin urină, în 24 de ore, o cantitate de 20-30 mmol  $\text{H}^+$  (acizi titrabili). Ca urmare urina definitivă are o reacție acidă, cu valorile acidității actuale între pH = 4,5-6,9. Este de remarcat că, din cauza substanțelor tampon prezente în urină, valoarea maximă a acidității urinare nu poate să coboare sub pH=4,5 nici în cazul unei acidoze deosebit de grave. Aciditatea titrabilă a urinii (cantitatea absolută a acizilor excretați prin urină) poate crește totuși chiar și peste 150 mmol/zi.

Alte sisteme tampon, cum ar fi creatinina și  $\beta$ -hidroxibutiratul contribuie la eliminarea acidității titrabile doar la pH < 5.

Rata eliminării renale a acidității titrabile depinde de pH-ul urinei și de rata de eliminare a sistemelor tampon. În acidoză, eliminarea de aciditate titrabilă crește semnificativ pe seama  $\beta$ -hidroxibutiratului (de la 30 la 300 mmol/zi).

### c. Alte mecanisme de reglare a echilibrului acido-bazic

Stomacul intervine în reglarea echilibrului acido-bazic prin producere de acid clorhidric ( $\text{H}^+\text{Cl}^-$ ) și eliberarea acestuia în suc gastric, respectiv importul de  $\text{HCO}_3^-$  în sânge. Prin vomă se pierde protoni, ceea ce duce la alcaloză.

Sucul duodenal este bogat în  $\text{HCO}_3^-$  (rezultând acidifierea sângelui în faza intestinală a digestiei).

Ficatul transformă lactatul în glucoză, iar aceasta în glicogen. La nivel hepatic au loc procese importante în detoxificare, cum ar fi sulfoconjugarea și glucuronoconjugarea (acizii respectivi fiind eliminați în formă legată).

La nivelul pielii, pH-ul secreției sudorale este dependent de pH-ul sanguin (de obicei este ușor acid).

## 3.2 VARIAȚII FIZIOLOGICE ȘI PATOLOGICE ALE PARAMETRILOR ECHILIBRULUI ACIDO-BAZIC

### 3.2.1 FIZIOLOGICE

- legate de vârstă: persoanele în vârstă au pH-ul organismului în general mai acid decât tinerii;
- perioadele zilei: dimineața, „à jeun”, pH-ul este mai acid, datorită respirației superficiale din timpul nopții;
- fazele digestiei: digestia gastrică crește pH-ul sanguin prin reținerea  $H^+$  la nivelul stomacului, iar digestia intestinală scade pH-ul sanguin prin mecanism invers;
- starea de efort: efortul muscular intens produce o scădere trecătoare a pH-ului sanguin prin acidul lactic eliberat în glicoliza anaerobă.

### 3.2.2 PATOLOGICE

Orice modificare funcțională endogenă sau acțiune exogenă care duce la scăderea sau creșterea acidității titrabilă a sângelui și a lichidelor biologice, duce la apariția unor tulburări (mai mult sau mai puțin grave) ale funcțiilor celulare. Conform celor două mecanisme - pulmonare și metabolice - ale reglării echilibrului acido-bazic, se pot deosebi patru tipuri ale acestor dereglări: acidoza respiratorie sau metabolică, alcaloza respiratorie sau metabolică. În fazele incipiente, fiecare formă a dereglărilor echilibrului acido-bazic este compensată din punct de vedere funcțional, adică nu duce la modificarea însemnată a acidității actuale (a valorii pH), nici la apariția tulburărilor funcționale. În cazul unor dereglări mai grave, tulburarea devine manifestă, solicitând intervenția terapeutică imediată.

Acidozele și alcalozele sunt definite ca scăderi, respectiv creșteri ale pH-ului, având diverse cauze (respiratorii sau metabolice/ nonrespiratorii). Orice tulburare a EAB decurge în 4 faze:

- generarea (cauze),
- tamponarea (corectarea imediată fizico-chimică),
- compensarea,
- regenerarea sistemelor tampon.

**a. Acidoza metabolică** poate apărea în diverse situații patologice însoțite de:

- acumulări de acizi (insuficiențe renale, cetoacidoza diabetică, acidoza lactică, metabolism anaerob),
- pierderi de baze (diaree, acidoză tubulară renală).

**b. Alcaloza metabolică**, situație mai rar întâlnită, se poate datora:

- pierderilor de acizi (vomă, pierderi de suc gastric) sau
- administrării de baze în exces.

**c. Acidoza respiratorie** poate fi determinată de:

- depresia centrilor respiratori (supradozări de barbiturice, anestezice);
- obstrucții ale căilor respiratorii (astm bronșic, bronșite, tumori);
- afecțiuni deformante ale peretelui toracic, care împiedică ventilația (cifoscolioza,

deformări ale cutiei toracice);

- boli circulatorii (insuficiența cardiacă congestivă, șocul).

**d. Alcaloza respiratorie** poate apărea în urma:

- hiperventilației (crize isterice, respirație artificială excesivă);
- lipsei de oxigen;
- stimularea toxică a centrilor respiratori (salicilați, hemoragie cerebrală, febră rebelă).

Clasificarea tulburărilor EAB în funcție de originea / cauzele lor, precum și mecanismele compensatorii / corectoare, sunt redate în *Tabelul 3.II*.

### 3.2.2.1 Acidozele

În cazul unei acidoze metabolice, creșterea conținutului în sânge a unor acizi organici consumă capacitatea de tamponare (bicarbonații), cu formarea sărurilor lor și a acidului carbonic. Ca urmare, scăderea cantității bicarbonaților plasmatici semnalizează fidel gravitatea acidozei. Mecanismele compensatorii imediate (*Tabel 3.II*) implică, pe lângă consumarea bicarbonaților, redistribuirea  $H^+$  spre spațiul intracelular, paralel cu creșterea concentrației potasiului seric. Creșterea concentrației potasiului este între 0,1-0,9 mmol/L (în jur de 0,5 mmol/L) pentru scăderea de pH cu 0,1 unități.

Compensarea respiratorie este maximă la 12-24 ore, probabil datorită traversării lente de către protoni a barierei hemato-encefalice spre chemoreceptorii centrului respirator, ceea ce duce la apariția respirației Kussmaul. Pentru scăderea cu 1 mmol/L a concentrației bicarbonatului, presiunea parțială a bioxidului de carbon va scădea cu 1,3 mmHg. Presiunea parțială a  $CO_2$  corespunde aproximativ cu ultimele două cifre ale pH-ului.

Tratament: în cetoacidoză, de obicei situația se remite cu fluide injectabile și insulină, necesitând administrarea de bicarbonat doar în acidoză profundă.

**Tabelul 3.II Tulburări ale echilibrului acido-bazic și compensarea lor imediată**

Tulburări ale EAB	pH	pCO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	BE	Observații
1. Acidoză metabolică					*Stare cu pH și HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> scăzute
necompensată	↓	N	↓	↓	și cu valori negative ale BE;
compensată	N	↓	↓	↓	pCO <sub>2</sub> scade până la pH normal;
2. Alcaloză metabolică					*Stare cu pH și HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> crescute
necompensată	↑	N	↑	↑	și cu valori pozitive ale BE;
compensată	N	↑#	↑	↑	pCO <sub>2</sub> crește până la pH normal;
3. Acidoză respiratorie					*Stare cu creștere primară a pCO <sub>2</sub>
necompensată	↓	↑	N	N	fără modificări ale BE și HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ;
compensată	N	↑	↑	↑	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> crește până la pH normal;
4. Alcaloză respiratorie					*Stare cu scădere primară a pCO <sub>2</sub>
necompensată	↑	↓	N	N	fără modificări ale BE și HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ;
compensată	N	↓	↓	↓	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> scade până la pH normal.

# (limitat, datorită hipoxiei centrului respirator)

Acidoza din insuficiența renală cronică și acidoza tubulară distală se tratează cu cantități mici de bicarbonat, până la 30-60 mEq/zi. În acidoza tubulară proximală se produc pierderi masive de  $\text{HCO}_3^-$ , nu ajută administrarea de bicarbonat, dar restricția de săruri scade pierderile de  $\text{HCO}_3^-$ .

Acidoza lactică răspunde favorabil la administrare de bicarbonat și  $\text{CO}_2$ , acesta din urmă penetrează bariera hematoencefalică, stimulând centrul respirator.

În cazul unei acidoze respiratorii, creșterea acidității sângelui apare în urma unei retenții de bioxid de carbon, cauzate de tulburarea respirației. În urma creșterii cantității bioxidului de carbon crește compensator și cantitatea bicarbonaților în sânge, care în ciuda acidozei existente, poate depăși limita superioară a valorilor normale.

### 3.2.2.2 Alcalozele

Datorită caracterului preponderent acid al produșilor de catabolism, probabilitatea manifestării în organism a unei alcaloze metabolice sau respiratorii este mult mai mică, decât aceea de instalare a acidozelor. Acestea pot apare în urma unor pierderi excesive de acid gastric (vărsături îndelungate) sau prin utilizarea exagerată a bicarbonaților pentru scopuri terapeutice, cu creșterea marcată a rezervei alcaline în plasmă. O alcaloză respiratorie se poate manifesta din cauza unei hiperventilații spontane (în hipoxie) sau mecanice. În cazul acesta, în ciuda alcalozei evidente, din cauza hipocapniei, valoarea rezervei alcaline plasmatice poate fi uneori mult sub limita inferioară a valorii fiziologice.

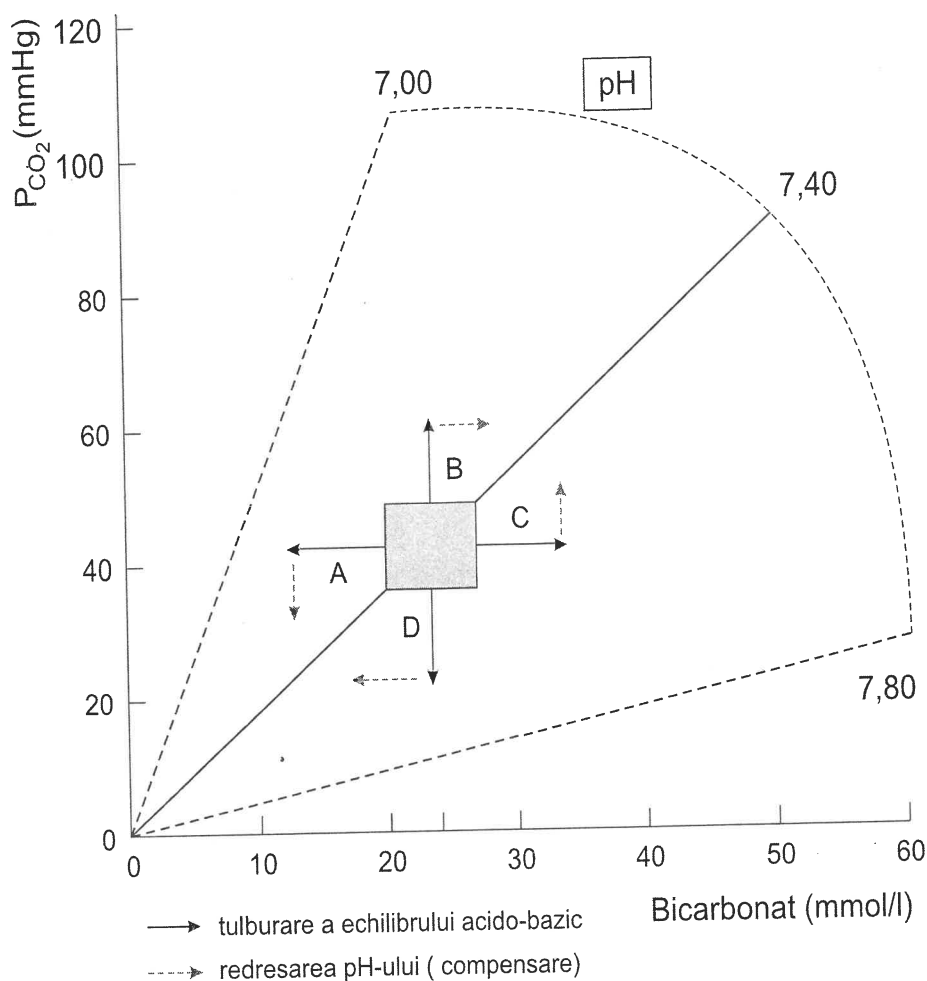
Alcaloza metabolică se asociază cu scăderea potasemiei și calcemiei. Curba de disociere a oxihemoglobinei se deplasează la stânga (crește afinitatea hemoglobinei pentru oxigen). După 6-8 ore crește concentrația 2,3-difosfogliceratului, ceea ce aduce curba de disociere înapoi. Creșterea concentrației bicarbonatului peste 50 mmol/L duce la afectări neurologice (letargie, confuzie, stupoare, agitație, comă).

Compensarea respiratorie se face prin hipoventilație, la presiunea parțială a  $\text{CO}_2$  nu mai mare decât 55 mmHg, deoarece hipoxemia stimulează chemoreceptorii periferici. Pentru o creștere a concentrației bicarbonatului cu 1 mmol/L,  $\text{pCO}_2$  crește cu 1,3 mmHg.

Tratament: creșterea volumului plasmatic cu soluții izotonice pentru a permite rinichiului să excrete bicarbonat (se elimină cu potasiu, de aceea se recomandă suplimentarea de  $\text{K}^+$ ). Rareori intervenția de urgență necesită administrare de săruri acidifiante ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Arginin monohidroclorid).

Modificările rezervei alcaline în cursul diferitelor forme compensate și manifeste ale tulburărilor echilibrului acido-bazic, sunt prezentate grafic în *Figura 3.3*.

Legătura strânsă a metabolismului hidro-mineral și a echilibrului acido-bazic se realizează prin intermediul funcțiilor renale. Dinamismul acestei legături poate fi demonstrat prin prezentarea fenomenelor manifestate în cursul dezvoltării unei alcaloze metabolice. În urma unor vărsături îndelungate se pierd cantități însemnate de acid clorhidric. Concomitent se instalează o hipocloremie, cu creșterea în sânge a cantității bicarbonaților, care înlocuiesc clorurile și duc la manifestarea unei alcaloze metabolice. La nivelul tubilor renali proximali,



**Figura 3.3 Modificarea rezervei alcaline în cursul tulburărilor acute ale echilibrului acido-bazic: A – acidoză metabolică, B - Acidoză respiratorie, C – Alcaloză metabolică, D – Alcaloză respiratorie**

reabsorbția clorurilor și a bicarbonaților este invers proporțională. Cu cât reabsorbția tubulară a clorurilor este mai mică, cu atât se reabsorb în sânge mai mulți bicarbonați.

Restabilirea valorii cloremiei și încărcarea volemică, determină eliminarea renală a excesului de bicarbonați și alcaloza metabolică hipocloremică dispăre. Ca urmare, este evident că în urma instalării unei hipocloremii se manifestă și o alcaloză metabolică, care va fi cu atât mai gravă, cu cât valoarea cloremiei este mai mică.

### 3.2.2.3 Tulburări mixte ale echilibrului acido-bazic

Este oarecum neobișnuit, dar nu imposibil, ca tulburările echilibrului acido-bazic să aibă caracter mixt.

Acidoza metabolică într-o disfuncție renală acută, se poate asocia acidozei respiratorii la un pacient cu suferință respiratorie cronică. Ambele patologii contribuie la scăderea pH-ului (atât prin consumarea bicarbonatului, cât și prin eliminarea deficitară a  $CO_2$ ).

Aspirația nazo-gastrică prelungită poate cauza alcaloză metabolică, accentuată de alcaloza respiratorie determinată de hiperventilație. Ambele situații contribuie la creșterea pH-ului (atât prin formarea în exces a bicarbonatului, cât și prin eliminarea excedentară a  $CO_2$ ).

Există și situații în care cele două perturbări sunt antagoniste (în ceea ce privește efectul asupra concentrației protonilor), ceea ce poate crea impresia de compensare din partea uneia dintre acestea, iar interpretarea parametrilor echilibrului acido-bazic este dificilă:

La pacienți cu suferințe respiratorii cronice, dacă pacientul dezvoltă hipokaliemie în urma abuzului de diuretice tiazidice, la acidoza respiratorie se asociază o alcaloză metabolică.

În supradozele de salicilați, acidoza metabolică se asociază cu alcaloză respiratorie (datorită stimulării toxice a centrului respirator de către salicilați).

În aceste situații aspectele clinice sunt esențiale pentru interpretarea cazului.

### 3.3 POTASEMIA ȘI ECHILIBRUL ACIDO-BAZIC

Modificările potasemiei influențează în mod deosebit echilibrul acido-bazic. În cursul tuturor stărilor cu pierdere de potasiu, conținutul scăzut în  $K^+$  al lichidului extracelular și al plasmei se înlocuiește din celule. În cursul acestei înlocuiri, în schimbul a 3 ioni de  $K^+$  ieșiți din celule, pătrund 2  $Na^+$  și un  $H^+$ . Ca urmare, pe de o parte scade conținutul în  $K^+$  al celulelor, pe de altă parte crește conținutul lor în  $H^+$  (acidoza intracelulară), pe seama scăderii extracelulare a cantității  $H^+$ , ducând la manifestarea unei alcaloze metabolice. Această situație se stabilește și în celulele epiteliului tubular renal, care, în ciuda alcalozei metabolice manifestate în sânge și în lichidul extracelular, excretă ioni de  $H^+$  și reține bicarbonații în sânge (acidurie paradoxală). Ca urmare, în această formă hipopotasemică a alcalozei metabolice, se excretă o urină cu reacție acidă. Această stare se menține și se agravează continuu, până la readucerea la normal a potasemiei. În urma descoperirii și înlăturării factorului cauzal, urmată de restabilirea potasemiei, se corectează spontan și rapid echilibrul, prin reîntrarea ionilor de  $K^+$  în celule, respectiv prin ieșirea din celule a excesului de  $H^+$ .

### 3.4 PREZENTĂRI DE CAZ

#### 3.4.1 COMA ACIDO-CETOZICĂ

O tânără de 20 ani cu masă corporală de 50 kg, este diagnosticată cu diabet zaharat de tip I în urmă cu 4 luni. Ca urmare a unei infecții urinare, pacienta renunță la tratamentul cu insulină; trece și printr-o perioadă de stres intens (sesiunea de examene). Este găsită în stare comatoasă de familie.

La examenul obiectiv pacienta este inconștientă, cu tegumente uscate, este tahipneică și cu halenă acetonică, presiunea arterială = 80/50 mmHg.

Examinările de laborator arată:

- Glicemie: 580 mg/dL
- Parametrii EAB: pH = 7,0;  $pCO_2$  = 30 mmHg; BB (buffer base) = 36 mmol/L,  $HCO_3^-$  = 15 mmol/L, BE = -12 mmol/L, LA = 27 mmol/L
- Ionogramă:
  - $Na^+$ : 147 mmol/L
  - $K^+$ : 5,0 mmol/L
  - $Cl^-$ : 110 mmol/L

**Comentariu:**

Acidoza metabolică decompensată este diagnosticată pe baza valorilor pH-ului și BE. LA confirmă tulburarea echilibrului acido-bazic: se datorează creșterii acizilor nevolatili (corpi cetonici în cazul nostru). Infecțiile și stresul (datorită eliberării excedentare de hormoni cu efect hiperglicemiant) cresc necesarul de insulină la diabetici. Scăderea dozelor de insulină, sau chiar oprirea tratamentului, favorizează apariția cetoacidozei. Pacienții cetoacidotici sunt deshidratați și hipotensivi. Administrarea de lichide parenteral și insulină, sunt obligatorii. Insulina stimulează trecerea  $K^+$  în celule, de aceea concentrația potasiului trebuie strâns monitorizată în cadrul tratamentului comei cetoacidotice. La pH sub 7,1 se adaugă bicarbonat de sodiu. Cantitatea administrată se calculează pe baza formulei:  $BE \text{ (mmol/L)} \times 0,3 \times \text{kg}$  (masă corporală). Pe perioada tratamentului trebuie monitorizați parametrii echilibrului acido-bazic.

**3.4.2 ACIDOZĂ RESPIRATORIE**

O pacientă de 57 ani, fumătoare de peste 30 de ani a peste 20 țigarete / zi, cu frecvente infecții ale căilor respiratorii în antecedente, se prezintă în serviciul de urgență cu dispnee acută. Examinarea parametrilor acido-bazici a arătat:

- pH: 7,35
- $pO_2$ : 46 mmHg
- $pCO_2$ : 55 mmHg
- bicarbonat: 36 mmol/L

**Comentariu:**

Pacienta prezintă o acutizare a patologiei pulmonare obstructive cronice, însoțită de acidoză respiratorie compensată metabolic. Hipoxia este un factor important în menținerea ventilației, de aceea administrarea oxigenului la această pacientă trebuie făcută cu precauție, sub monitorizare atentă a presiunii parțiale a gazelor sanguine.

**3.4.3 ALCALOZĂ RESPIRATORIE CAUZATĂ DE HIPERVENTILAȚIE**

Un tânăr de 25 ani se prezintă în serviciul de urgență în criză de astm bronșic. Parametrii EAB determinați la sosire au arătat următoarele valori:  $pO_2$  – 70 mmHg,  $pCO_2$  – 30 mmHg, pH – 7,5. Pacientul a fost tratat cu salbutamol aerosol (stimulant adrenergic  $\beta_2$ ), sub efectul bronhodilatator al acestuia starea lui ameliorându-se.

**Comentariu:**

Gazele sanguine ale acestui pacient arată o ușoară alcaloză respiratorie, datorată probabil hiperventilației (în cursul căreia  $CO_2$  se elimină, fără o oxigenare eficientă însă). Alcaloza determină o creștere a gradului de legare a ionilor de calciu la proteinele plasmatice, ceea ce va crește excitabilitatea neuro-musculară la pacientul în cauză.

Acidoza respiratorie datorită incapacității de eliminare a  $CO_2$ , apare doar în formele foarte severe de criză astmatică.

### 3.4.4 ALCALOZĂ METABOLICĂ

Pacient de sex masculin, muncitor, 59 de ani, 178 cm, 52 kg, acuză jenă epigastrică de aproximativ 6 luni, grețuri, inapetență, scădere în greutate - 15 kg. De cinci zile, pacientul prezintă vărsături abundente postprandiale (la cca. 2 ore după alimentație); vomismențele conțin resturi alimentare nedigerate. La examinare se constată tegumente și mucoase uscate, palide. Pacientul prezintă de asemenea spasme musculare și hiperexcitabilitate neuromusculară. Ganglion limfatic mărit în zona supraclaviculară stângă. Durere epigastrică la palpare, TA: 110/60 mmHg.

La endoscopie se constată o formațiune tumorală conopidiformă pe curbura mică, extinsă la nivelul pilorului. Examinările de laborator arată:

- Parametrii EAB: pH = 7,5;  $p\text{CO}_2$  = 45 mmHg; BB (buffer base) = 56 mmol/L,  $\text{HCO}_3^-$  = 35 mmol/L, BE = 8 mmol/L, LA = 4 mmol/L
- Ionograma:
  - $\text{Na}^+$ : 145 mmol/L
  - $\text{K}^+$ : 3,0 mmol/L
  - $\text{Cl}^-$ : 115 mmol/L
  - Ca total: 2,5 mmol/L
  - $\text{Ca}^{2+}$ : 0,9 mmol/L

#### **Comentariu:**

Voma prelungită, datorită obstrucției de pilor ca urmare a unei tumori gastrice, poate conduce la alcaloză metabolică. Consecința deficitului de protoni este modificarea raportului între componenta liberă și cea legată de proteinele plasmatiche a calciului seric; simptomatologia secundară caracteristică hipocalcemiei, se datorează scăderii componentei libere. Scăderea potasiului se datorează orientării spre spațiul intracelular la schimb cu protonii, iar creșterea clorurilor – eliminării preferențiale a bicarbonatului la nivel renal.

### 3.4.5 ANEMIA CA ȘI CAUZĂ DE DISPNEE

O persoană de sex masculin de 36 ani se prezintă la un consult medical în urma constatării că la urcarea scărilor dintre două etaje, are dispnee acută și oboseală marcată. Radiografia toracică și electrocardiograma nu au evidențiat nimic semnificativ; gazele sanguine au fost în limite normale. Din anamneza atentă se deduce că pacientul a folosit timp îndelungat antiinflamatorii nesteroidice pentru dureri articulare cronice. Hemograma efectuată a arătat următoarele rezultate: hemoglobina – 10g/dL (normal 13-17 g/dL), volumul corpuscular mediu – 70 fL (normal 80-100 fL), iar feritina serică – 10  $\mu\text{g/L}$  (valoarea normală – 30-300  $\mu\text{g/L}$ ).

#### **Comentariu:**

Simptomatologia și rezultatele de laborator orientează diagnosticul spre o anemie cu deficit cronic de fier, datorat unui ulcer gastric cu pierderi sanguine (cauzat de utilizarea îndelungată a terapiei antiinflamatorii nesteroidice).

### **Bibliografie recomandată**

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – Medical Biochemistry, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.333-344.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E. - Tietz Textbook of Clinical Chemistry and molecular diagnostics. 5rd ed. WB Saunders ELSEVIER, 2012, p.
3. Cucuianu M., Crîșnic I., Pleșca-Manea Luminița – Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică, 1998, p.294-322.
4. Devlin T. – Textbook of Biochemistry, Ed.3, Wiley- Liss, 1992, p. 1025-1058.
5. Guyton A. C. – Textbook of Medical Physiology, Ed. 7, W.B.Saunders Company, 1986, p. 493-502.
6. Marshall W., Bangert S., Lapsley M. – Clinical Chemistry, Ed.7, Mosby, 2012, p.41-61.
7. Marshall W., Lapsley M., Day A.P., Ayling R. – Clinical Biochemistry – Metabolic and Clinical Aspects, Ed. 3, ELSEVIER, 2014, p.65-92.
8. Mayne P.D. – Clinical Chemistry in diagnosis and treatment, Ed 6., Arnold, 1994, p.79-104.
9. McClatchey K.D. – Clinical Laboratory Medicine, Williams & Wilkins, 1994 p. 331-354.
10. Pagana Kathleen, Pagana T. - Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 69-71, 157-161.

# 4

## Metabolismul calciului, fosforului și magneziului

Ioana Brudașcă, Mircea Cucuianu,  
Minodora Dobreanu

Cea mai mare parte din cantitatea de calciu (90%), fosfor (85%) și circa jumătate din cantitatea de magneziu se găsesc în oase. În afară de rolul lor structural, aceste elemente îndeplinesc numeroase roluri fiziologice. Astfel, ionii de calciu intervin în modificarea permeabilității membranelor celulare, scăderea excitabilității neuromusculare și stimularea contracției miocardului, în hemostază (stimularea agregării plachetare, coagulare) și activarea unor sisteme enzimatice.

Fosforul (sub formă de fosfați) participă la menținerea echilibrului acidobazic prin formarea unor sisteme tampon precum și la formarea legăturilor fosfatice macroergice (ATP, creatinfosfat).

Magneziul intracelular joacă un rol catalitic esențial în sinteza proteinelor și eliberarea de energie, iar fracțiunea extracelulară intervine alături de calciu în modularea excitabilității neuromusculare și a activității cardiace.

Între aceste elemente există relații complexe, motiv pentru care ele vor fi discutate în cadrul aceluiași capitol.

### 4.1 METABOLISMUL CALCIULUI

#### 4.1.1 DATE REFERITOARE LA FIZIOLOGIA CALCIULUI

##### 4.1.1.1 Repartizarea calciului în organism

Calciul este cationul cel mai bine reprezentat din organism (aproximativ 1100 g), din care majoritatea (peste 1000 g) se găsește în schelet. Circa 10 g de calciu sunt cantonate intracelular, iar calciul extracelular se găsește în cantitate de aproximativ 1 g.

##### 4.1.1.1.1 Calciul din oase

Oasele sunt formate dintr-o matrice organică (care reprezintă circa 30% din greutatea unui os compact), pe care se depun sărurile de calciu, precum și din celule cu rol în formarea și resorbția oasoasă.

Matricea organică este formată în proporție de 90-95% din fibre de collagen tip I, restul fiind reprezentat de o substanță fundamentală ce conține glicozaminoglicani (acid hialuronic, condroitinsulfat). Orientarea spațială a fibrelor de collagen conferă osului o densitate maxi-

mă pe unitatea de volum. Prin modificări posttranslaționale, în și între fibrele de collagen se formează legături încrucișate pirolice și piridinolinice, cu rol esențial în consolidarea matricii proteice osoase. Colagenul conține doi aminoacizi specifici, hidroxilizină și hidroxiprolină, iar în caz de degradare a colagenului, eliminarea urinară a acestora poate furniza indicii despre rata de catabolizare a proteinelor din țesutul osos.

Matricea organică este impregantă cu săruri de calciu  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6](\text{OH})_2$  care în formă cristalizată sunt identice cu hidroxiapatita. Țesutul osos conține și ioni de magneziu, potasiu, carbonat, complexați în cristalele de hidroxiapatită. În condiții patologice osul poate fixa elemente radioactive (uraniu, radium, stronțiu).

Osul se remodelează continuu ca răspuns la stimuli mecanici, acest proces constând în sinteza și degradarea ciclică a colagenului și proteinelor matricii extracelulare, precum și în eliberarea/depunerea sărurilor de calciu. În procesul de remodelare intervin diferitele tipuri de celule osoase, precum și o serie de proteine din matricea osoasă.

Osteocitele sunt celule osoase mature, cu rol în formarea osului, menținerea matricii osoase, homeostazia calciului, și care funcționează ca senzori mecanici (reglează răspunsul osului la stimuli mecanici).

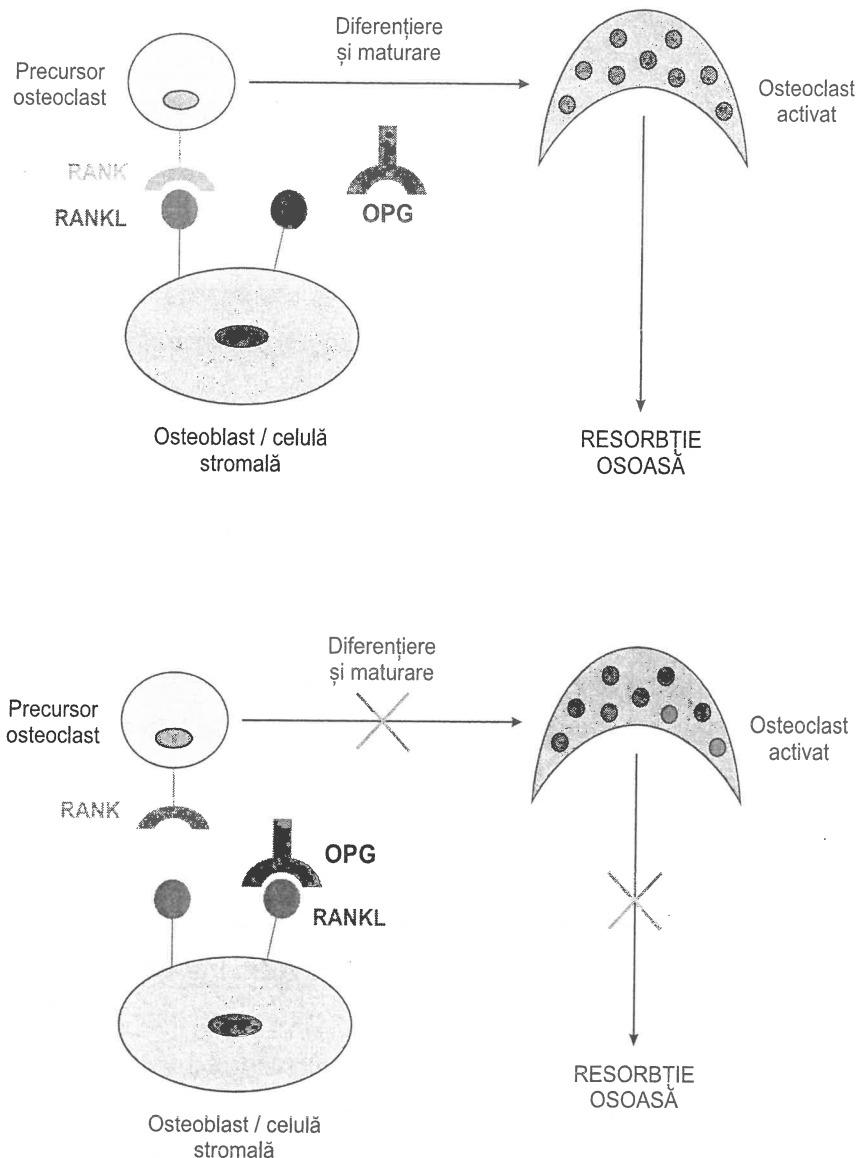
Osteoblastele sunt celule mononucleate formatoare de os (osteoid), care secretă fosfatază alcalină ce hidrolizează fosfații organici (de exemplu fosfoetanolamina din structura cefalinelor). Fosfatul anorganic eliberat va precipita cu calciul sub formă de fosfați de calciu insolubili, contribuind astfel la mineralizarea osului.

Osteoblastele reprezintă un element cheie în remodelarea osoasă, intervenind nu doar în formarea osoasă, ci și în resorbția osoasă prin implicarea lor în diferențierea și activarea osteoclastelor.

Osteoclastele sunt celule multinucleate, responsabile de resorbția osoasă prin producerea de enzime proteolitice care degradează matricea proteică a osului și eliberează sărurile de calciu. Osteoclastele se formează din celule precursorare mononucleate (din care se formează și macrofagele). În reglarea diferențierii osteoclastelor intervine un sistem format din activatorul receptorului factorului nuclear- $\kappa\text{B}$  (RANK), ligandul acestuia (RANKL) exprimat de către osteoblaste și o proteină numită osteoprotegerină (OPG). Prin legarea RANKL (exprimat pe suprafața osteoblastelor) de RANK (care se găsește pe precursorii osteoclastelor) se produce diferențierea osteoclastelor (fuzionarea acestora în osteoclaste mature, multinucleate) și deci resorbția osoasă. Cuplarea OPG (un receptor "capcană") cu RANKL împiedică acest proces, astfel osteoprotegerina protejează scheletul de o resorbție osoasă excesivă. De asemenea OPG protejează arterele față de calcificarea mediei. Expresia RANKL, RANK și a OPG sunt influențate de numeroși factori, printre care PTH, hormonii estrogeni și androgeni, glucocorticoizii, acest sistem reprezentând un element esențial în remodelarea osoasă și în menținerea homeostaziei calciului (vezi și 4.1.1.3 Reglarea calcemiei).

Acest sistem este reprezentat schematic în figura 4.1.

Exprimarea osteoprotegerinei este reglată de un sistem de semnalizare prezent în osteoblaste, Wnt/ $\beta$ -catenin. Astfel, masa osoasă pare să fie determinată de interacțiunea



**Figura 4.1 Mecanismul de acțiune al osteoprotegerinei.** Legarea RANK de RANKL induce diferențierea și maturarea osteoclastelor, având ca efect resorbția osoasă. Legarea OPG de RANKL inhibă acest proces. RANK - activatorul receptorului factorului nuclear- $\kappa$ B  
RANKL- ligandul activatorului receptorului factorului nuclear- $\kappa$ B. OPG – osteoprotegerină

dintre osteoblaste și osteoclaste și de două căi majore de semnalizare: RANKL/RANK și Wnt/  $\beta$ -catenin.

**Osteonectina** este o glicoproteină acidă secretată de osteoblaste, implicată în mineralizarea osoasă. Osteonectina leagă collagenul și hidroxiapatita și intervine în reglarea proliferării celulare (inclusiv angiogenează), precum și în interacțiunile între celule și matricea extracelulară prin producerea de matrixmetaloproteinaze.

**Osteopontina (OPN)** intervine în remodelarea osoasă prin fixarea osteoclastelor în matricea extracelulară. În afară de acest efect, ea are proprietăți chemotactice, este o proteină de adeziune, implicată în activarea celulară și producția de citokine, în apoptoză. Prin interacțiunea sa cu diferiți receptori celulari este implicată în vindecarea plăgilor, tumorigeneză, inflamație, ischemie, răspunsul imun. Osteopontina a fost identificată și al nivelul plăcilor

de aterom. OPN pare să joace un rol și în protecția căilor urinare față de formarea calculilor de oxalat de calciu.

**Calcificarea oaselor.** În stadiul inițial, osteoblastele secretă collagen, proteoglicani și glicoproteine care formează matricea extracelulară a osului, ducând la formarea unui țesut numit osteoid. În câteva zile de la formarea osteoidului, sărurile de calciu precipită la suprafața fibrelor de collagen. În faza inițială, aceste săruri sunt amorfe, suferind ulterior o restructurare prin care se formează cristalele de hidroxiapatită în decurs de săptămâni sau luni. Circa 20-30% din săruri rămân totuși permanent sub formă amorfă, acestea putând fi rapid mobilizate la nevoie.

O proteină importantă în remodelarea și mai ales în mineralizarea țesutului osos este osteocalcina, secretată de osteoblaste. Cea mai mare parte a osteocalcinei este cantonată la nivelul oaselor, existând însă și o mică cantitate de osteocalcină circulantă. Nivelul seric de osteocalcină se corelează cu remodelarea și mai ales cu formarea osoasă. Osteocalcina poate suferi un proces de  $\gamma$  carboxilare mediat prin acțiunea vitaminei K (două grupări carboxil legate de același atom de carbon în poziția  $\gamma$ ) pe care se fixează ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  din hidroxiapatită. Din acest motiv în timpul sarcinii este contraindicat tratamentul cu antagoniști ai vitaminei K, care ar putea produce malformații osoase fetale. Gradul de carboxilare a osteocalcinei este variabil, existând și forme incomplet carboxilate, atât în os cât și în circulație.

Recent s-a atribuit osteocalcinei un rol modularea sensibilității la insulină și homeostazia glucozei. Studii experimentale au demonstrat că animalele lipsite de gena osteocalcinei prezintă scăderea numărului de celule beta pancreatice, intoleranță la glucoză și rezistență la insulină.

Studii epidemiologice au evidențiat o relație inversă între nivelul de osteocalcină circulantă totală și obezitate, glicemie, precum și cu morbiditatea și mortalitatea cardiovasculară. S-a mai constatat că la unii pacienți diabetici ameliorarea echilibrului glicemic se asociază cu o creștere a osteocalcinei serice. Alte studii au evidențiat că osteocalcina circulantă induce producția de testosteron.

Datele de mai sus evidențiază că, departe de a fi o structură inertă, țesutul osos intervine nu doar în homeostazia calciului și fosfaților ci și în numeroase alte procese metabolice.

**Calcificarea țesuturilor moi** este un proces patologic care se produce la nivelul vaselor, valvelor cardiace, rinichilor, cartilagiilor, cu consecințe clinice severe. În condiții fiziologice, vasele sunt protejate de calcificare datorită prezenței unor inhibitori, cum ar fi pirofosfatul, matrix gla protein (MGP), fetuin -A. Aceasta din urmă își exercită efectul protector prin stabilizarea soluțiilor minerale suprasaturate, deficitul de fetuin A fiind asociat cu calcificări ale țesuturilor moi și o mortalitate ridicată prin evenimente cardiovasculare la pacienții cu hemodializă cronică. Deficitul acestor mecanisme inhibitorii favorizează calcificarea vasculară. Un alt fenomen implicat în calcificarea vasculară este declanșarea mecanismelor osteogene la nivelul vaselor, un argument fiind detectarea unor proteine osoase (osteocalcină, osteopontină) în leziunile de calcificare vasculară. Turnoverul osos accelerat, cu eliberarea în

circulație a complexelor de apatită ar putea explica relația între osteoporoză și calcificările vasculare la menopauză. Prezența detrisurilor celulare la nivelul peretelui vascular (așa cum se întâmplă în ateroscleroză) furnizează suprafețe fosfolipidice propice pentru nucleația cristalelor de apatită. Nivelele crescute de calciu și fosfor și un produs fosfo-calcic crescut amplifică calcificarea vasculară inițiată prin mecanismele descrise anterior.

#### 4.1.1.1.2 Calciul intracelular

Această fracțiune intervine în procesele de endo și exocitoză, în reglarea contracției musculare, în motilitatea celulară, precum și în procesele de semnalizare, fiind un mesager de ordinul doi pentru diferiți hormoni. Acest efect se exercită prin interacțiunea cu proteine care leagă calciul (calmodulina, troponina, calbindin D).

Între calciul intracelular și cel extracelular există un gradient de concentrație de circa 104 mol/l, iar în interiorul celulelor, acest gradient ajunge la 106 mol/l între citoplasmă și depozitele intracelulare (reticul sarcoplasmatic, mitocondrii, sistemul tubular dens din plachetele sangvine).

#### 4.1.1.1.3 Calciul plasmatic

Concentrația calciului total din plasmă este de aproximativ 10 mg/dl, respectiv 2,5 mmol/l. Aproximativ 45% din calciul plasmatic circula fixat pe proteine (din care 80% pe albumine și 20% pe  $\gamma$  globuline), constituind o formă neionizată și nedifuzibilă, inactivă fiziologic. Circa 7% din calciul circulant este fixat pe fosfat, citrat, bicarbonat (fracțiune difuzibilă dar neionizată). Restul calciului plasmatic se găsește sub formă de calciu ionic, fiziologic activ. De notat că în alcaloze protonii se eliberează de pe albumină, care fixează în schimb ioni de calciu. Astfel, scade nivelul calciului ionic, fără modificarea calciului total.

Cantitatea de albumină plasmatică influențează nivelul calciului total, acesta fiind fals modificat în caz de hipo sau hiperalbuminemii reale sau aparente. Aceasta impune o corecție a calcemiei în funcție de albumină conform formulei:

$$\text{Calciu corectat (mmol/l)} = \text{calciu determinat (mmol/l)} + 0,02 (40 - \text{albumină})$$

în care 40 reprezintă cantitatea medie de albumină în g/l

Calciul ionic se poate doza direct, cu ajutorul electrozilor selectivi, sau se poate estima printr-o formulă care ține cont de concentrația calciului total și cea a proteinelor plasmatice.

$$\text{Ca}^{2+} = (6\text{Ca} - \text{Pr}/3) / \text{Pr} + 6$$

în care Ca = calcemia în mg/dl; Pr = proteinemia în g/dl

#### 4.1.1.2 Echilibrul calciului în organism

Cantitatea totală de calciu din organism depinde de echilibrul dintre aport și pierderi. Studii cu izotopi radioactivi au demonstrat că între compartimentele calciului schimburile sunt

permanente, atingând nivele de până la 100-300 mg/oră. Având în vedere că atât absorbția intestinală cât și eliminarea urinară de calciu sunt mult inferioare acestor cifre, rezultă că homeostazia calciului se realizează în principal pe seama schimburilor rapide între calciul plasmatic și cel din compartimentul osos și celular.

**Aportul de calciu** depinde de regimul alimentar și de capacitatea de absorbție a intestinului. Alimentele bogate în calciu sunt produsele lactate, ouăle, sardelele, iar dintre alimentele de origine vegetală soia, smochinele, caisele, semințele de susan. În cazul unui aport scăzut de calciu, calciul este absorbit în principal la nivelul marginii în perie a celulelor epiteliale din duoden, printr-un mecanism transcelular activ. În acest mecanism intervin calbindin, o proteină dependentă de vitamina D prezentă în enterocite, care împreună cu TRPV6 și pompa de calciu (PMCA1) asigură absorbția activă a calciului.

În cazul unui aport mare de calciu, absorbția se face în principal în jejun și ileon, printr-un mecanism paracelular pasiv, independent de vitamina D.

Absorbția calciului este diminuată în prezența oxalaților, a fosfaților, a acidului fitic. Excesul de acizi grași (steatoree, deficit de bilă) favorizează formarea săpunurilor insolubile de calciu, scăzând absorbția acestuia. Unele medicamente cum ar fi tetraciclina, doxiciclina diminuează absorbția calciului. Calciul neabsorbit se elimină pe cale digestivă.

Necesarul de calciu este prezentat în tabelul 4.1 și diferă în funcție de vârstă și de starea fiziologică.

**Tabelul 4.1 Necesarul de zilnic de calciu în funcție de vârstă și starea fiziologică**

Grup	Necesar de calciu (mg/zi)
Copii	
0-6 luni	300
7-12 luni	400
1-3 ani	500
4-6 ani	600
7-9 ani	700
Adolescenți	
10-18 ani	1300
Femei	
19 ani-menopauză	1000
postmenopauză	1300
Bărbați	
19-65 ani	1000
după 65 de ani	1300
Sarcină (ultimul trimestru)	1200
Lactație	1000

**Pierderile de calciu** se produc prin urină și fecale. Calciul eliminat pe cale digestivă este constituit din calciul alimentar neabsorbit precum și din cel secretat activ în intestin.

Excreția urinară de calciu este de 100-200 mg/24 de ore și depinde de conținutul în calciu al alimentelor. Excreția urinară este accentuată de către hipercalcemie, hipofosfate-

mie, acidoză, precum și de un exces de glucocorticoizi, în timp ce parathormonul diminuează eliminarea urinară de calciu. Aproximativ 2/3 din calciul din filtratul glomerular este reabsorbit în porțiunea ascendentă a ansei Henle și în tubii distali. Rolul major în reglarea ratei de excreție a calciului este jucat de parathormon (Figura 4.2.)

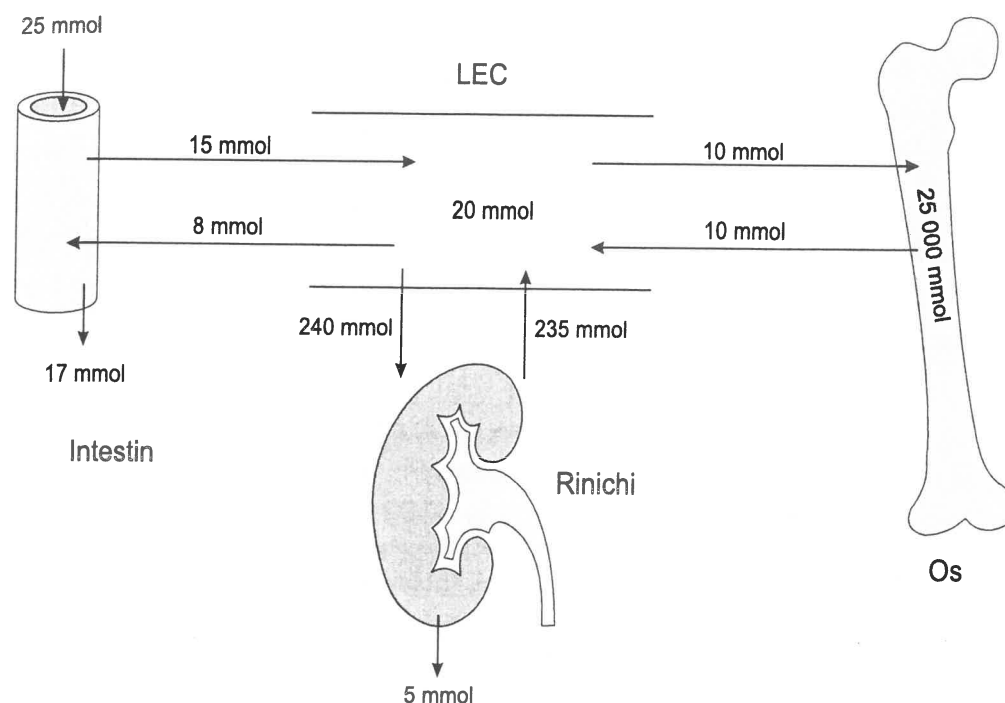


Figura 4.2 Homeostazia calciului în organism

#### 4.1.1.3 Reglarea calcemiei

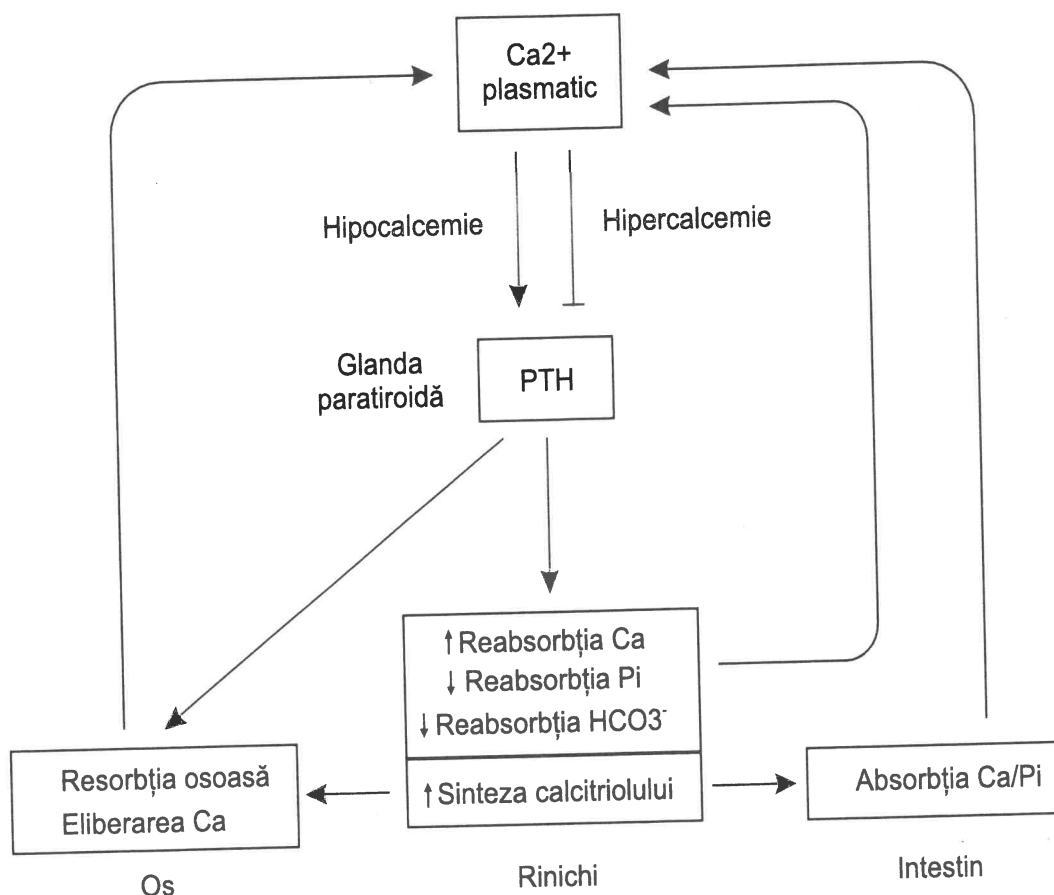
Elementele cheie în reglarea calcemiei sunt calcemia, fosfemia, parathormonul și 1,25 dihidroxi vitamina D (calcitriolul). Principalul factor de reglare a calcemiei este parathormonul, cu efect hipercalcemiant. Calcitonina, produsă de glanda tiroidă are efect hipocalcemiant. Ținta principală a acestor hormoni este calciul osos. Vitamina D crește absorbția calciului din intestin și în cantități fiziologice favorizează acțiunea parathormonului.

În figura 4.3 sunt reprezentate schematic mecanismele de reglare a calcemiei.

##### 4.1.1.3.1 Hormonul paratiroidian (PTH)

Este un hormon polipeptidic secretat de glandele paratiroide, fiind mediatorul major al remodelării osoase și al menținerii homeostaziei calciului. PTH este secretat ca răspuns la scăderea concentrației calciului plasmatic prin intermediul unui receptor specific Ca sensibil (Ca Sensing Receptor CaSR). Mecanismul de feed back între calcemie și eliberarea de PTH este foarte prompt (de ordinul minutelor) și foarte sensibil la variații mici ale calcemiei.

În cazul unei hipocalcemii persistente (sarcină, lactație, rahitism) glandele paratiroide se hipertrofiază, iar în cazul în care concentrația calciului este crescută, activitatea paratiroidelor scade și dimensiunile lor se reduc (cum se întâmplă în cazul unui aport alimentar crescut de calciu sau de vitamina D sau în resorbția osoasă produsă de imobilizarea prelungită).



**Figura 4.3 Controlul hormonal al metabolismului calciului**

PTH acționează la nivelul a trei organe țintă: os, țesut și intestin. Intervenția sa are loc prin legarea PTH de receptorul său, care la rândul său activează AMPc prin intermediul unor proteine reglatoare numite Guanine Nucleotide Regulatory Proteins.

La nivel osos PTH acționează în două etape: prima fază, foarte rapidă, duce la eliberarea promptă a fosfaților de calciu din sărurile amorfe, prin activarea unei pompe de calciu.

A doua fază este mai lentă (zile) și constă în activarea osteoclastelor care produc resorbția osoasă, inclusiv a matricii organice. Osteoclastele mature nu au receptori pentru PTH. Activarea lor se produce indirect, prin intermediul sistemului RANK/RANKL/ osteoprotegerină descris anterior. PTH acționează asupra pro-osteoblastelor (celule stromale), determinând creșterea sintezei RANKL și diminuarea sintezei de OPG. Ca urmare este favorizată legarea RANKL de RANK situat pe precursorii osteoclastelor și drept consecință diferențierea și activarea osteoclastelor. Acest mecanism se soldează cu creșterea calciului și fosfaților în lichidul extracelular.

La nivel renal, PTH produce o eliminare crescută a fosfaților (cu hipofosfatemie consecutivă) și o creștere a reabsorbției tubulare de calciu. De asemenea, parathormonul induce sinteza de 1 $\alpha$  hidroxilază renală, care determină activarea vitaminei D.

Astfel, acțiunea PTH la nivel intestinal se exercită indirect, prin intermediul formei activate a vitaminei D și constă în creșterea absorbției intestinale de calciu și de fosfați.

#### 4.1.1.3.2 Calcitonina

Calcitonina este un hormon polipeptidic sintetizat și secretat de celulele parafoliculare C ale tiroidei. Ea are un efect hipocalcemiant, care se exercită prin inhibarea resorbției osoase. Acest efect se produce pe de o parte prin inhibarea formării de osteoclaste multinucleate și pe de altă parte prin acțiunea asupra receptorilor pentru calcitonină de pe osteoclastele mature, determinând reducerea dimensiunii, mobilității și capacității resorbtive a acestora. La adult efectul calcitoninei asupra calcemiei este mai slab decât la copil, datorită ratei mai reduse de resorbție osoasă.

Eliberarea calcitoninei din celulele parafoliculare este stimulată de creșterea calcemiei. Calcitonina acționează foarte rapid, atingând un maxim de secreție după o oră (PTH atinge un maxim de secreție după 3-4 ore) și constituie un mecanism de reglare pe termen scurt a calcemiei, fiind contracarat de răspunsul paratiroidian mult mai amplu (fapt demonstrat de menținerea nivelului calcemiei de către PTH singur după ablația tiroidei, în lipsa calcitoninei).

În afară de calcemie, secreția de calcitonină este stimulată și de hormonii gastrointestinali (gastrina, secretina, colecistokinina), mecanism prin care se previne o eventuală hipercalcemie postprandială.

Administrarea de vitamină D activă crește nivelul plasmatic de calcitonină. Atât calcitonina cât și forma activă a vitaminei D sunt crescute în sarcină și lactație, sugerând un rol protector al calcitoninei pentru scheletul matern.

Rolul fiziologic al calcitoninei pare să fie mai degrabă de a modula procesul de resorbție osoasă, prevenind pierderile osoase excesive în situații cum ar fi creșterea rapidă, sarcina, lactația și în unele stări patologice asociate cu un turnover osos crescut (boala Paget, tireotoxicoză).

Un aspect interesant este că același transcript primar al genei calcitoninei produce în tiroidă formarea calcitoninei iar în sistemul nervos sinteza unui peptid CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) cu rol de neuromediator.

#### 4.1.1.3.3 Vitamina D

Vitamina D (făcând parte din grupul vitaminelor liposolubile) intervine în homeostazia calciului favorizând absorbția de calciu și fosfați din intestin și participând la procesul de mineralizare osoasă. Se descriu mai multe forme ale vitaminei D: vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol), de origine vegetală, și colecalciferolul de origine animală. Alimentele bogate în vitamina D sunt ficatul, gălbenușul de ou, uleiul de pește, ciupercile, soia.

Colecalciferolul se poate sintetiza din 7-dehidrocolesterol în tegumente (în stratul bazal și spinos al dermului) sub acțiunea radiațiilor UV (în domeniul de lungime de undă cuprins între 295-300 nm). Aceasta cale furnizează aproximativ 80-90% din cantitatea de vitamină D.

Pentru a deveni biologic activă, vitamina D suferă o hidroxilare în poziția 25 în ficat, rezultând 25 hidroxicolecalciferol (25OH D). Pacienții cu afecțiuni hepatice parenchimatose sau colestatice severe pot prezenta nivele scăzute ale 25OH D. Inducerea sistemului microsomal hepatic (barbiturice) se poate solda cu o rată crescută a metabolizării și inactivării vitaminei D, apărând manifestări de osteomalacie sau rahitism.

O a doua hidroxilare realizată de către  $1\alpha$  hidroxilaza renală are loc în poziția 1 la nivelul tubilor contorți proximali în rinichi. Această ultimă etapă este reglată prin feedback negativ de către produsul final (1,25 dihidroxicolecalciferol sau calcitriol), precum și de către ionii de calciu și fosfat (efecte exercitate prin intermediul PTH).

Diferitele forme ale vitaminei D circulă în plasmă pe o proteină transportoare specifică (vitamin D Binding Protein - VDBP) care pe lângă rolul strict de transport intervine și în reglarea răspunsului la vitamina D, controlând cantitatea de substrat disponibilă pentru  $1\alpha$  hidroxilază. Sinteza vitaminei D este reprezentată schematic în figura 4.4.

Vitamina D acționează la nivelul unor receptori intracelulari, efectul său fiind cel al unui hormon.

La nivelul enterocitelor se leagă de un receptor intranuclear (VDR) care se comportă ca un factor de transcriere modulator al expresiei unor gene. Această cale de semnalizare se soldează cu sinteza unei proteine, calbindin, care transportă calciul din lumenul intestinal spre citoplasma celulelor, de unde calciul trece în sânge prin difuzie facilitată. Vitamina D intervine în mai mică măsură și în absorbția fosfaților și magneziului la nivel intestinal.

În țesutul osos, vitamina D stimulează mineralizarea. Legarea calcitriolului de receptori prezenți în osteoblaste induce sinteza de fosfatază alcalină și de osteocalcină, fiind astfel favorizată formarea și depunerea fosfatului de calciu. Ca efect minor la nivelul osului, vitamina D stimulează resorbția calciului din osul mineralizat prin creșterea expresiei RANKL.

Rolul vitaminei D nu se limitează la mineralizarea osoasă și menținerea homeostaziei calciului. Receptori pentru vitamina D sunt prezenți și în alte celule, vitamina D având un rol imunomodulator, anticanceros și de protecție contra bolilor cardiovasculare.

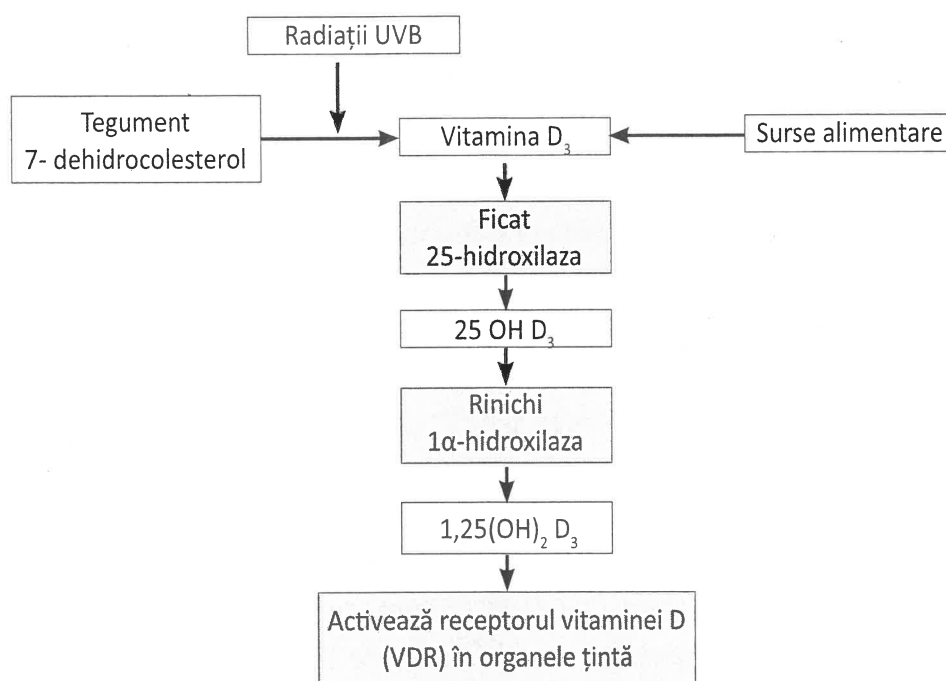


Figura 4.4 Sinteza vitaminei D

#### 4.1.1.3.4 Alți factori care influențează reglarea calcemiei

Hormonul de creștere STH prin stimularea paratiroidei crește sinteza de PTH. Pe de altă parte, prin intermediul factorilor de creștere insulin-like IGF-I și IGF-II determină creșterea scheletului.

Hormonii tiroidieni stimulează resorbția osoasă osteoclastică.

Glucocorticoizii au efect hipocalcemiant, inhibând efectul PTH. Prin creșterea sintezei de RANKL și scăderea sintezei de OPG aceștia au un efect resorbtiv asupra matricii organice a osului.

Hormonii estrogeni și androgeni, au un efect protector asupra matricii osoase prin creșterea sintezei de OPG la nivelul osteoblastelor.

### 4.1.2. PERTURBĂRI ALE METABOLISMULUI CALCIULUI

#### 4.1.2.1 Hipocalcemiile

În prezența unei hipocalcemii este important să se precizeze dacă scăderea calciului se realizează pe seama calciului ionizat sau pe seama celui legat de proteine. Astfel, hipoalbuminemia aparentă (prin hemodiluție) sau reală (sindrom nefrotic, malnutriție) duce la scăderea calciului total, fără a influența calciul ionic, care reprezintă de fapt fracțiunea funcțională a calciului.

Hipocalcemiile cu impact clinic se produc prin scăderea calciului ionic. De notat că în condiții de alcaloză o hipocalcemie latentă poate să se agraveze prin diminuarea calciului ionic care se leagă în mai mare măsură de proteine.

Manifestările clinice în hipocalcemie se traduc prin creșterea excitabilității neuromusculare (fibrilații și fasciculații musculare, parestezii, pozitivarea semnelor Chvostek și Trousseau), perturbări de ritm cardiac cu prelungirea intervalului QT pe ECG, tulburări trofice ale părului și unghiilor, cataractă în hipocalcemia cronică, iritabilitate, depresie. În hipocalcemia severă (tetanie) apare o creștere a tonusului muscular, spasme ale musculaturii extremităților (mână de mamoș, carpopedalospasm), spasm glotic și stridor laringian, uneori convulsii generalizate și chiar manifestări cardiovasculare (sincopă, criză de angor).

Hipocalcemia acută, simptomatică necesită administrarea de calciu, de regulă sub formă de gluconat de calciu 10%. Este important să se identifice și să se corecteze și eventualele alte dezechilibre electrolitice (potasiu, magneziu), precum și pHul.

##### 4.1.2.1.1 Hipoparatiroidismul

Poate fi dobândit sau ereditar. Hipoparatiroidismul dobândit apare în contextul radioterapiei în zona cervicală, după ablația chirurgicală a paratiroidelor, în boli infiltrative (metastaze, amiloidoză). Hipoparatiroidismul ereditar apare ca o entitate izolată sau în asociere cu alte manifestări endocrine (sindrom di George).

În deficitul de PTH se produce o mobilizare redusă a calciului din oase și o scădere eliminării urinare a fosfaților. Astfel, modificările de laborator în hipoparatiroidism evidențiază scăderea calcemiei, creșterea fosfatemiei și nivele scăzute ale PTH.

**Pseudohipoparatiroidismul** se caracterizează printr-o lipsă de răspuns la acțiunea PTH, cauzată de perturbări ale căii de semnalizare, putând afecta receptorul PTH, generarea de cAMP sau proteinele reglatoare (Guanine Nucleotide Regulatory Proteins). În funcție de mecanismele moleculare implicate au fost descrise mai multe tipuri de pseudohipoparatiroidism. Spre deosebire de hipoparatiroidismul real, pacienții cu pseudohipoparatiroidism prezintă nivele normale sau crescute ale PTH.

#### 4.1.2.1.2 Deficitul de vitamină D

**Rahitismul carențial** are drept cauză deficitul de vitamină D. La adult carența de vitamină D se traduce prin osteomalacie.

Cauzele deficitului de vitamină D sunt reprezentate de:

- deficitul sintezei tegumentare de vitamină D (expunere insuficientă la radiații UV)
- aportul insuficient de vitamină D
- creșteri rapide în greutate cu necesar crescut de vitamină D (prematuri, gemeni)
- afecțiuni care produc perturbarea absorbției (boală celiacă, by-pass gastric, pancreatită cu steatoree)
- boli hepatice (ciroză, hepatită cronică) în care apare un deficit al 25 hidroxilazei vitaminei D, un deficit de sinteză a proteinei transportoare a vitaminei sau deficit de absorbție a vitaminei D datorită colestazei
- insuficiență renală cronică în care este perturbată hidroxilarea în poziția 1 a vitaminei D

Carența de vitamină D duce la un deficit de absorbție intestinală a calciului, cu tendință spre hipocalcemie. Hipocalcemia induce o secreție crescută de PTH, care tinde să restabilească calcemia pe seama mobilizării sale din oase. La nivelul țesutului osos se produce o proliferare a osteoblastelor care secretă fosfatază alcalină. Histologic, predomină osteoidul necalcificat.

Manifestările clinice la copil sunt dominate de modificările osoase caracteristice: închiderea tardivă a fontanelii, prezența boselor frontale, deformarea toracelui, stern în carenă, mătăanii costale, brățări radiale, boselări ale tibiei, modificări ale coloanei vertebrale.

Din punct de vedere al parametrilor de laborator se va înregistra o scădere a vitaminei D, hipocalcemie, hipofosfatemie, hiperfosfaturie, creșterea fosfatazei alcaline și a PTH.

La administrarea de vitamină D hiperparatiroidismul se remite, cu normalizarea sau chiar creșterea tranzitorie a fosfatemiei. Mineralizarea osoasă marcată din această perioadă poate provoca o scădere accentuată a calciului plasmatic, care în lipsa unei administrări exogene de calciu poate duce la tetanie.

**Rahitismul pseudocarențial** apare ca urmare a unei mutații a genei 1 $\alpha$  hidroxilazei, ceea ce duce la scăderea metabolitului activ al vitaminei D și implicit la scăderea absorbției digestive a calciului. Această anomalie a fost denumită rahitism pseudocarențial, deoarece doze mari de vitamina D pot normaliza tabloul clinic și biologic.

**Rahitismul vitamino D rezistent** este o anomalie genetică extrem de rară, produsă de mutații ale receptorului pentru vitamina D.

#### 4.1.2.1.3 Insuficiența renală cronică

În insuficiența renală cronică se reduce conversia 25-OH D la 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, mai ales când rata filtrării glomerulare scade sub 30 ml/min. De asemenea retenția de acizi organici care fixează calciul într-o formă neionizabilă poate contribui la scăderea calcemiei. Hipocalcemia duce la o creștere secundară a secreției de PTH, producând osteodistrofia renală.

#### 4.1.2.1.4 Pancreatita acută

În această situație lipaza eliberată din țesuturile necrozate produce lipoliză, cu eliberarea de acizi grași liberi, care precipită cu calciul (saponificare), formând depuneri retroperitoneale. Se incriminează de asemenea și eliberarea de calcitonină stimulată de către glucagon și scăderea secreției de PTH. În plus, hipoalbuminemia poate contribui la scăderea calciului total. La pacienții alcoolici, carența alimentară de calciu și vitamină D precum și hipomagneziemia pot fi factori favorizanți ai apariției hipocalcemiei.

#### 4.1.2.1.5 Alte cauze de hipocalcemie

##### *Hipomagneziemia*

Hipomagneziemia severă poate produce o hipocalcemie rezistentă la administrarea de calciu și vitamină D. Mecanismul hipocalcemiei constă într-o rezistență la PTH la nivelul osului și rinichiului, precum și într-o secreție scăzută de PTH. Corectarea magneziemiei normalizează rapid nivelul PTH, sugerând că hipomagneziemia afectează mai degrabă eliberarea PTH decât sinteza lui.

##### *Hiperfosfatemia*

Fosfații leagă calciul cu aviditate, producând hipocalcemie. Hiperfosfatemia apare în caz de insuficiență renală, distrucții tisulare masive (rhabdmioliză, distrucții tumorale), pacienți în stare critică sau administrarea de clisme fosfatate.

##### *Sindromul de os înfometat (hungry bone syndrome)*

Intervenția chirurgicală pentru corecția hiperparatiroidismului primar sau secundar poate avea ca efect o hipocalcemie severă, datorată unei remineralizări osoase marcate, care depășește rata resorbției osoase mediată de osteoclaste.

O situație similară (deși mai puțin severă) apare după corecția tireotxicozei și la administrarea de vitamină D în osteomalacie. În toate aceste situații hipocalcemia survine ca urmare a mineralizării unei mase importante de țesut osteoid.

##### *Hipocalcemii produse de medicamente*

Hipocalcemia și osteomalacia au fost descrise în tratamentul prelungit cu anticonvulsivante (fenitoin, fenobarbital), mecanismul responsabil fiind o inducere a citocromului P<sub>450</sub> cu accelerarea catabolismului vitaminei D.

Hipocalcemia simptomatică în timpul transfuziilor cu sânge citratat este rară, deoarece indivizii sănătoși metabolizează rapid citratul. La subiecții cu afecțiuni hepatice și renale la

care metabolizarea citratului este afectată, transfuziile masive cu sânge citratat pot duce la scăderi marcate ale calcemiei.

Preparatele cu fosfat de sodiu folosite la pregătirea pentru colonoscopie pot produce hiperfosfatemie cu hipocalcemie consecutivă.

Unele citostatice cum este cisplatinul în combinație cu 5-fluorouracil pot determina hipocalcemie indirect, prin inducerea unei hipomagneziemii.

**Hipersecreția patologică de calcitonină** este o situație rar întâlnită, care survine în cazul carcinomului medular tiroidian sau în cazul altor tumori (neoplazia endocrină multiplă 2 – MEN 2, tumori secretante de gastrină).

#### 4.1.2.2 Hipercalcemiile

Hipercalcemia este definită ca nivel al calciului seric  $>10.5$  mg/dL ( $>2.5$  mmol/L). Clasificarea hipercalcemiilor în funcție de gradul de severitate este prezentată în tabelul 4.2.

**Tabel 4.2 Clasificarea hipercalcemiilor în funcție de gradul de severitate**

Grad de severitate a hipercalcemiei	Calciu total	Calciu ionic
Ușoară	10,5-11,9 mg/dL (2,5-3 mmol/L)	5,6-8 mg/dL (1,4-2 mmol/L)
Moderată	12-13,9 mg/dL (3-3,5 mmol/L)	5,6-8 mg/dL (2-2,5 mmol/L)
Severă	14-16 mg/dL (3,5-4 mmol/L)	10-12 mg/dL (2,5-3 mmol/L)

**Creșterea calciului legat de proteine** survine doar în caz de hemoconcentrație și nu are semnificație funcțională sau clinică. Ea se asociază cu creșterea concentrației proteinelor totale și a hematocritului și se normalizează după rehidratarea pacientului. **Creșterea calciului ionic** are semnificație clinică deoarece denotă de cele mai multe ori o decalcifiere a țesutului osos, iar eliminarea crescută de calciu pe cale renală poate duce la afectarea tubilor renali.

Severitatea manifestărilor clinice nu se corelează neapărat cu nivelul calcemiei cât mai ales cu rapiditatea instalării hipercalcemiei. Manifestările clinice din hipercalcemie interesează aproape toate sistemele.

Manifestările din partea sistemului nervos sunt atribuite unui efect direct al hipercalcemiei și reprezentate de astenie, anxietate, depresie, modificări ale personalității, confuzie, până la obnubilare și comă.

Afectarea renală se traduce prin poliurie, deshidratare, nefrolitiază și nefrocalcinoză.

Nivelele crescute ale calcemiei produc aritmii cu scurtarea intervalului QT pe ECG, exercită un efect inotrop pozitiv și pot produce hipertensiune, mediată probabil prin disfuncția renală și vasoconstricție.

Manifestările digestive se traduc prin anorexie, greață, vărsături, constipație. Hipercalcemia prelungită este însoțită de o secreție crescută de gastrină și apariția ulcerului peptic. Depunerea de calciu în pancreas poate determina pancreatită.

Aproximativ 90% din hipercalcemii au drept cauză hiperparatiroidismul și afecțiunile maligne, iar restul de 10% sunt cauzate de excesul de vitamină D, condiții asociate cu accelerarea turnoverului osos sau boli genetice.

Abordarea terapeutică în hipercalcemii depinde de severitatea simptomelor și de etiologie. În caz de adenoame paratiroideiene tratamentul este chirurgical. Măsurile terapeutice includ hidratarea, administrarea diureticelor de ansă, reducerea absorbției intestinale de calciu (limitarea aportului alimentar de calciu și vitamina D, administrarea orală de fosfați care fixează calciul în intestin). Pentru inhibarea resorbției osoase se pot administra bisfosfonați sau calcitonină și se recomandă mobilizarea. În cazuri de hipercalcemie severă se practică hemodializa sau dializa peritoneală.

#### 4.1.2.2.1 Hiperparatiroidismul

##### Hiperparatiroidismul primar

Reprezintă una din cele mai frecvente cauze de producere a hipercalcemiei. Hiperparatiroidismul primar este cauzat cel mai adesea de un adenom unic paratiroidian, mai rar de adenoame multiple sau de hiperplazia paratiroidelor. În cazuri rare este produs de adenocarcinoame ale paratiroidei. Uneori survine în contextul unor neoplazii endocrine multiple sau are caracter familial (hipercalcemia familială hipocalciurică, hiperparatiroidismul neonatal sever).

În aceste cazuri, secreția de parathormon este autonomă, necorelată cu nivelul calcemiei. În afară de creșterea nivelului de PTH se evidențiază hipercalcemie (prin creșterea mobilizării osoase, a absorbției intestinale și a scăderii eliminării renale) și hipofosfatemie cu hiperfosfaturie. Modificările se normalizează după intervenția chirurgicală.

**Hiperparatiroidismul secundar** apare ca reacție a organismului la situațiile care provoacă scăderea calciului ionic, așa cum este deficitul de vitamină D și insuficiența renală. Secreția excesivă de PTH are rolul de a încerca menținerea calcemiei, chiar dacă aceasta se realizează pe seama sacrificării calciului osos. Spre deosebire de hiperparatiroidismul primar, în acest caz secreția de PTH este reglată prin feed back de către calcemie, iar la normalizarea acesteia, hipersecreția de hormon se normalizează de asemenea. Astfel, în hiperparatiroidismul secundar calcemia nu este niciodată crescută.

**Hiperparatiroidismul terțiar** apare atunci când stimularea reactivă prelungită a paratiroidelor de către hipocalcemie determină o hipertrofie marcată a acestora și o hipersecreție autonomă de PTH, similară hiperparatiroidismului primar

Modificările de laborator în hiperparatiroidism evidențiază creșterea nivelului de PTH. În hiperparatiroidismul primar și terțiar apare hipercalcemie (prin creșterea mobilizării osoase și a absorbției intestinale) și hipofosfatemie cu hiperfosfaturie. Creșterea fosfatazei alcaline este indiciul caracteristic pentru reacțiile osteoblastice compensatorii, ea putând însă avea valori normale în fazele de debut ale hiperparatiroidismului primar în care afectarea osoasă încă nu este exprimată.

#### 4.1.2.2.2 Hipercalcemia din boli maligne

Aproximativ 20-30% din pacienții cu cancer dezvoltă hipercalcemie în evoluția bolii, detectarea acesteia fiind asociată cu un prognostic nefavorabil. De obicei, hipercalcemia din

afecțiunile maligne este rapid progresivă. Bolile maligne cel mai frecvent însoțite de hipercalcemie sunt cancerul de sân, pulmonar (în special carcinomul cu celule scuamoase) și mielomul multiplu, precum și adenocarcinomul renal, cancerul ovarian, carcinomul scuamos de col uterin.

Mecanismul apariției hipercalcemiei în boli maligne constă cel mai frecvent (circa 80% din cazuri) în secreția unei proteine similare PTH (PTH related protein PTHrP), urmat ca frecvență de metastazele osteolitice. În acest din urmă caz hipercalcemia se produce mai ales prin implicarea unor factori umorali (factori de creștere,  $TGF\alpha$ ,  $IL-1$ ,  $TNF\alpha$ ,  $PGE_2$ ,) secretați de tumoră, care activează osteoclastele, și mai puțin prin efectul direct de distrucție osoasă produs de dezvoltarea masei tumorale. Unele limfoame pot fi asociate cu producerea formei active a vitaminei D, și în cazuri foarte rare se descrie producerea ectopică de PTH.

#### **4.1.2.2.3 Alte cauze de hipercalcemie**

##### **Intoxicația cu vitamină D**

Ingestia cronică de vitamină D duce la o creștere a absorbției intestinale de calciu și probabil și la o creștere a mobilizării sale osoase. Nivelul calcemiei se normalizează prin întreruperea administrării de vitamină D, restricția calciului alimentar și hidratare abundentă, iar în cazurile severe se impune administrarea de glucocorticoizi.

**Bolile granulomatoase.** În sarcoidoză precum și în alte boli granulomatoase apare o sinteză excesivă și necontrolată de  $1,25(OH)_2D$ , acest proces având loc la nivelul macrofagelor și altor celule din granuloame. Fenomenul este amplificat în cazul administrării de vitamină D sau expunerii la radiații UV, datorită creșterii metabolitului activ al vitaminei D, ceea ce determină o hipercalcemie.

În **hipertiroidism** apare o creștere a resorbției osoase, probabil prin efectul direct al hormonilor tiroidieni asupra osteoclastelor.

**Imobilizarea prelungită** (cum ar fi cea din afecțiuni neurologice – paraplegii, tetraplegii) poate fi însoțită de resorbție osoasă crescută, (cauzată de lipsa stimulării mecanice a osului), cu hipercalcemie consecutivă. Această situație este rară la adulți (în absența altei patologii asociate), în schimb poate apărea în acest context la copii și adolescenți, ca urmare a dezechilibrului între rata resorbției, mai mare decât cea a mineralizării osoase.

**Administrarea de diuretice tiazidice** scade eliminarea renală a calciului, putând provoca hipercalcemie mai ales la pacienții cu o rată accelerată a turnoverului osos.

**Terapia cu litiu** administrată în psihoza bipolară determină o stimulare a secreției de PTH cu hipercalcemie consecutivă.

**Sindromul lapte-alkaline** este o situație mai rar întâlnită la ora actuală, care poate apărea la pacienții suferind de ulcer gastro/duodenal datorită dietei bogate în calciu și administrării de săruri de calciu ca neutralizante ale secreției gastrice.

#### **4.1.2.2.5 Diagnosticul diferențial al hipercalcemiilor**

Abordarea se bazează pe elemente clinice și paraclinice. Hiperparatiroidismul și afecțiunile maligne sunt printre cauzele cele mai comune de hipercalcemie, cele două putând coexista.

În hiperparatiroidism hipercalcemia este de obicei moderată, asimptomatică și cu istoric îndelungat (ani). În această situație sunt utile dozările de PTH și calciu ionic, care evidențiază hipercalcemie și nivele crescute ale PTH.

Dacă hipercalcemia este ușoară și persistă de luni/ani, etiologia malignă este puțin probabilă. În schimb, în cazul unei hipercalcemii cu o durată necunoscută pacientul trebuie investigat în direcția unui cancer, mai ales de sân, plămân, rinichi, mielom multiplu sau limfom. Această probabilitate este și mai evidentă în cazul modificărilor rapide ale nivelului calcemiei.

Alte cauze de hipercalcemie pot fi depistate pe baza contextului clinic și examinărilor de laborator: dozarea fosfatemiei, a fosfatazei alcaline, calciuria, evaluarea funcției renale, investigarea tiroidei, dozarea vitaminei D și a metaboliților săi sau evidențierea PThrP.

#### 4.1.2.3 Afecțiuni ale oaselor care nu modifică nivelul calcemiei

**Boala Paget (osteita deformantă)** este o boală localizată sau multifocală caracterizată prin procese de resorbție osoasă exagerată urmată de regenerare excesivă, care în timp se soldează cu deformări ale oaselor. Mecanismul molecular al bolii constă în mutații ale RANK, cu perturbarea activității osteoclastelor. Din punct de vedere al laboratorului, calcemia, fosfemia, calciuria și nivelul PTH sunt nemodificate, sugerând că mineralele resorbite sunt reutilizate în zonele de osteogeneză. Activitatea fosfatazei alcaline este însă crescută, ca expresie a proceselor intense de remodelare osoasă.

**Boala Albright (displazia fibroasă a osului)** este o afecțiune genetică rară, care se manifestă prin leziuni osoase diseminate (osteoscleroză, displazie fibroasă), pigmentare cutanată și uneori pubertate precoce la fete. Modificările umorale sunt minime. Mecanismul patogenetic implică anomalii în reglarea generării de AMPc.

**Hipofosfatazia** este o boală genetică rară cu transmitere autosomal recesivă. Manifestările constau în leziuni de tip rahitic rezistente la vitamina D, iar din punct de vedere paraclinic se evidențiază o scădere a fosfatazei alcaline și o creștere a fosfoetanolaminei (substratul acestei enzime) în plasmă și în urină. Apariția manifestărilor de rahitism în condițiile unor valori normale ale calciului, fosfaților precum și rezistența la vitamină D sugerează rolul important al fosfatazei alcaline în mineralizarea osoasă. Administrarea de vitamină D nu ameliorează anomalii osoase, în schimb duce la apariția hipercalcemiei și hiperfosfatemiei, deoarece absorbția de calciu și fosfat nu este urmată de depunerea lor în oase.

**Perturbările reabsorbției tubulare de fosfați** se descriu în cadrul unor boli genetice afectând tubii renali. Carența de fosfați a acestor subiecți provoacă leziuni osoase similare cu cele din rahitism, care nu răspund la tratamentul cu vitamina D (rahitism hipofosfatic vitamin-D rezistent). Din punct de vedere al laboratorului se constată hipofosfatemie, normocalcemie și creșterea fosfatazei alcaline.

În sindromul Toni Debre Fanconi pierderile de fosfați sunt însoțite de eliminarea urinară de glucoză și aminoacizi.

#### Osteoporoza

Osteoporoza reprezintă o problemă importantă de sănătate publică, grevată de o morbiditate și mortalitate considerabile și de costuri economice importante. Această boală scheletică

generalizată se caracterizează prin reducerea masei osoase, atât din punct de vedere al conținutului mineral cât și al alterării arhitecturii osoase, consecința fiind o predispoziție la fracturi.

Osteoporoza survine cel mai frecvent în contextul reducerii deficitului de estrogeni/ androgeni odată cu înaintarea în vârstă. Alte cauze de osteoporoză sunt carența severă de proteine, imobilizarea prelungită, tratamentul cu hormoni tiroidieni, glucocorticoizi, anti-convulsivante, preparate cu litiu, tratamentul anticoagulant prelungit.

În osteoporoză demineralizarea osoasă cu eliberarea de calciu și fosfați se produce treptat și nu ajunge să depășească capacitatea de eliminare renală, astfel încât aceste elemente nu cresc în plasmă. Deoarece reacția osteoblastică este absentă sau discret schițată, activitatea fosfatazei alcaline este normală sau foarte ușor crescută și în mod tranzitoriu.

Evaluarea osteoporozei se face prin măsurarea densității minerale a osului prin absorbție de raze X cu energie duală (DEXA), precum și prin determinarea unor markeri biochimici. Aceștia sunt utilizați în special pentru evaluarea riscului de fractură și pentru urmărirea răspunsului la tratament.

Evaluarea pacienților înainte de instituirea terapiei include ca bilanț de laborator dozarea de calciu corectat pentru albumină, hemoleucograma completă, creatinina, fosfataza alcalină, TSH și 25 OH.

În tratamentul osteoporozei se utilizează bisfosfonații: alendronat, risedronat, acid zoledronic (care se leagă de cristalele de hidroxiapatită din traveele osoase și inhibă resorbția produsă de osteoclaste precum și diferențierea și activitatea osteoclastelor), un inhibitor al RANKL - denosumab, modulatori selectivi ai receptorilor pentru estrogeni (SRMS) așa cum este raloxifene, terapie hormonală cu estrogeni, calcitonină și un agent formator de os (teriparatide).

### **Markeri ai turnoverului osos**

În osteoporoză precum și în alte boli evoluând cu resorbție sau cu remodelare osoasă (hiperparatiroidism primar, poliartrită reumatoidă, boala Paget etc) se utilizează markeri ai turnoverului osos. Turnoverul osos se poate evidenția prin studii cinetice cu trasori, prin puncție biopsie osoasă sau prin determinarea unor markeri biochimici. Aceștia din urmă au avantajul de a fi mai ușor de determinat și mai puțin invazivi. Limitele lor sunt reprezentate de variabilitatea biologică (variații circadiene, influențați de ingestia de alimente) și de diversitatea metodelor utilizate în diferite laboratoare.

Markerii biochimici ai turnoverului osos reflectă atât procesul de formare cât și pe cel de resorbție osoasă.

#### **Markeri ai resorbției osoase**

- Deoxipiridinolina (DPD) este eliberată din colagenul matur în cursul resorbției osoase și se elimină în urină sub formă liberă (/40-50%) și legată (40-60%). Măsurarea DPD urinare totale pe 24 de ore se face prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC).

- Telopectidul C terminal al colagenului tip I ( $\beta$  CTX) și telopectidul N terminal al colagenului tip I (NTX) sunt fragmente provenite din porțiunile terminale, non helicoidale ale acestuia.
- Fosfataza acidă tartrat rezistentă (TRACP 5b) este produsă de osteoclaste, furnizând o măsură indirectă a resorbției osoase.

Markeri ai formării osoase

- Fosfataza alcalină. Fosfataza alcalină osoasă și cea hepatică sunt produsul aceleiași gene, diferind doar prin resturile de carbohidrați, izoenzima osoasă putând fi detectată cu metode imunoenzimatiche care folosesc anticorpi monoclonali specifici.
- Osteocalcina descrisă anterior este o proteină cu rol în mineralizarea osoasă. Expresia sa este influențată de corticosteroizi și de vitamina D, iar nivelul ei plasmatic poate fi influențat de funcția renală.
- Propeptidul aminoterminal al procologenului de tip I (PINP) este o proteină globulară trimerică clivată din procologenul de tip I în cursul sintezei colagenului.

## 4.2 METABOLISMUL FOSFORULUI

### 4.2.1 DATE PRIVIND FIZIOLOGIA FOSFORULUI

#### 4.2.1.1 Repartizarea fosforului

Fosforul este un element abundent în organism (aproximativ 700 g la un adult de 70kg). Aproximativ 80% din această cantitate se găsește în oase sub forma cristalelor de hidroxiapatită. Restul fosfaților se găsesc în țesuturile moi și în lichidul extracelular. Fosforul este în mare parte combinat cu lipide, proteine și hidrați de carbon, participând la formarea fosfolipidelor, nucleotidelor, acizilor nucleici, a compușilor macroergici. Fosfații constituie unul din sistemele tampon ale organismului.

Majoritatea fosfatului din lichidul extracelular este anorganic, găsindu-se sub două forme:  $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$  și  $\text{HPO}_4^{2-}$ , aflate într-un raport de de 4:1 la pH-ul fiziologic al sângelui.

Valorile normale ale fosforului sunt cuprinse între 3.4 to 4.5 mg/dl (1.12 - 1.45 mmol/L). Aceste valori variază în funcție de vârstă (fiind mai ridicate la copii decât la adulți), aportul alimentar și echilibrul acidobazic. Există o variație circadiană, concentrația maximă fiind atinsă în intervalul 8-11 a.m.

#### 4.2.1.2 Rolul fiziologic al fosforului

Fosforul este implicat în procesele enzimatice din glicoliză, amoniogeneză și fosforilarea oxidativă, unde intervine în formarea ATP din ADP. De asemenea, influențează capacitatea hemoglobinei de a transporta oxigen, prin rolul său în reglarea sintezei 2,3 difosfogliceratului (2,3 DPG).

#### 4.2.1.3 Reglarea fosfatemiei

Fosforul este prezent din abundență în multe alimente (carne roșie, produse lactate, leguminoase), o dietă obișnuită aducând un aport de 1-1,5 g/zi. Tractul intestinal absoarbe 70-

85% din fosfatul ingerat, restul fiind excretat prin fecale. În condițiile unui aport scăzut de fosfați, absorbția este mai crescută. Absorbția se face în principal la nivelul jejunului, urmat de duoden și ileon, mecanismul fiind în cea mai mare măsură pasiv, paracelular, existând însă și un mecanism activ. La pH fiziologic, absorbția fosforului poate depinde de concentrația intraluminală a sodiului, iar la nivelul jejunului absorbția depinde de vitamina D. Absorbția intestinală a fosfaților este redusă în cazul unor sindroame malabsorbitive intestinale, boli hepatice, în intoxicația cu metale grele precum și în terapia cu antiacide neresorbabile, și în aportul alimentar crescut de fitați. Factorii care cresc absorbția digestivă sunt o dietă săracă în calciu, vitamina D și PTH.

Calea principală de eliminare este cea renală, fosfaturia fiind de 0,9-1,3 g (29-42 mmoli)/24 ore. Aproximativ 85-90% din fosforul filtrat este reabsorbit. Mecanismul reabsorbției este pasiv și se produce în principal în tubii proximali. Factorii care cresc reabsorbția fosforului sunt: hipercalcemia, hipermagneziemia, aportul scăzut de fosfor alimentar, administrarea de vitamina D, insulina și hormonul de creștere. În schimb, absorbția este diminuată de aportul alimentar crescut de fosfați, PTH, calcitonină, glucocorticoizi și hormonii tiroidieni, diuretice și alcool și alcalinizarea urinei.

#### **4.4.2.2 Perturbările metabolismului fosfaților**

##### **4.2.2.1 Hipofosfatiemiile**

Având în vedere că fosfații fac parte din structura tuturor celulelor și intervin în metabolismul energetic, deficitul de fosfați afectează majoritatea țesuturilor.

Semnele de hipofosfatemie apar când fosfatul seric scade sub 1 mg/dl, în general pacienții acuzând anorexie, astenie și dureri osoase.

Prin scăderea 2,3 DPG și a ATP se perturbă eliberarea oxigenului către țesuturi, cu consecințe asupra tuturor țesuturilor, inclusiv asupra sistemului nervos, cu producerea de stări confuzive, iritabilitate, disartrie, parestezii. În deficitul sever de fosfați poate să se producă anemie hemolitică.

Capacitatea chemotactică și fagocitară a leucocitelor scade, ceea ce predispune la infecții.

Retracția cheagului este deficitară, iar plachetele sangvine au o durată de viață scăzută.

Mineralizarea osoasă este afectată, cu creșterea cantității de osteoid și este însoțită de dureri osoase și pseudofracturi.

O caracteristică a hipofosfatemiei este afectarea musculară însoțită de creșteri ale CPK și aldolazei, și în unele cazuri rhabdomioliză. Afectarea musculaturii respiratorii poate influența capacitatea ventilatorie. Hipofosfatemia determină o absorbție scăzută a calciului în tubii renali, producând calciurie. În plus, hipofosfatemia perturbă echilibrul acidobazic la nivelul rinichilor prin mai multe mecanisme: scăderea reabsorbției de bicarbonat în tubii proximali, acidificare tubulară scăzută și scăderea amoniogenezei.

##### **Cauze de hipofosfatemie**

Hipofosfatemia este întâlnită mai frecvent la pacienții spitalizați. Mecanismele principale care produc hipofosfatemie sunt reprezentate de: a) deplasarea fosfatului din mediul extracelular

în compartimentul intracelular; b) aport alimentar necorespunzător, mai ales în asociere cu malabsorbție sau diaree și c) excreție crescută având cauze renale sau extrarenale, aceste mecanisme putând fi uneori intricate.

Nutriția parenterală fără suplimentare de fosfați, și mai ales perfuzarea unor cantități mari de glucoză favorizează captarea fosfatului de către celule.

Terapia comei diabetice, în care se administrează glucoză, bicarbonați și insulină favorizează instalarea hipofosfatemiei, prin pierderea urinară de fosfați și prin deplasarea bruscă a acestora și a glucozei din lichidul extracelular spre celule, unde formează glucozo-6 fosfat. La obezi, datorită hiperinsulinismului se creează același dezechilibru între mediul extra și intracelular prin deplasarea fosfaților spre celule.

Pierderile renale de fosfați apar cel mai frecvent în contextul hiperparatiroidismului, în care diminuează reabsorbția renală a fosfaților. O serie de boli genetice pot evolua cu pierderi renale de fosfați: sindromul Fanconi, cistinoza, boala Wilson și intoleranța ereditară la fructoză. Eliminarea crescută de fosfați survine și în cadrul mielomului multiplu, amiloidozei, intoxicației cu metale grele.

Adminstrarea de antiacide pe bază de aluminiu fixează fosfații în intestin într-o formă neabsorbabilă. Deficitul de vitamina D determină o diminuare a absorbției fosfaților.

Depleția de fosfați poate surveni și în cazul vărsăturilor cronice, a pacienților cu aspirație gastrică prelungită și a utilizării de preparate antiacide care fixează fosfații în intestin într-o formă neresorbabilă. Perturbările digestive evoluând cu malabsorbția calciului și a vitaminei D (boală Crohn, fistule intestinale, colestază, insuficiență pancreatică) determină o hipersecreție de parathormon care antrenează pierderi renale de fosfați.

Alcoolismul acut și cronic și terapia cu diuretice produc o spoliere în fosfați a organismului.

Dozarea fosfaturiei poate fi un indicator util în diagnosticul hipofosfatemiei. Rinichii tind să conserve fosfatul atunci când fosfatemia e scăzută. Prin urmare, în prezența unei hipofosfatemii (sub 1,5 mg/dl) care evoluează cu hiperfosfaturie trebuie suspectată pierderea renală de fosfați. În schimb dacă atât fosfatemia cât și fosfaturia sunt scăzute, aceasta orientează spre cauze extrarenale.

Terapia hipofosfatemiei se realizează prin administrarea de fosfați, pe cale orală, intravenoasă (ca atare sau în soluții nutritive complexe). Cantitatea de fosfați și rata de administrare se ajustează în funcție de simptomele clinice, severitatea deficitului, prezența comorbidităților (insuficiență renală, hipo sau hipercalcemie, echilibru acido-bazic). Hipofosfatemia moderată/ușoară poate fi în general corectată pe cale orală, în timp ce în caz de deficit sever sau comorbidități asociate se impune administrarea parenterală.

#### 4.2.2.2 Hiperfosfatemiile

Creșterea fosfatemiei poate apărea în condițiile trecerii fosfaților din mediul intracelular în cel extracelular: leucemii, limfoame, stări hipercatabolice-rhabdmioliză, acidoză respiratorie, cetoacidoză diabetică, ischemie tisulară.

O altă cauză de hiperfosfatemie este insuficiența renală în care scade excreția renală de fosfați. În insuficiența renală cronică hiperfosfatemia semnificativă apare atunci când rata

filtrării glomerulare scade sub 25 ml/min. Eliminarea urinară de fosfați este perturbată și în caz de hipoparatiroidism și alte dezordini endocrine cum ar fi hipertirodismul, acromegalia.

Deficitul de magneziu produce hiperfosfatemie prin scăderea PTH.

Încărcarea cu fosfați (intoxicație cu vitamina D, laxative conținând fosfați, administrarea parenterală excesivă de fosfați) poate fi de asemenea o cauză de hiperfosfatemie.

Simptomatologia hiperfosfatemiei este determinată de boala care a produs-o. Cel mai frecvent risc este cel al calcificărilor ectopice, care se produc în cornee, conjunctivă, tegumente, plămâni, vase, acest proces fiind favorizat de alcaloză.

Terapia constă în tratarea bolii de bază. În insuficiența renală dializa renală contribuie la controlul fosfatemiei dar nu este suficientă, fiind completată de un control strict al aportului alimentar de fosfați și administrarea de chelatori ai fosfaților.

## 4.3 METABOLISMUL MAGNEZIULUI

### 4.3.1 DATE PRIVIND FIZIOLOGIA MAGNEZIULUI

#### 4.3.1.2 Repartiția magneziului în organism

Organismul unui adult de 70 kg conține aproximativ 1000 - 1120 mmoli, respectiv 24 g de magneziu. Circa 99% din magneziu este localizat în os, mușchi, și țesuturile moi non-musculare. Scheletul conține circa 50% din magneziu; aproximativ 1/3 din magneziul osos este disponibil de a fi mobilizat atunci când se impune restabilirea concentrației sale în compartimentul extracelular.

Circa 27% din magneziu este cantonat în mușchii scheletici și aproximativ 19% în țesuturile moi, iar magneziul din compartimentul extracelular reprezintă doar 1%, din care în sânge doar 0,3%. În plasmă, magneziul se găsește sub 3 forme: 20-30% este legat de albumine, 5-15% este complexat cu citratul, bicarbonatul, sulfatul, și 50-70 se găsește sub formă liberă, ionizată, această fracțiune având de altfel rol fiziologic.

Concentrația magneziului seric este de 0,65–1,05 mmol/L.

#### 4.3.1.2 Rolul fiziologic al magneziului

Magneziul este cofactor enzimatic în peste 300 de reacții. El intervine în sinteza, transportul și utilizarea compușilor macroergici, în special a ATP. În mitocondrii magneziul asigură cuplarea fosforilării cu oxidarea, cu producerea de ATP. Este implicat în numeroase printre care sinteza proteinelor și a acizilor nucleici, transferul de grupări metil.

Magneziul are rol stabilizator asupra membranelor celulare, precum și asupra ribozomilor și lizozomilor, în deficitul de magneziu degranularea bazofilelor și mastocitelor fiind accentuată. Prin efectul său asupra membranelor celulare magneziul intervine în procesele de transfer ionic (în special al potasiului) și modulează activitatea canalelor de calciu.

La nivel intracelular, magneziul antagonizează efectul apoptotic al calciului.

Magneziul contribuie și la menținerea tonusului vascular, reglarea ritmului cardiac, funcționarea trombocitelor și formarea osului.

### 4.3.1.3 Reglarea magneziemiei

Necesarul zilnic de magneziu este estimat la 350 mg pentru bărbați și 280–300 mg pentru femei (355 mg în timpul sarcinii și lactației). Clorofila (și deci legumele verzi) furnizează cea mai mare cantitate de magneziu. Leguminoasele, fructele, carnea și peștele au un conținut intermediar de magneziu, iar produsele lactate furnizează o cantitate redusă. 10% din necesarul de magneziu este asigurat de ingestia de apă. Alimentele cu grad înalt de procesare, consumul de apă demineralizată contribuie la o dietă săracă în magneziu.

Homeostazia magneziului este menținută de intestin, rinichi și țesutul osos. Magneziul este absorbit în intestin și stocat în structurile minerale ale osului, iar excesul este eliminat prin urină și fecale.

Cea mai mare parte a magneziului este absorbită în intestinul subțire, majoritatea printr-un mecanism paracelular pasiv, iar o fracțiune mai redusă este transportată printr-un mecanism transcelular activ, care predomină când concentrația intraluminală de magneziu este redusă. Din totalul magneziului ingerat, cantitatea absorbită reprezintă 24-76%. De menționat faptul că rata absorbției intestinale nu este proporțională cu aportul de magneziu ci cu statusul magneziului din organism. Cu cât magneziemia este mai redusă, cu atât absorbția este mai crescută.

Vitamina D și forma ei activă cresc absorbția magneziului, dar într-un grad mai mic decât pe cea a calciului. În cazul unei diete conținând multe fibre, fiți și grăsimi saturate, absorbția magneziului este redusă. Absorbția magneziului este deficitară în caz de steatoree, diaree, rezecții intestinale, enteropatie de iradiere și diabet.

Rinichii joacă rolul esențial în echilibrul magneziului, concentrația sa serică fiind reglată prin excreție urinară. Excreția urinară de magneziu urmează un ritm circadian, atingând un maxim în timpul nopții. Din magneziul filtrat, 60-70% este reabsorbit în porțiunea ascendentă a ansei Henle, și 10% în tubii distali.

Rinichii au capacitatea de a ajusta rata excreției și a reabsorbției în limite foarte largi, astfel încât din cantitatea de magneziu filtrată se poate excreta între 0,5 -70%. În caz de depleție de magneziu, rinichiul limitează drastic excreția sa, în timp ce în cazul unui exces de magneziu acesta este rapid excretat.

Intervenția hormonilor nu are o pondere foarte mare în homeostazia magneziului.

Parathormonul facilitează absorbția intestinală și crește reabsorbția tubulară de magneziu, iar în cazul hipercalcemiei, inhibiția secreției de PTH duce la creșterea magneziuriei.

Hormonii tiroidieni și glucocorticoizii cresc eliminarea urinară de magneziu.

Aldosteronul intervine în reglarea magneziemiei, existând o interrelație între metabolismul potasiului și cel al magneziului. În hiperaldosteronism se semnalează deficitul ambilor cationi. Pe de altă parte, deficitul de magneziu reduce capacitatea celulelor de a menține un gradient de potasiu, ceea ce duce la o depleție celulară de potasiu, iar rinichii nu sunt capabili să conserve potasiul, ceea ce duce la hipokaliemie.

Sistemul adrenergic intervine în homeostazia magneziului: deficitul de magneziu se însoțește de o hiperproducție de adrenalină, iar excesul de catecolamine accentuează acest deficit.

### 4.3.2 PERTURBĂRI ALE METABOLISMULUI MAGNEZIULUI

Depistarea perturbărilor echilibrului magneziului se bazează în mare măsură pe dozarea magneziului seric, metodă simplă, accesibilă și ieftină. Având însă vedere că magneziul seric reprezintă doar 0,3% din conținutul în magneziu, dozarea acestuia reflectă în mică măsură statusul magneziului din organism. Pot exista subiecți la care magneziul seric să se încadreze în valorile de referință și care totuși au un deficit al capitalului de magneziu. Vegetarienii și veganii au valori ale magneziului seric mai mari decât persoanele cu o dietă omnivoră. După exerciții fizice de scurtă durată magneziul seric tinde să fie crescut, având însă nivele reduse în cazul exercițiilor fizice de durată. Valorile sunt mai scăzute în al treilea trimestru de sarcină. Având în vedere că eritrocitele conțin cantități de magneziu mai mari decât serul (1,65-2,65 mmoli/L), este important ca la dozarea acestuia să se evite hemoliza.

Altă etapă de evaluare a statusului magneziului o reprezintă măsurarea eliminării urinare de magneziu pe 24 de ore. Acest test este foarte util în stabilirea etiologiei deficitului de magneziu: o eliminare urinară crescută orientează spre o cauză renală a deficitului, în timp ce o magneziurie scăzută sugerează un deficit de aport sau de absorbție.

Pentru nuanțarea diagnosticului se poate efectua un test de încărcare cu magneziu, constând în determinarea magneziuriei după administrarea orală sau parenterală de magneziu, la subiecții fără deficit magneziul administrat eliminându-se în proporție de 60-70%.

#### 4.3.2.1 Hipomagneziemiile

În practica medicală deficitul de magneziu este întâlnit relativ frecvent. Cu toate acestea, el nu este întotdeauna identificat, pe de o parte deoarece are o expresie clinică mai puțin specifică comparativ cu carența altor elemente (cum ar fi fierul), iar pe de altă parte pentru că deficitul de magneziu apare de multe ori într-un context clinic complex, în asociere cu alte afecțiuni care pot domina tabloul clinic.

Manifestările clinice în hipomagnezie sunt destul de polimorfe. În fazele precoce ale deficitului de magneziu pacienții pot acuza pierderea apetitului, greață, vărsături, stare de oboseală, astenie musculară. În stadii mai avansate pot paretezii, fasciculații și crampe musculare, tremor, agitație, sau depresie, aritmii, spasme coronariene. Hipomagnezemia severă poate fi însoțită de hipocalcemie și hipokaliemie. Manifestările clinice sunt mai evidente în cazul scăderii bruște a magneziei decât în scăderile lente, progresive.

Deficitul de magneziu se poate produce din cauza unui aport alimentar redus în dietele dezechilibrate (sau în alimentația parenterală care nu este suplimentată cu magneziu).

Absorbția scăzută sau pierderile digestive din diareea cronică, malabsorbția de diferite cauze, rezecțiile intestinale pot constitui cauze de hipomagnezie.

În alcoolismul cronic se produce o carență de magneziu prin mecanisme intricate, între care se numără alimentația dezechilibrată, eliminarea urinară crescută (alcoolul antrenând o diureză osmotică), malabsorbția și carența de vitamină B6. În etilism, deficitul de magneziu contribuie la apariția tulburărilor neuromusculare.

Excreția renală crescută survine în asociere cu administrarea unor medicamente cum sunt aminoglicozidele, cisplatin, digoxin, furosemid, amfotericina B, ciclosporina.

Afectarea tubulară renală, diabetul zaharat, hipercalcemia, hipertiroidismul, hiperaldosteronismul primar și secundar, se pot solda de asemenea cu hipomagneziemii.

La pacienții cardiaci prezentând hiperaldosteronism secundar și tratați cu diuretice, hipokaliemia și hipomagneziemia care se instalează pot contribui la apariția tulburărilor de ritm și a manifestărilor toxice digitale.

Redistribuirea magneziului între compartimente (așa cum se întâmplă de exemplu în pancreatita acută și sindromul de os înfometat) poate constitui o altă cauză de hipomagnezie.

Stresul psihic poate crește necesarul de magneziu și poate accentua pierderile de magneziu celular, acest mecanism fiind mediat de eliberarea crescută de catecolamine, a căror sinteză este la rândul ei amplificată de hipomagnezie.

În caz de hipomagnezie ușoară se recurge la suplimentarea orală cu magneziu. La pacienții cu deficite severe și cu aritmie ventriculară se administrează magneziu i.v. (sub formă de sulfat de magneziu).

#### 4.3.2.2 Hipermagneziemiile

Hipermagneziemia poate evolua adesea asimptomatic. Hipermagneziemia moderată se poate asocia cu hipotensiune, flush cutanat, greață și vărsături. La concentrații mai mari se poate ileus paralytic, precum și tulburări neuromusculare cu severitate variabilă, de la amețeală până la depresie respiratorie, hipotonie, areflexie și comă. Asupra sistemului cardiovascular hipermagneziemia produce bradicardie, bloc atrioventricular, fibrilație atrială și asistolă.

Având în vedere rolul esențial al rinichilor în menținerea magnezieimiei, bolile renale avansate sunt însoțite de incapacitatea eliminării adecvate a magneziului.

Administrarea orală excesivă de săruri de magneziu, laxative sau antiacide conținând magneziu poate produce hipermagnezie, în special la vârstnici și în condițiile unei funcții renale mai compromise.

Hipermagneziemia poate fi indusă și iatrogen, în cazul administrării perfuzabile de magneziu la pacientele cu pre-eclampsie sau în caz de greșeli prin suplimentarea excesivă cu magneziu.

Tratamentul în hipermagnezie constă în întreruperea administrării de magneziu și administrarea de gluconat de calciu, iar în cazurile severe se recurge la hemodializă.

### 4.4 PREZENTĂRI DE CAZ

#### 4.4.1 OSTEOPOROZA

O femeie de 63 de ani se internează în spital datorită unei dureri acute apărute la nivelul coloanei vertebrale, în regiunea interscapulară, după un accident casnic. Radiografia detectează două fracturi la nivelul vertebrelor cervicale și demineralizare generalizată a întregului schelet. Persoana se află la menopauză de 20 de ani după histerectomie, fără să tolereze însă terapia de substituție hormonală. Investigațiile de laborator au fost în limite normale, în totalitate.

**Comentariu:**

Simptomatologia de osteoporoză apare relativ tardiv (în faze avansate ale bolii) și cel mai adesea debutează cu fracturi (de col femural și vertebrale sunt cele mai frecvente). Terapia de substituție hormonală este o soluție pentru această categorie de persoane.

**4.4.2 HIPERPARATIROIDISM PRIMAR**

O femeie de 52 ani, se adresează în serviciul de urgență cu o durere acută, cu caracter colicativ, în regiunea lombară. Investigațiile de urgență au arătat:

- Hematurie: +++
- Ca seric: 3,1 mmol/L
- Fosfatul seric: 0,65 mmol/L
- Na: 145 mmol/L
- K: 4 mmol/L
- Cl: 115 mmol/L
- $\text{HCO}_3^-$ : 17 mmol/L
- PTH: 16,7 pmol/L (normal: 1,1-6,9 pmol/L)
- Rx – litiază renală

**Comentariu:**

Hipercalcemia descoperită accidental se datorează cel mai adesea unui hiperparatiroidism primar (cel mai adesea în contextul unor adenoame paratiroidiene): hipercalcemia, hipofosfatemia și acidoza metabolică cu lacună anionică normală (datorită efectului compensator al clorurii). Concentrația PTH clarifică diagnosticul: valorile crescute ale calcemiei suprimă în mod normal producerea de PTH - cu excepția hiperparatiroidismului primar.

**4.4.3 HIPERCALCEMIE ASOCIATĂ CU PROLIFERĂRI MALIGNE**

Pacientă de sex feminin, 48 ani, relatează apariția în urmă cu aproximativ 2 ani a unui nodul de consistență dură, nedureroasă în sectorul supero-lateral al sânului drept. Formațiunea a crescut lent în volum. Actualmente se observă o modificare a tegumentului și senzație de disconfort în regiunea supero-laterală a sânului, dureri la nivelul coloanei vertebrale. La examenul obiectiv se constată o retracție mamelonară, semnul cojii de portocală la nivelul pielii, ganglioni limfatici axilari măriți în volum. Se palpează o formațiune dură, aderentă la piele, de aproximativ 3/4 cm în segmentul supero-lateral.

Concentrația calciului seric total este 2,9 mmol/L; radiografia de coloană dorsală: focare multiple de osteoliză.

**Comentariu:**

Hipercalcemia constatată la această pacientă, însoțită de rarefierea osoasă, se datorează metastazelor osoase secundare proliferării maligne la nivelul glandei mamare.

#### 4.4.4 HIPOPARATIROIDISM SECUNDAR

Unei paciente de sex feminin, în vârstă de 57 ani, i se pune diagnosticul de cataractă în serviciul de oftalmologie. În urmă cu 10 ani femeia a suferit o tiroidectomie pentru o gușă multinodulară. Investigațiile paraclinice de rutină efectuate în clinica de oftalmologie, au arătat:

- Ca seric: 1,8 mmol/L
- Fosfatul seric: 2,85 mmol/L
- Fosfataza alcalină: 70 U/L

Clinic se constată spasme/crampe musculare (semnele Trousseau și Chvostek sunt prezente).

##### **Comentariu:**

Combinația hipocalcemie-hiperfosfatemie-fosfatază alcalină normală, este tipică hipoparatiroidismului; la această pacientă, probabil cauza este extirparea chirurgicală a gladelor paratiroide în intervenția pe tiroidă.

Cataracta este o complicație recunoscută a hipoparatiroidismului, probabil datorită faptului că hiperfosfatemia conduce la precipitarea sub formă de săruri cu calciu, la nivelul cristalinului.

#### 4.4.5 OSTEOMALACIE

Pacientă de 61 ani, cu deficiențe de auz, nu și-a părăsit locuința în ultimii trei ani. Prezintă de aproximativ 2 luni dureri ale coloanei vertebrale, pelvisului și la nivelul cutiei toracice, acuzele accentuându-se în ultimele zile. La examenul obiectiv se constată tegumente și mucoase palide, țesut adipos slab reprezentat, mers clătinat, nesigur, cutia toracică sensibilă la palpare și percuție. Radiografiile de cutie toracică au evidențiat o fractură costală, dar și accentuate demineralizări în benzi ale țesutului osos. Examinările de laborator:

- Ca seric: 2,0 mmol/L
- Fosfatul seric: 0,55 mmol/L
- Fosfataza alcalină: 310 U/L
- Vitamina D3: 30 pmol/L (normal 75 - 175 pmol/L)
- PTH: 10 pmol/L (normal 1,1 - 6,9 pmol/L)

În ciuda suplimentării calciului și vitaminei D, rămâne hipocalcemică în următoarele 3 săptămâni.

##### **Comentariu:**

În formele severe de osteomalacie, modificările biochimice sunt caracteristice: hipocalcemie, hipofosfatemie, creșterea fosfatazei alcaline și a PTH, secundare deficitului de vitamină D. Hipocalcemia persistentă în ciuda administrării vitaminei D se poate datora hipomagneziei: dozarea magneziului seric la pacientă, a evidențiat o concentrație de 0,39 mmol/L. Suplimentarea magneziului a condus la o normalizare rapidă a celorlalți parametri.

## Bibliografie selectivă

1. Aranow C. Vitamin D and the Immune System *J Investig Med*. 2011; 59(6): 881–86.
2. Balesaria S, Sangha S, Walters, JRF. Human duodenum responses to vitamin D metabolites of TRPV6 and other genes involved in calcium absorption. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009, 297 (6): 1193–97
3. Bansal VK. Serum Inorganic Phosphorus. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 198
4. de Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. *Clin Kidney J* 2012;5(Suppl 1):i15-i24.
5. Bolland MJ, Grey A, Horne AM, Reid IR. Testosterone levels following decreases in serum osteocalcin. *Calcif Tissue Int* 2013, 93: 133-36
6. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9 (Suppl 1): S1
7. Boyce BF, Xing L, Chen D. Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab*. 2005;2:344–45
8. Booth SL, Centi A, Smith SR, Gundberg C. The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(1): 43-55
9. Brasier AR, Nussbaum SR. Hungry bone syndrome: clinical and biochemical predictors of its occurrence after parathyroid surgery. *Am J Med*. Apr 1988;84(4):654-60
10. Brudașcă I, Cucuianu M. Metabolismul calciului, fosforului și magneziului. Sub redacția Pleșca Manea L, Cucuianu M, Crîșnic I, Brudașcă I. *Biochimie clinică. Fundamentare fiziopatologică*. Editura Argonaut Cluj Napoca 2003, pp. 317-349
11. Collins MT, Sarlis NJ, Merino MJ, et al. Thyroid carcinoma in the McCune-Albright syndrome: contributory role of activating Gs alpha mutations". *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88 (9): 4413–7
12. Cunningham J, Rodríguez JM, Messa P. Magnesium in chronic kidney disease stages 3 and 4, and in dialysis patients. *Clin Kidney J* 2012;5(Suppl 1):i39-i51.
13. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R and E. Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000;105(7):915–23.
14. De Luca HF. *The metabolism, physiology and function of vitamin D. Basic and clinical aspects*. Boston, the Hague Nijhoff 1984
15. Dettelbach MA, Deftos LJ, Stewart AF. Intraperitoneal free fatty acids induce severe hypocalcemia in rats: a model for the hypocalcemia of pancreatitis. *J Bone Miner Res*. 1990;5(12):1249-55
16. Dykes C, Cash BD. Key safety issues of bowel preparations for colonoscopy and importance of adequate hydration. *Gastroenterol Nurs*. Jan-Feb 2008;31(1):30-5
17. Elin RJ. Assessment of magnesium status for diagnosis and therapy. *Magnes Res* 2010;23:194-98
18. Elin RJ. Magnesium metabolism in health and disease. *Dis Mon* 1988;34:161-218.
19. Felsenfeld AJ, Levine BS. Approach to treatment of hypophosphatemia. *Am J Kidney Dis*. 2012; 60(4):655-61
20. Food Standards Agency (2002) McCance and Widdowson's *The Composition of Foods*, Sixth Summary Edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

21. Giachelli CM. Vascular Calcification Mechanisms. *JASN* 2004; (15) 12: 2959-64
22. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Calcitonin inhibits osteoclast formation in mouse haematopoietic cells independently of transcriptional regulation by receptor activator of NF- $\kappa$ B and c-Fms. *Journal of Endocrinology* 2007; 195:415-27
23. Haslam SI, Van Hul W, Morales-Piga, A, et al. Paget's Disease of Bone: Evidence for a Susceptibility Locus on Chromosome 18q and for Genetic Heterogeneity. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998;13 (6): 911-17
24. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM.  $1\alpha$  Hydroxylase and the action of vitamin D. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000; 25:141- 48
25. Hoffman WS. *The Biochemistry of Clinical Medicine*. Year Book Medical Publisher Inc. Chicago 1970
26. [http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/absorb\\_minerals.html](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/absorb_minerals.html)
27. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123\\_chap4.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123_chap4.pdf)
28. <http://emedicine.medscape.com/article/241893-overview#a0104>
29. <http://emedicine.medscape.com/article/240681-overview#a0104>
30. Jahnen-Dechent W, Ketteler M Magnesium basics. in *Magnesium - a versatile and often overlooked element: New perspectives with a focus on chronic kidney disease*. *Clin Kidney J* (2012) 5 (Suppl 1): i3-i14
31. Kido Y, Okamura T, Tomikawa M, Yamamoto M, Shiraishi M, Okada Y. Hypocalcemia associated with 5-fluorouracil and low dose leucovorin in patients with advanced colorectal or gastric carcinomas. *Cancer*. 1996;78(8):1794-7.
32. Kim YS, Paik IY, Rhie YJ et al. Integrative physiology: defined novel metabolic roles of osteocalcin. *J Korean Med Sci* 2010; 25:985-91
33. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001; 142(12): 5050-5.
34. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007 ;130(3):456-69
35. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999; 140:3552-61
36. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson J.A., Johnson R., Hughes J. Osteopontin—a molecule for all seasons *QJM* (2002) 95 (1): 3-13
37. Mundy GR. The hypercalcemia of malignancy revisited. *J Clin Invest* 1988, 82:1-6
38. Nicar MJ, Pak CY. Oral magnesium load test for the assessment of intestinal magnesium absorption. Application in control subjects, absorptive hypercalciuria, primary hyperparathyroidism, and hypoparathyroidism. *Miner Electrolyte Metab* 1982;8:44-51
39. O'Halloran D J, Bloom S R. Calcitonin gene related peptide. *BMJ*, 1991; 302(6779): 739-40
40. Papaioannou A, Morin S, Cheung AM, Atkinson S, Brown JP, Feldman S et al. Review: 2010 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada: summary. *CMAJ* 2010 vol. 182 ( 17) 1864-73.
41. Quamme GA, Dirks JH. The physiology of renal magnesium handling. *Ren Physiol* 1986;9:257-69.

42. Rachner TD, Khosla S, Lorenz C Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *The Lancet* 2011; 377, ( 9773): 1276-87
43. Rude R. Magnesium disorders. In: Kokko J, Tannen R (eds). *Fluids and electrolytes*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1996, pp. 421–45
44. Seeling M. Cardiovascular consequences of magnesium deficiency and loss. Pathogenesis, prevalence and manifestations; magnesium and chloride loss in refractory potassium repletion. *Am J Cardiol*. 1989; 83:31-4
45. Shoback D. Clinical practice. Hypoparathyroidism. *N Engl J Med*. Jul 24 2008;359(4):391-403
46. Stamp TC, Round JM, Rowe DJ, Haddad JG. Plasma levels and therapeutic effect of 25-hydroxycholecalciferol in epileptic patients taking anticonvulsant drugs. *Br Med J*. 1972;4(5831):9-12
47. Stewart AF. Clinical practice. Hypercalcemia associated with cancer. *N Engl J Med* 2005; 352:373.
48. Theoleyre S, Wittrant Y, Kwan Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2004; 15(6): 457–75
49. Tietz NW. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1990
50. Toledo SPA, Lourenço DM Jr, Santos MA, Tavares MR, Toledo RA, de Menezes Correia-Deur JE. Hypercalcitoninemia is not Pathognomonic of Medullary Thyroid Carcinoma. *Clinics (Sao Paulo)* 2009; 64(7): 699–706
51. Vanstone MB, Oberfield SE, Shader L, Ardeshipour L, Carpenter TO. Hypercalcemia in Children Receiving Pharmacologic Doses of Vitamin D. *Pediatrics*. 2012;129(4):e1060-3
52. Verhave G, Siegert CE. Role of vitamin D in cardiovascular disease. *Neth J Med*. 2010;68(3):113-8.
53. Whyte MP. Hypophosphatasia. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Vogelstein B. *The metabolic & molecular bases of inherited disease* (8th ed.). 2001, New York: McGraw-Hill. pp. 5313–29
54. Yeap BB, Chubb SA, Flicker L et al. Association of total osteocalcin with all-causes and cardiovascular mortality in older men. *The Health in Men Study*. *Osteoporos Int* 2012; 23:599-606.

# 5

## Aminoacizii: structură, clasificare, metabolism

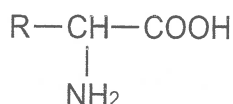
Didona Ungureanu

### INTRODUCERE

Aminoacizii reprezintă unitățile de bază din structura proteinelor. În urma hidrolizării proteinelor, dozarea aminoacizilor rezultați este utilă atât studiilor fundamentale din laborator cât și pentru investigarea unor defecte enzimatice de pe calea de degradare a scheletului de carbon al aminoacizilor, sindroame care se manifestă, în general, la nou-născuți sau în perioada copilăriei.

### 5.1 STRUCTURĂ

Aminoacizii sunt molecule care conțin o funcție carboxilică acidă, -COOH și o funcție aminică -NH<sub>2</sub>. În structura aminoacizilor cele două funcții sunt legate de același atom de carbon, un radical -CH. Structura generală a unui aminoacid este:



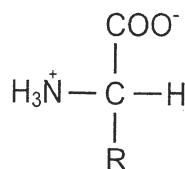
Astfel, fragmentul de moleculă -CH(NH<sub>2</sub>)COOH este comun tuturor aminoacizilor din structura proteinelor umane. Cealaltă parte a moleculei de aminoacid, numită și catenă laterală -R, este diferită de la un aminoacid la altul. Pentru cel mai simplu aminoacid, glicocolul (glicina) radicalul R este un atom de hidrogen. Pentru ceilalți aminoacizi, catena laterală are o structură mai complexă (Tabelul 5.1). Catena laterală le conferă proprietăți specifice fiecăruia, împărțindu-i în aminoacizi hidrofobi sau alifatici, aminoacizi dicarboxilici și amidele lor, aminoacizi bazici, aminoacizi cu radical aromatic, aminoacizi cu sulf, aminoacizi cu grupări hidroxil -OH.

### 5.2 PROPRIETĂȚI ACIDO-BAZICE ALE AMINOACIZILOR

Grupările carboxil și amino, cât și grupările funcționale ale aminoacizilor imprimă proprietăți acido - bazice peptidelor și proteinelor influențând decisiv structura și implicit și funcția acestor molecule.

La pH fiziologic, între 7,37 și 7,47 gruparea carboxil este disociată iar gruparea amino este protonată, structura unui amino acid putând fi redată astfel:

Acest tip de moleculă ionizată, având atât sarcină pozitivă cât și negativă, se numește ion bipolar sau amfolit (sau zwitterion).



La un pH mic, un aminoacid are structură cationică deoarece ambele grupări sunt protonate ( $-\text{NH}_3^+$  și  $-\text{COOH}$ ). Pe măsură ce pH-ul mediului crește, gruparea carboxil pierde protonul și aminoacidul devine amfolit la un pH egal cu aproximativ 6.

La valori mai mari ale pH-ului gruparea amino este deprotonată și aminoacidul se găsește sub forma unui anion.

Punctul izoelectric este pH-ul la care molecula există în formă amfolită, adică sarcina moleculei este zero. Poate fi calculat din formula  $pI = (pK_1 + pK_2):2$ , unde  $pK_1$  și  $pK_2$  reprezintă  $pK$ -urile grupării amino respectiv carboxil.

Glicina, având  $pK_1=2,34$  și  $pK_2=9,60$ , exemplifică comportamentul acidobazic al aminoacizilor care nu conțin grupări ionizabile în radicalul R.

Din cei 20 de aminoacizi, 7 conțin grupări ionizabile care influențează sarcina aminoacizilor, iar la nivelul proteinelor determină legături cu alți radicali R, imprimând moleculei proteice o anumită structură spațială și în consecință o anumită funcție.

### *INFLUENȚA RADICALILOR R ASUPRA PROPRIETĂȚILOR AMINOACIZILOR*

Radicalul R al aminoacizilor este responsabil de proprietăți speciale. În Tabelul 5.I, aminoacizii au fost clasificați în funcție de gruparea R; astfel, unii aminoacizi au grupări R nepolare și de aceea au caracter hidrofob. Alții au grupări R polare, hidrofile dar neutre din punct de vedere electric. Alți aminoacizi au grupări polare, încărcate electric, negativ sau pozitiv. Grupările R pot fi liniare ca valina sau ciclice ca de exemplu prolina, mici (glicina) sau mari (triptofanul). Această diversitate a grupărilor radicalice permite un număr mare de interacțiuni ceea ce are importanță în determinarea structurii proteice. În Tabelul 5.II sunt redate valorile  $pK$  ale grupărilor amino, carboxil cât și ale radicalilor R.

De exemplu, la pH fiziologic acidul glutamic și acidul aspartic au cea de-a doua grupare carboxil ionizată, astfel încât au sarcini negative la  $pH \approx 7$ . Cu excepția histidinei, majoritatea aminoacizilor bazici sunt încărcăți pozitiv la pH fiziologic. Aceste sarcini ale aminoacizilor permit, la nivel proteic, dezvoltarea de legături electrostatice atât în interiorul moleculei proteice cât și între proteină și ligant. Proprietățile acidobazice și solubilitatea diferită stau la baza separării electroforetice sau cromatografice a aminoacizilor.

Datorită structurilor radicalilor R, aminoacizii pot fi identificați prin diferite reacții biochimice.

Tabelul 5.1 Structura, caracteristicile și clasificarea aminoacizilor după natura radicalului

Numele uzual	Numele științific	Formula structurală	Comentarii
<b>I. Radical alifatic (acizi monoaminomonocarboxilici)</b>			
Glicina (Glicocol) Gly (G)	Acid aminoacetic	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Cel mai simplu aminoacid; optic inactiv; precursor în sinteza purinelor și porfirinelor; in vitro este utilizat ca soluție tampon.
Alanina Ala (A)	Acid amino-propionic	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Substrat pentru ALT (TGP); cel mai puțin hidrofob din grup.
Valina Val (V)	Acid amino-izovalerianic	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Aminoacid cu catena laterală ramificată; esențial; cetogenic; defect genetic în metabolismul său determină „boala urinii cu miros de arțar”.
Leucina Leu (L)	Acid α-amino-izocaproic	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Aminoacid cu catena laterală ramificată; esențial; parțial cetogenic; defect genetic în metabolismul său determină „boala urinii cu miros de arțar”.
Izoleucina Ile (I)	Acid α-amino-β-metil-valerianic	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Aminoacid cu catena laterală ramificată; esențial; parțial cetogenic; defect genetic în metabolismul său determină „boala urinii cu miros de arțar”.
<b>II. Radical cu grupare acidă (acizi monoaminodicarboxilici)</b>			
Acid aspartic Asp (D)	Acid amino-succinic	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Substrat al transaminazei glutaminoxalacetice (GOT sau AST); implicat în sinteza pirimidinelor.
Asparagina Asn (N)	γ-amida acidului amino-succinic	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Colector de grupări amino în țesuturi.
Acid glutamic Glu (E)	Acid α-amino-glutaric	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Cosubstrat al transaminazelor (AST și ALT).
Glutamina Gln (Q)	δ-amida acidului α-amino-glutaric	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Colector de amoniac în țesuturi; donator de grupare amino în sinteza purinelor și pirimidinelor.
<b>III. Radical cu grupare bazică (acizi diaminomonocarboxilici)</b>			
Arginina Arg (R)	Acid α-amino-δ-guanidinon-valerianic	$\begin{array}{c} \text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad \quad   \\ \text{HN}=\text{C} \quad \text{NH}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	Implicat în sinteza ureei; semiesențial.
Lizina Lys (L)	Acid α, ε-diaminocaproic	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad \quad   \\ \text{H}_2\text{N} \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Esențial.

Numele uzual	Numele științific	Formula structurală	Comentarii
Hidroxi-lizina Hyl	Acid $\alpha$ - $\epsilon$ -diamino- $\delta$ -hidroxi- n-caproic	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \quad   \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Se obține prin hidroxilarea posttranslațională a Lys; se găsește în collagen în cantități apreciable și de aceea doza sa în urină reprezintă un marker al turnoverului osos
Histidina Hys (H)	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -imidazolil- propionic	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{NH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Semiesențial; gruparea sa imidazol este cel mai important sistem tampon la pH fiziologic.

#### IV.Radical cu grupare hidroxi (Hidroxi aminoacid)

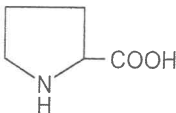
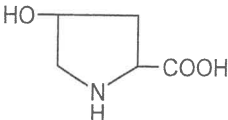
Serina Ser (S)	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi- propionic	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Se găsește în centrul activ al multor enzime; gruparea hidroxi poate suferi procese de fosforilare.
Treonina Thr (T)	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi- n-butiric	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Esențial.

#### V. Radical cu grupare tiolică (Tioaminoacizi)

Cisteina Cys C	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -mercapto- propionic	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{SH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Gruparea funcțională SH- se găsește în centrul activ al multor enzime; este responsabilă de formarea legăturilor disulfurice din structura proteinelor și peptidelor; homocisteina are un atom de carbon în plus față de Cys și actual este considerat marker de risc pentru ateroscleroză.
Cistina	Acid $\beta$ - $\beta$ -diti- ( $\alpha$ -amino- propionic)	$\begin{array}{c} \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Cistina este dicisteina Cys-S-S-Cys; nu se găsește liberă în țesuturi ci numai sub formă de radical cistienil în structura proteinelor.
Metionina Met (M)	Acid $\alpha$ -amino- $\gamma$ - metil-tio- n-butiric	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{S} \quad \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Esențial; donator de grupări metil în diferite reacții ale organismului; donator de sulf altor compuși.

#### VI.Radical aromatic (aminoacizi aromatici)

Fenil-alanina Phe (F)	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -fenil- propionic	$\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2$	Esențial; defect al metabolismului său determină fenilcetonuria.
Tirozina Tyr (Y)	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -(p-hidroxifenil) propionic	$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2$	Se poate sintetiza în organism dacă există Phe; intermediar în sinteza catecolaminelor, tiroxinei și melaninei.
Triptofan Trp (W)	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -(3)-indolil- propionic	$\text{Indol} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2$	Esențial; precursor al serotoninii și melatoninei; metabolizii săi sunt crescuți în sindroame carcinoide.

Numele uzual	Numele științific	Formula structurală	Comentarii
<b>VII. Iminoacizi</b>			
Prolina Pro (P)	Acid pirolidin-2-carboxilic		Datorită grupării imino destabilizează structurile $\alpha$ și $\beta$ secundare. Sub formă hidroxilată se găsește în structurile multor proteine ale țesutului conjunctiv.
Hidroxi-prolina Hyp	Acid 4-hidroxi-pirolidin-2-carboxilic		Sinteza sa din Pro se realizează posttranzlațional; alături de hidroxi-Lys reprezintă marker al turnover-ului osos deoarece reprezintă aproximativ 30% din structura collagenului.

Tabelul 5.II Valorile pK-urilor grupărilor ionizabile din aminoacizi

Gruparea ionizabilă	pK
Gruparea carboxil principală -COOH = pK1	1,7 – 2,6
Gruparea $\alpha$ -amino NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> = pK2	9 – 10,8
Gruparea carboxil secundară din R (de la Glu și Asp)	3,8 – 4,3
Gruparea imidazol a His	6
Gruparea sulfhidril a Cys -SH	8,3
Gruparea fenol a Tyr	10,1
Gruparea $\epsilon$ - amino a Lys -OH	10,5
Gruparea guanidinium a Arg	12,5

### 5.3 PEPTIDELE

Aminoacizii au proprietatea de a se „lega” unul de altul – o grupare carboxil a unui aminoacid reacționând cu o grupare amino a altui aminoacid cu formarea unei legături de tip amidic -CO-HN- cunoscută sub denumirea de legătură peptidică (Figura 5.1).

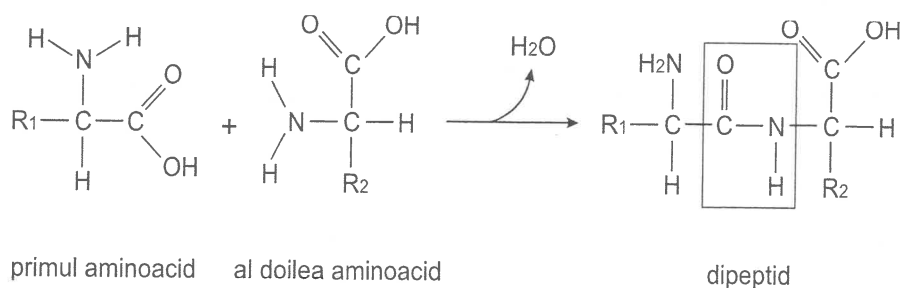


Figura 5.1 Formarea legăturii peptidice

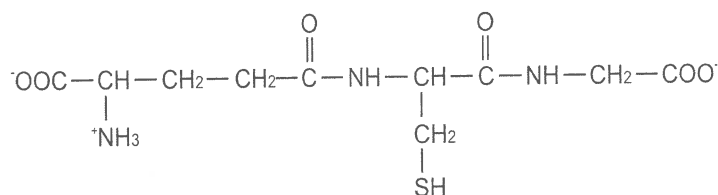
Un dipeptid poate interacționa cu un nou aminoacid rezultând un tripeptid.

Primul aminoacid care participă la legătura peptidică are gruparea amino liberă și de aceea este denumit aminoacid N-terminal. Al doilea aminoacid care participă are gruparea

carboxil liberă și de aceea se numește aminoacid C-terminal. Capete N- și C- terminale au și peptidele și proteinele, prin convenție aminoacidul N- terminal fiind considerat primul aminoacid.

Peptidele pot avea lanțuri scurte de doi, trei, patru aminoacizi fiind denumite di- tri- tetrapeptide.

De exemplu, glutationul este un tripeptid format din acid glutamic, cisteină și glicocol, care se găsește în toate celulele organismului.



### Glutation (GSH): $\gamma$ glutamil-cisteinil-glicină

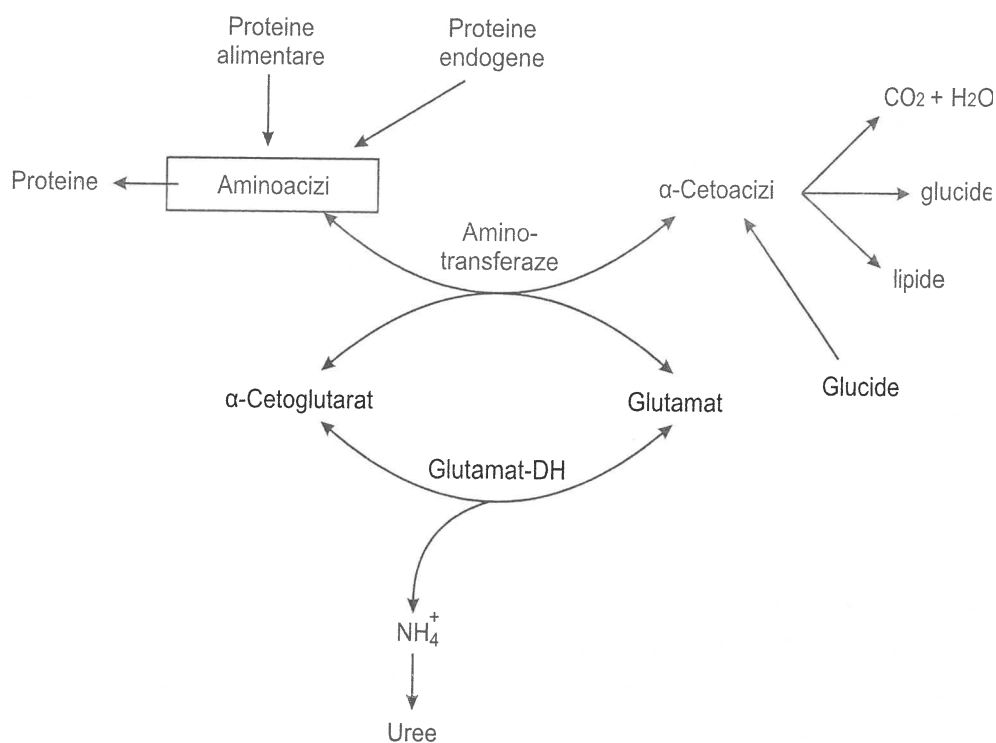
De remarcat că în glutation acidul glutamic participă la formarea primei legături peptidice prin gruparea  $\gamma$ -carboxil și de aceea structura glutationului este  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly. Gruparea funcțională a glutationului este gruparea sulfhidril și de aceea acronimul său este GSH. În organism poate exista în două forme- redusă (GSH) sau oxidată (GSSG) îndeplinind un important rol fiziologic, fiind socotit un important sistem oxidoreducător celular.

Lanțurile peptidice cu până la cinci aminoacizi se numesc oligopeptide, iar cele care conțin între 6 și 30 aminoacizi se numesc polipeptide. Lanțurile cu mai mult de 40 de aminoacizi se numesc proteine. Această împărțire este arbitrară deoarece structurile peptidelor și proteinelor sunt asemănătoare, fiind formate din aminoacizi.

Peptidele joacă roluri majore în funcția celulelor și implicit a organismului; de exemplu mulți hormoni sunt de natură peptidică. De asemenea, factorii de transcripție sunt peptide cu rol în „dirijarea” expresiei genelor.

## 5.4 METABOLISMUL AMINOACIZILOR

La subiecții sănătoși principala sursă de aminoacizi a organismului o reprezintă proteinele din alimente. Acestea suferă sub acțiunea enzimelor digestive (proteaze), un proces de hidroliză în urma căruia rezultă aminoacizii care apoi sunt absorbiți și prin vena portă ajung în ficat. Ficatul utilizează aminoacizii pentru sinteza proteinelor proprii cât și a multor altor proteine funcționale, care o dată sintetizate, trec în torentul circulator. Totuși, o parte din aminoacizii ajunși sau sintetizați în ficat – părăsesc acest organ și trec în circulația sanguină, constituind „pool-ul endogen” al aminoacizilor. Din sânge, aminoacizii sunt extrași de diferite țesuturi pentru sinteza proteinelor proprii. Dintre țesuturi, ficatul și rinichiul au un rol esențial în metabolismul aminoacizilor. În aceste organe au loc reacții de transaminare și dezaminare oxidativă, în urma cărora rezultă amoniac, compus toxic organismului. Amoniacul, la nivel hepatic este convertit în uree, iar la nivel renal este eliminat sub formă de ion amoniu  $\text{NH}_4^+$  participând astfel la îndepărtarea protonilor -  $\text{H}^+$  - din organism (Figura 5.2).



**Figura 5.2** Schema generală a metabolismului aminoacizilor

Aminoacizii din sânge sunt filtrați la nivelul glomerulului renal, dar la nivelul tubilor suferă un proces de reabsorbție activă, prin intermediul unor sisteme de transport saturabile. Astfel aminoacidemia crescută se însoțește de o creștere semnificativă a excreției renale (aminoacidurie). La subiecții normali, aminoaciduria este tranzitorie și se datorează unui aport alimentar excesiv în aminoacizi.

Reabsorbția renală este un proces activ, dependent de un sistem de patru proteine membranare transportoare cât și de concentrația intracelulară de  $\text{Na}^+$ . Sistemele membranare transportoare sunt: unul pentru aminoacizii neutri, altul pentru aminoacizii bazici, al treilea pentru prolină, hidroxiprolină și glicină și unul pentru aminoacizii dicarboxilici. Se pare că pentru unii dintre aminoacizi transportul transmembranar se realizează prin două mecanisme: unul de capacitate mică dar cu specificitate înaltă și un altul cu capacitate mare dar specificitate joasă. Puțini aminoacizi, ca de exemplu cistationina și homocisteina nu pot fi reabsorbiți eficient la nivel renal și de aceea suferă doar un proces de filtrare fiind ulterior eliminați în urina finală.

Se cunosc trei cauze ale aminoaciduriei:

- aminoaciduria datorată creșterii aminoacidemiei cu depășirea pragului renal;
- aminoaciduria renală – nivelul plasmatic al aminoacizilor este normal dar există un defect congenital sau dobândit la nivelul transportorului transmembranar;
- aminoaciduria „fără prag” de eliminare renală – în care se elimină renal, în cantități mari, un aminoacid sau un metabolit al acestuia datorită unui defect genetic pe calea de metabolizare a aceluia aminoacid, valoarea plasmatică a aminoacidului rămânând la valori normale;

De remarcat că homocistinuria, deși este o aminoacidurie „fără prag”, nu se datorează vreunui defect primar (genetic) sau secundar unei afecțiuni renale, ci doar depășirii capacității de reabsorbție renală.

Aminoacidemia prezintă variații în cursul unei zile, fiind mai crescută cu aproximativ 30% după amiaza și mai scăzută dimineața. De acest lucru trebuie să se țină cont atunci când se recoltează sânge pentru studiul unor defecte genetice, mai ales heterozigote.

Celulele conțin cantități de 10 ori mai mari de aminoacizi decât spațiul extracelular. Mecanismele care intervin în menținerea acestui gradient nu se cunosc, dar se pare că enzima membranară gama-glutamyltranspeptidaza este implicată.

#### 5.4.1 AMINOACIDURIILE

Pot fi primare sau secundare. Aminoaciduriile primare se datorează fie defectului genetic al unei enzime de pe calea de metabolizare a aminoacidului sau a proteinei transportoare, care intervine în reabsorbția renală. Aminoaciduriile secundare apar datorită fie afectării unui organ implicat în metabolismul aminoacizilor, ca de exemplu ficatul sau rinichiul, fie unei malnutriții grave.

##### 5.4.1.1 Aminoaciduriile primare

Actual, datorită posibilității de secvențiere a ADN-ului s-a demonstrat că aminoaciduriile primare se datorează unor mutații la nivelul unei enzime implicate în metabolismul unui aminoacid. Această enzimă determină o diminuare până la zero a activității enzimatice, care se manifestă fie prin acumularea în exces a substratului enzimei, care fiind toxic pentru organism, va determina o anumită simptomatologie, fie substratul enzimei defective este metabolizat de organism pe alte căi secundare, producându-se în exces metaboliți toxici, care în mod normal, au valori plasmatice și urinare foarte scăzute. Foarte rar defectul enzimatic se întâlnește pe calea de sinteză a unui compus util organismului (de exemplu, defectul în sinteza melaninei determină albinism). În unele cazuri nu se acumulează în sânge substratul enzimei defective deoarece la nivel renal acel metabolit nu este reabsorbit (aminoaciduriile fără prag renal de eliminare) – în aceste situații valorile sanguine ale substratului enzimei defective sunt scăzute, pe când valorile urinare sunt crescute.

Astfel diagnosticul unui defect enzimatic poate fi făcut la trei niveluri: 1. studiul ADN-ului pentru evidențierea mutației genetice; 2. studiul activității enzimei presupusă a fi defectivă; 3. dozarea metaboliților în amonte sau în aval de enzimă, sau a metaboliților rezultați în urma unei căi secundare, alternative existente pentru acel aminoacid.

Actual tendința este de a diagnostica prenatal defectul genetic de pe calea metabolică a aminoacidului prin studiul ADN-ului extras din lichidul amniotic obținut prin amniocenteză.

Simptomatologia și prognosticul aminoaciduriilor primare variază de la aproape benign, ca, de exemplu, în alcaptonurie, la letal ca în boala urinii cu miros de sirop de arțar („maple syrup urine disease”).

*Aminoaciduriile de cauză renală* (Tabelul 5.III) (de exemplu cistinuria) se caracterizează prin valori serice normale ale aminoacidului deoarece defectul este la nivelul proteinei transportoare de la nivel tubular. Proteina defectivă de la nivelul membranei tubului renal poate afecta un singur aminoacid sau un grup de aminoacizi care utilizează același sistem de reabsorbție tubulară.

*Aminoaciduriile primare* prin depășirea pragului renal, sunt în general boli genetice cu transmitere autosomal recesivă, ceea ce înseamnă că pentru a se manifesta, gena defectivă trebuie să fie prezentă pe ambii cromozomi (Tabelul 5.IV).

#### 5.4.1.2 Aminoaciduriile secundare

În general aminoaciduriile secundare afectează mai mulți aminoacizi simultan. Pot fi clasificate, ca și cele primare, în aminoacidurii prin depășirea pragului renal de eliminare (de exemplu în hepatita acută fulminantă, însoțită de necroza ficatului), cât și secundare afectării rinichiului (afectarea tubilor renali, de cauză primară sau secundară, ceea ce determină disfuncționalități la nivelul tubilor renali proximali).

Principalele defecte enzimatice ale metabolismului aminoacizilor vor fi descrise în Capitolul 5.4.3.2.

**Tabelul 5.III Aminoacidurii primare de cauză renală**

Boala	Prevalența	Aminoacidul prezent în exces în urină	Semne clinice	Tratament
Cistinuria - forma clasică	1: 13000	Lizina, ornitina, arginina, cistina	Calculi renali de cistină	Ingestie crescută de lichide, alcalinizarea urinei, D-penicilamina, captopril
Hipercistinuria	Rară	Cistina	Calculi renali de cistină	Ingestie crescută de lichide, alcalinizarea urinei, D-penicilamina, captopril
Aminoaciduria dibazică și intoleranța la proteine cu lizina	Rară	Lizina, ornitina, arginina	Stări de vomă, hepatomegalie, talie mică pentru vârstă, intoleranță la proteine, retard mintal	Dietă cu cantități scăzute de proteine
Iminoglicinuria	1:12000	Glicina, prolina, hidroxiprolină	Benignă	
Aminoaciduria dicarboxilică	Rară	Acid glutamic, acid aspartic	Probabil benignă	
Reabsorbție defectuoasă a metioninei	Rară	Metionina, dar și tirozina, fenilalanina, aminoacizii ramificați, acid $\alpha$ -hidroxibutiric	Depigmentarea părului, atac cerebral, retard mental	Dietă cu cantități scăzute de metionină

Tabelul 5.IV Aminoacidurii primare prin depășirea pragului renal

Boala	Prevalență	Enzima deficientă	Aminoacidul/ metabolitul în exces în sânge	Aminoacidul/ metabolitul în exces în urină	Semne clinice	Tratament
Hiperfenilalaninemie (forma clasică de fenilcetonurie) varianta I	1:10000	Fenilalanin hidroxilaza (absentă)	fenilalanina	Fenilalanina și metaboliții săi (fenilpiruvat, fenilacetat, o-hidroxifenilactat)	Retard mental, eczeme	Dietă fără fenilalanină
Varianta II	1:14000	Fenilalanin hidroxilaza (deficientă)	fenilalanina	variabil	Retard mintal moderat	Dietă fără fenilalanină
Fenilcetonuria tranzitorie, neonatală (Varianta III)	1:30000	Fenilalanin hidroxilaza (deficientă)	fenilalanina	Metaboliții fenilalaninei în general nu se întâlnesc în urină	normal	Nu este necesar
Varianta IV	Rară	Dihidropterin reductaza	fenilalanina	variabil	Semne neurologice	DOPA, 5-OH-tirptofan
Varianta V	1:30000	Defect în sinteza bipterinei	fenilalanina	variabil	Semne neurologice	DOPA, 5-OH-tirptofan
Tirozinemia Tipul I (tirozinoza)	1:100000	Fumaril acetocetat hidrolaza (absentă)	tirozina, metionina	Tirozina și metaboliții săi, DOPA, aminoaciduria generalizată (sdr. Fanconi)	Ciroză hepatică, afectare renală	Dietă fără fenilalanină, tirozină, metionină (dieta nu influențează evoluția spre ciroză)
Tipul II	Rară	Tirozin aminotransferaza (absentă)	tirozina	Tirozina și metaboliții săi, tiramina	Retard mintal, leziuni cutanate, oculare	Dietă fără fenilalanină, tirozină
Forma tranzitorie, neonatală (tipul III)	Nou născuți la termen 1:10, prematuri 1:3	Imaturitatea ficatului	tirozină, fenilalanină	Tirozina și metaboliții săi, tiramina	Nu se manifestă clinic	Vitamina C; dietă cu reducerea cantității de proteine ingerate

Boala	Prevalența	Enzima deficientă	Aminoacidul/ metabolitul în exces în sânge	Aminoacidul/ metaboli- tul în exces în urină	Semne clinice	Tratament
Alcaptonuria	1:250000	Homogentizin oxigenază (absentă)	acid homogen- tizin (creștere moderată)	Acid homogentizinic	Artrită degenerativă, pigmentarea cartilagiilor	Nu răspunde la nici un tratament
Homocistinuria	1:200000	Cistationin β-sintetază	homocisteina, metionina (moderat)	Homocisteina, metionina și sufoxidul său	Atingeri oculare, vasculare, osoase	Piridoxina, dietă fără metionină, îmbogățită cu cisteina
	Rară	Metilentetrahidrofolat reductază (absentă sau deficientă)	homocisteina, cu valori normale ale metioninei	Homocisteina, cu valori normale ale metioninei	Retard mintal	Acid folic
	Rară	Metiltransferaza	homocisteina, cu valori normale ale metioninei	Homocisteina și acid metilmalonic	Retard mintal	Vitamina B12
Histidinemia	1:20000	Histidaza (absentă)	Hisidină, alanină	Imidazol, acid piruvic și alți metaboliți ai săi	Variabil, de la normal alături simtomatologie neurologică ca de exemplu retard mintal sau defecte în vorbire	
Boala urinii cu miros de arțar	1:250000	Decarboxilaza specifică aminoacizilor ramificați este defectivă	În timpul atacurilor acute: leucina, izoleucina, aloizoleucina, valina și aminoacizii corespunzători	În timpul atacurilor acute: la fel ca în sânge	Acidoză care poate fi letală, însoțită de grețuri și alte simptome neurologice; alături se manifestă ca retard mintal	Dietă fără leucină, izoleucină, valină

Boala	Prevalența	Enzima deficientă	Aminoacidul/ metabolitul în exces în sânge	Aminoacidul/ metabol- tul în exces în urină	Semne clinice	Tratament
Hiperglicinemie noncetoacidotică	1:1500000	Defect la nivelul enzimei de scinda- re a glicinei	glicina	Glicina (și în LCR)	Semne neurologice, hipotonie și absența cetoacidozei și, în formele severe – retard mintal cu supraviețuire până la 2ani	Fără rezultat
Acidemia propio- nică	rară	Propionil CoA carboxilază (defi- ciență)	glicina	Glicina, propionatul, hi- droxiopropionat, metilcitra- t	Cetoacidoza me- tabolică cu un grad variabil de retard mintal	Dietă cu aport proteic scăzut
Acidemia metilma- lonică	1:20000	Metilmalonil CoA mutaza (absență sau deficiență)	Glicina, acidul metilmalonic	Glicina, acidul metilma- lonic (și în LCR), cetonurie	Cetoacidoza me- tabolică cu un grad variabil de retard mintal	Vitamina B12
Cistationuria	1:70000	γ-cistationaza (absență sau deficiență)	cistationa	Cistationa (și în LCR) și metaboliiții săi	benignă	Nu e necesar
Carnozinemie	1:500000	Carnosinaza (defi- ciență)	carnozina	Carnozina și homocarno- zina (și în LCR)	Sindroame neurolo- gice grave	Fără rezultat
Hiperprolinemie tipul I	0	prolin oxidaza (deficiență)	prolina	Prolina, hidroxiprolina, glicina	benignă	Nu e necesar
Hiperprolinemie II	1:30000	D-pirolin-5- acid carboxilic- dehidro- genază (deficiență)		Prolina, hidroxiprolina, glicina	benignă	Nu e necesar

### 5.4.2 BIOSINTEZA AMINOACIZILOR

Digestia proteinelor nu asigură întreaga cantitate de aminoacizi necesară organismului. În consecință, proporția de aminoacizi trebuie reechilibrată prin sinteză. Organismul uman nu poate realiza acest lucru deoarece nu poate sintetiza toți cei 20 aminoacizi, nedispunând de unele enzime necesare. Astfel aminoacizii esențiali nu pot fi sintetizați, iar alții, cum ar fi arginina poate fi sintetizată în ciclul ureei, dar nu în cantități suficiente.

Totuși, un număr de 12 aminoacizi neesențiali pot fi sintetizați din intermediari metabolici, iar trei (cisteina, tirozina, histidina) se sintetizează din aminoacizi esențiali.

În biosinteza aminoacizilor, un rol central îl ocupă glutamat-dehidrogenaza, glutamin-sintetaza și transaminazele; prin acțiunea lor combinată, amoniacul anorganic este transformat în grupare amino din aminoacizi.

### 5.4.3 CATABOLISMUL AMINOACIZILOR

Spre deosebire de acizi grași și glucoză, aminoacizii nu pot fi stocați în organism. Surplusul de aminoacizi care depășește necesarul pentru sinteza de proteine și alte biomolecule, este supus degradării.

#### 5.4.3.1 Catabolismul grupării amino

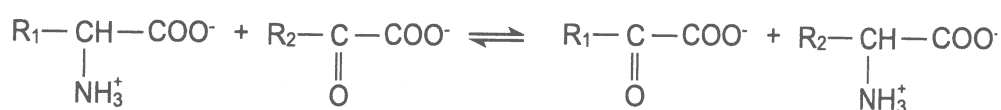
Animalele superioare, printre care și omul, excretă azotul proteic sub formă de uree, compus solubil în apă și netoxic. Prin catabolizarea aminoacizilor, gruparea  $\alpha$ -amino eliberată sub formă de ion  $\text{NH}_4^+$ , este convertită la uree, iar scheletul de C rămas este transformat în acetil CoA, piruvat sau alt intermediar din ciclul acizilor tricarboxilici. Acești din urmă compuși sunt utilizați drept sursă de energie și pentru sinteza de acizi grași, corpi cetonici și glucoză.

Îndepărtarea grupării  $\alpha$ -amino se realizează prin două procese:

- transaminarea, în care grupările amino ale majorității aminoacizilor sunt colectate sub formă de glutamat;
- dezaminarea oxidativă a glutamatului, prin care se eliberează  $\text{NH}_4^+$ , convertit ulterior în uree.

#### Transaminarea și dezaminarea oxidativă

Transaminarea, ca definiție, este reacția de transfer a unei grupări amino de pe un aminoacid pe un cetoacid, cu formarea unui nou aminoacid și a unui nou cetoacid.



Este o reacție reversibilă, catalizată de aminotransferaze sau transaminaze (Figura 5.3). Coenzima transaminazelor este vitamina B6, care este legată la un rest de lizină al enzimei și care în cursul reacției trece reversibil din forma sa de piridoxalfosfat în formă de piridoxaminfosfat. Cu excepția prolinei, lizinei și treoninei, toți ceilalți aminoacizii suferă reacții de transaminare în cursul metabolismului lor.

Enzima care catalizează această reacție este glutamin sintetaza – enzimă ATP-dependentă. Glutamina, este un aminoacid și odată formată, părăsește celula și pe cale sanguină ajunge în ficat sau rinichi, unde sub acțiunea unei hidrolaze – glutaminaza, eliberează amoniacul și acidul glutamic. În ficat amoniacul intră în ciclul ureei iar la nivel renal,  $\text{NH}_3$  este convertit la ion amoniu -  $\text{NH}_4^+$ , care se elimină renal, intervenind astfel în menținerea echilibrului acido-bazic al organismului.

Schematic, metabolismul amoniacului este redat în Figura 5.6.

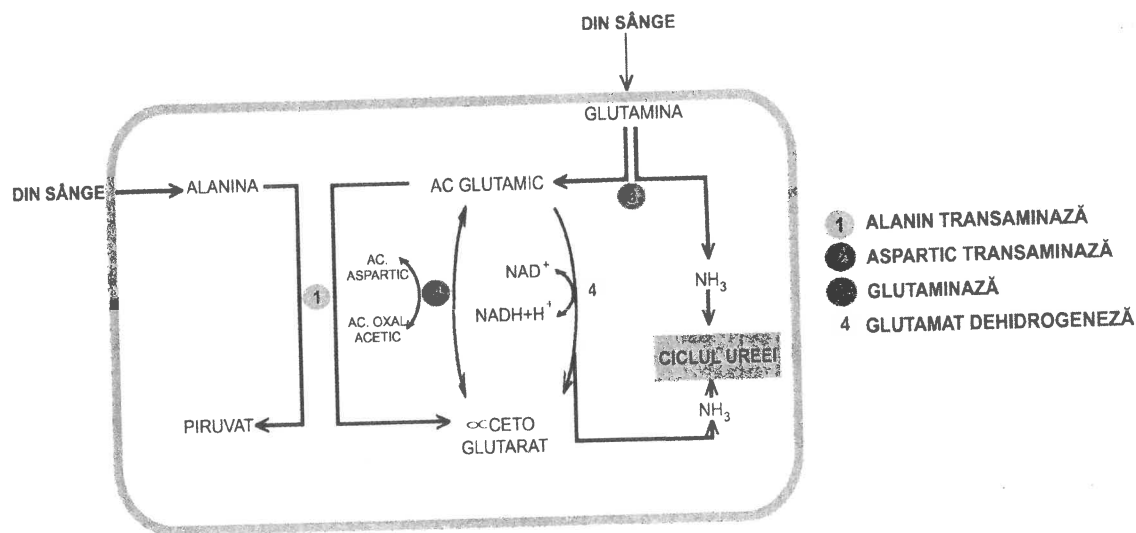


Figura 5.6. Metabolismul amoniacului

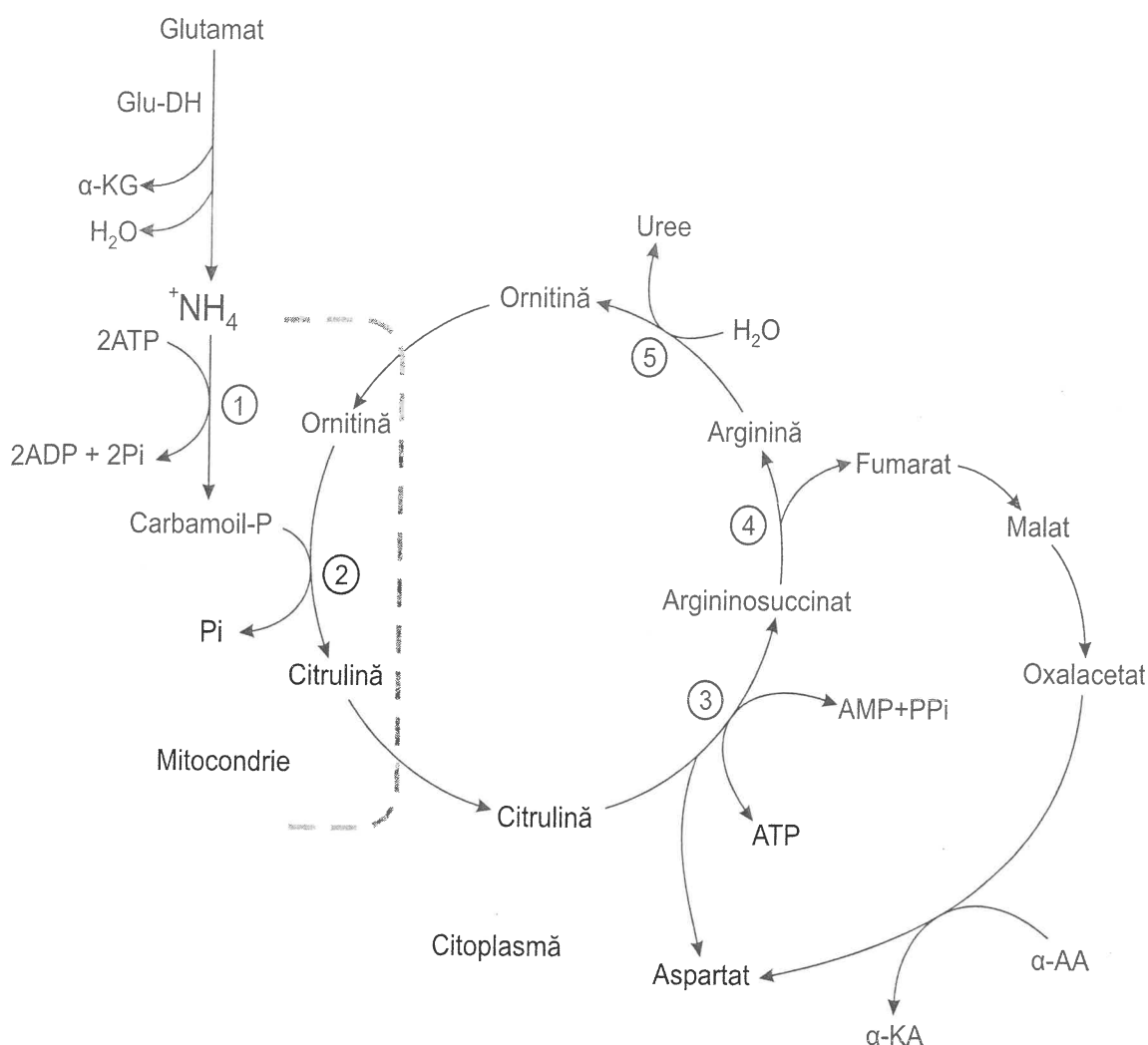
Calea principală de eliminare a amoniacului din organism o reprezintă sinteza ureei.

### Ureogeneză

Ureea reprezintă principala formă de eliminare a grupărilor amino din aminoacizi și reprezintă aproximativ 90% dintre componentele azotate ale urinei. Grupările amino ale ureei provin din amoniac și acid aspartic și sub acțiunea a cinci enzime sunt convertite în uree. Reacțiile au loc numai în hepatocite, în citoplasmă sau mitocondrie (Figura 5.7).

Primele două reacții au loc în mitocondria hepatică unde există și glutamat dehidrogenaza, donatorul primei grupări amino a ureei. Carbonul din structura ureei provine dintr-o moleculă de bioxid de carbon. Citrulina rezultată, difuzează din mitocondrie în citoplasmă, unde condensează cu acidul aspartic (al doilea donator de grupare amino din structura ureei) cu formarea argininosuccinatului. Acest compus este ulterior descompus în arginină și acid fumaric, iar în ultima etapă, arginina este descompusă în uree și ornitină de către arginază, enzimă strict hepatică. Astfel, dacă arginina se poate sintetiza și în alte țesuturi, clivarea sa la uree are loc numai la nivel hepatic, astfel numai în ficat se formează uree. Ureea, odată sintetizată, difuzează în spațiul extracelular și de aici în sânge. La nivel renal ureea este filtrată, dar parțial este și reabsorbită.

Acidul fumaric rezultat din ciclul ureei este utilizat în alte reacții metabolice: în urma hidratării la malat, acesta traversează membrana mitocondrială și ajuns în matrice, intră în



**Figura 5.7. Etapele sintezei ureei. 1.Carbamil-fosfat-sintetază; 2.Ornitol carbamil transferaza (OCT); 3.Argininosuccinat-sintetaza; 4. Argininosuccinaza; 5.Arginaza**

ciclul Krebs, transformându-se în acid oxalacetic și prin transaminare se obține acid aspartic (Figura 5.7).

Din punct de vedere energetic, în sinteza ureei se consumă 4 molecule de ATP: două sunt necesare pentru prima reacție, iar celelalte două sunt consumate pentru refacerea ATP-ului din AMP rezultat în reacția catalizată de a treia enzimă – argininosuccinat sintetază.

Reglarea sintezei ureei se realizează la nivelul primei etape catalizată de carbamilsintetază, etapa limitantă de viteză. Enzima este stimulată de N-acetilglutamat, compus care se sintetizează în organism din acetil-CoA și acid glutamic. Concentrația intracelulară a acestui compus crește după un prânz bogat în proteine.

Hiperamoniemia se caracterizează prin creșterea amoniacului în sânge și se manifestă prin tremurături ale membrelor, dificultăți în vorbire, tulburări de vedere, iar în cazuri severe, coma și moartea. Simptomele se instalează atunci când nivelurile hepatice și cerebrale de amoniac sunt crescute. Există două mari clase de hiperamoniemii:

- hiperamoniemia câștigată, care apare secundar unei boli hepatice grave, care evoluează spre insuficiență hepatică (ciroza hepatică de cauză virală, toxică, sau

obstrucția biliară). Datorită circulației colaterale care se dezvoltă, în timp, ficatul este șuntat, iar sângele portal se varsă direct în circulația sanguină. Astfel, amoniacul absorbit din tubul digestiv nu mai este convertit la uree, valoarea sa sanguină crescând foarte mult. Dintre țesuturi, creierul este cel mai vulnerabil, deoarece amoniacul ajuns în celula nervoasă se fixează pe  $\alpha$ -cetoglutarat (cu formare de acid glutamic), consumând astfel  $\alpha$ -cetoglutaratul necesar ciclului Krebs- principalul furnizor de ATP pentru celula nervoasă.

b. hiperamoniemia congenitală, implică defecte genetice ale celor cinci enzime de pe calea de sinteză a ureei (Figura 5.7):

1. defectul de carbamil-fosfat-sintetază - hiperamonemia tip I;
2. defectul de OCT - hiperamonemia tip II;
3. defectul de argininosuccinat-sintetază - citrulinemie;
4. defectul de argininosuccinază - argininosuccinaturie;
5. defectul de arginază - hiperargininemie.

Oricare dintre aceste defecte se manifestă prin simptome specifice intoxicației cu amoniac a cărui concentrație serică poate crește de la 10-20  $\mu\text{g/dL}$  la 500  $\mu\text{g/dL}$  încă din prima săptămână după naștere. De asemenea, aceste defecte enzimatice se caracterizează și prin retard mental.

Subiecții cu astfel de defecte genetice au o intoleranță și o repulsie față de alimentele bogate în proteine.

#### 5.4.3.2 Catabolismul scheletului de atomi de carbon al aminoacizilor

În funcție de compușii ce pot fi sintetizați din produșii finali ai căilor de degradare, aminoacizii pot fi grupați în trei categorii:

1. aminoacizii glucogenici care sunt degradați la piruvat sau la intermediari din ciclul Krebs, compuși ce vor fi convertiți la glucoză, via fosfoenolpiruvat (alanina, arginina, acidul aspartic, cisteina, acidul glutamic, glicina, histidina, hidroxiprolina, metionina, prolina, serina, treonina și valina);
2. aminoacizi cetogenici care sunt catabolizați fie la acetyl-CoA, fie la acetoacetyl-CoA, din care vor rezulta corpi cetonici (leucina);
3. aminoacizi glucogenici și cetogenici care pot genera atât glucoză cât și corpi cetonici (izoleucina, lisina, fenilalanina, triptofanul și tirozina).

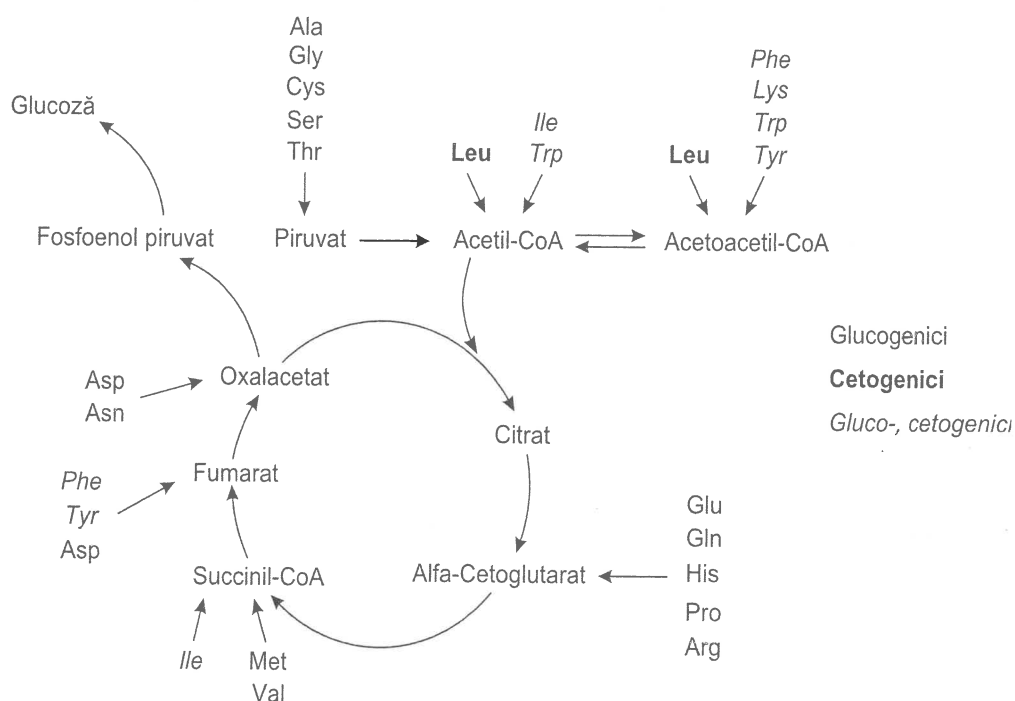
Punctele de intrare ale aminoacizilor în ciclul Krebs sunt acetyl-CoA,  $\alpha$ -cetoglutarat, succinil-CoA, fumarat și oxalacetat (Figura 5.8).

#### 5.4.3.3 Metabolismul individual al unor aminoacizi

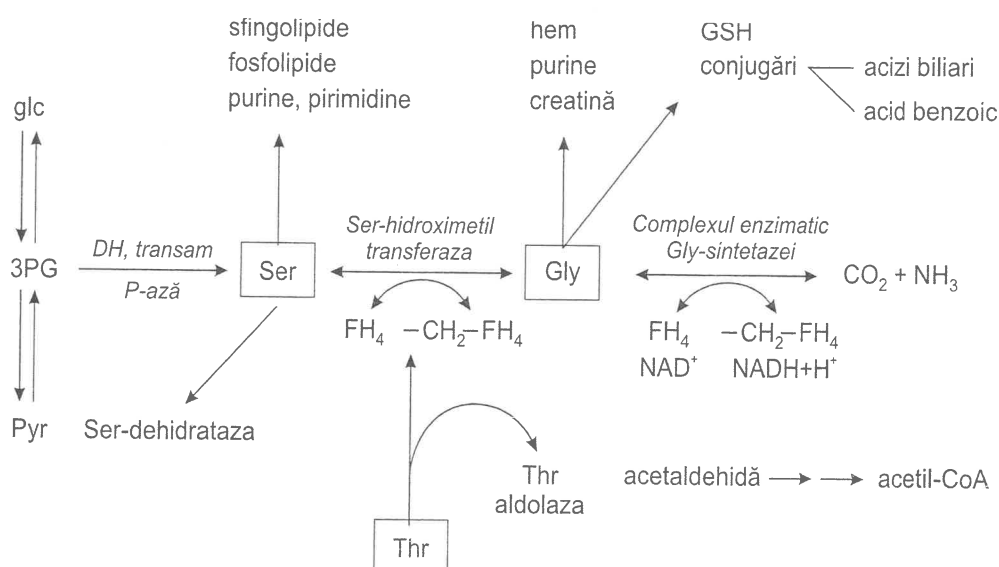
##### 5.4.3.3.1 Metabolismul glicocolului, serinei, treoninei (Figura 5.9)

Glicocolul este un aminoacid neesențial care poate participa la numeroase reacții metabolice în organism:

- transformarea reversibilă în serină prin intervenția serin hidroximetil-transferazei, reacție la care participă în calitate de coenzimă acidul folic sub forma N5-N10-metilen-FH4. Reacția poate continua cu formarea finală a acidului piruvic;
- sinteza hemului, împreună cu succinil-CoA;
- sinteza glutatationului;
- sinteza purinelor;
- sinteza creatinei;
- reacții de conjugare



**Figura 5.8 Metabolismul general al aminoacizilor. Punctele de intrare ale aminoacizilor în ciclul Krebs**



**Figura 5.9 Metabolismul glicocolului, serinei, treoninei.** Glc – glucoza; 3PG- 3fosfoglicerat; Pyr-piruvat; DH-dehidrogenaza; Transam-transaminaza; P-aza-fosfataza; FH4-acid tetrahidrofolic;

- glicocolul se poate transforma reversibil în bioxid de carbon și amoniac, sub acțiunea complexului enzimatic glicin-sintetază, complex care are drept coenzime acidul folic și NAD<sup>+</sup> și care este localizat la nivelul mitocondriei hepatice.

Hiperglicinemia noncetonică este datorată defectului genetic al complexului glicin sintetază având o incidență de 1:150000 de nașteri. Se caracterizează prin creșterea concentrației glicinei în ficat, creier, sânge și urină. Caracteristic este creșterea glicinei în lichidul cefalorahidian cu scăderea raportului glicină plasmatică/ glicină în LCR. Creșterea glicinei la nivel cerebral explică simptomatologia neurologică a subiecților cu acest defect enzimatic, deoarece glicina este un potent neurotransmițător inhibitor. Boala se caracterizează prin atacuri epileptice și hipotonie care rapid pot duce la insuficiență respiratorie fatală. Nu există un tratament eficient și pacienții, chiar cu formă ușoară a bolii prezintă retard mintal.

### Creatinogeneza

Creatina se găsește în special în mușchi și creier, atât liberă cât și fosforilată (fosfocreatină). Sinteza ei se realizează cu participarea a trei aminoacizi, glicocolul, arginina și metionina prin următoarele etape (Figura 5.10):

- transamidinarea – transferul grupării amidinice din arginină pe glicocol cu formarea glicociaminei (acid guanidin-acetic). Reacția are loc în rinichi, dar nu în ficat și mușchi.
- transmetilarea – transferul grupării metil de pe metionina activată (S-adenozil-metionina, SAM) pe glicociamină. Reacția are loc în ficat concomitent cu fosforilarea.

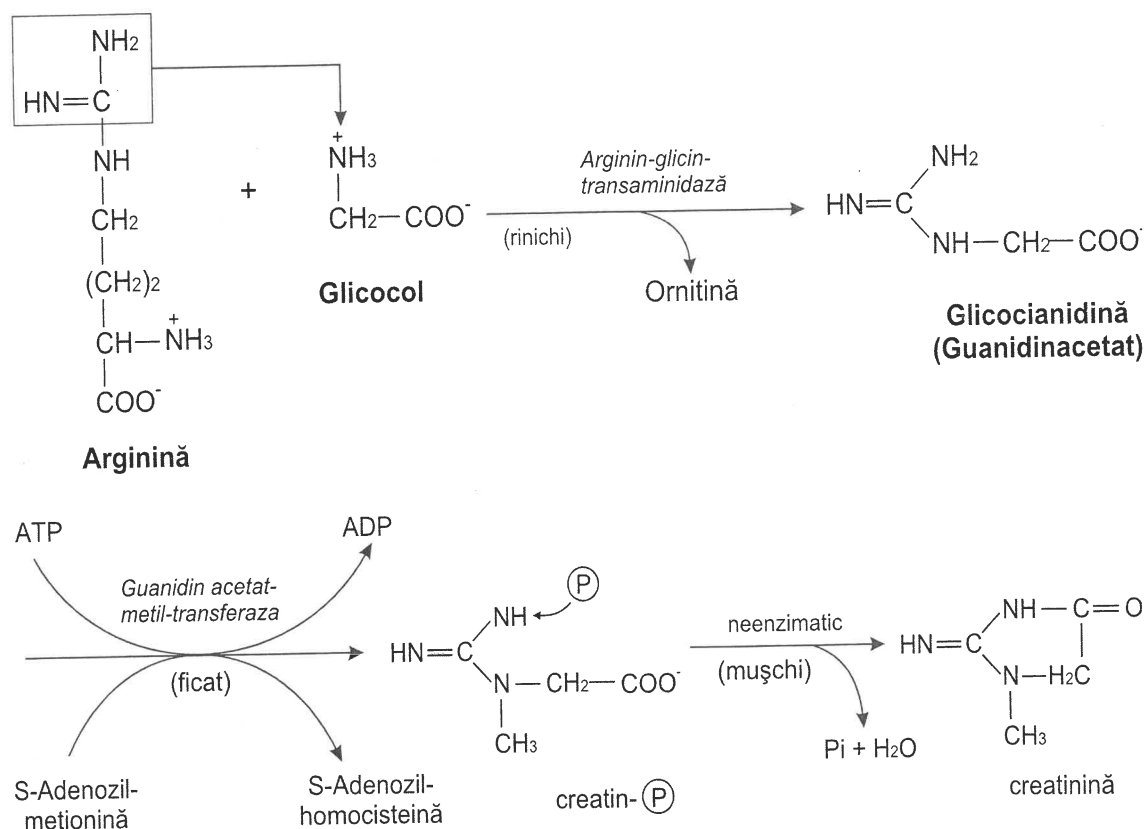


Figura 5.10 Etapele biosintezei creatininei

În mușchi creatina, în repaus, în prezența creatin-kinazei (CK) și ATP-ului regenerează cel de-al doilea compus macroergic al mușchiului – creatinfosfatul. În contracție, în primele minute, mușchiul utilizează creatinfosfatul pentru menținerea unui nivel corespunzător al ATP-ului.

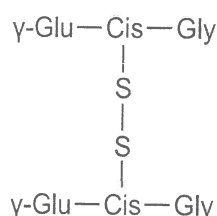
În practica medicală dozarea CK și a izoenzimelor sale oferă un indiciu în depistarea leziunilor mușchiului cardiac cât și scheletic.

Forma de excreție a creatinei este creatinina (anhidrida creatinei) care rezultă prin eliminarea neenzimatică a apei și fosfatului anorganic din creatină respectiv din creatinfosfat. Deoarece la nivel renal, creatinina este doar filtrată, reprezintă un marker valoros al evaluării ratei de filtrare glomerulare. Concentrația plasmatică a creatinei este 0,2-0,6 mg/dL, iar a creatininei 0,7-1,2 mg/dL la bărbați și 0,5-1,0 mg/dL la femei. Cantitatea de creatinină excretată prin urină în 24 de ore este constantă pentru un subiect dat, depinzând de masa musculară și de funcția renală.

### **Biosinteza glutathionului**

Glutathionul, un tripeptid cu grupare sulfhidrică, este un important derivat al aminoacizilor, având funcții fiziologice însemnate.

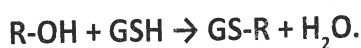
Glutathionul, prezent în celulele animale în concentrații înalte (aproximativ 5 mM) reprezintă un important sistem redox, trecând reversibil din forma redusă (GSH) în forma oxidată (GSSG), în care două molecule de tripeptid se leagă prin legătură disulfidică.



GSSG este redus la GSH prin glutathion-reductază, o flavoproteină ce utilizează NADPH ca sursă de electroni. În cele mai multe celule raportul GSH/GSSG este mai mare decât 500.

Glutathionul îndeplinește unele funcții importante:

- Glutathionul protejează proteinele celulare (enzime, hemoglobină) împotriva agenților oxidanți, jucând rol cheie în degradarea peroxidului de hidrogen și peroxizilor organici, compuși toxici pentru organism.
- Glutathion peroxidaza (GSH-PX), enzima ce catalizează reacția, conține un atom de seleniu. În centrul activ al enzimei se găsește un analog al cisteinei ce conține seleniu în locul sulfului.
- Participă la transportul aminoacizilor în celule;
- Participă la biosinteza leucotrienelor.
- La nivelul ficatului GSH, compus nucleofil, participă la reacția de conjugare prin care unele toxice electrophile (cum ar fi agenți cancerigeni) sunt neutralizați prin acțiunea unor glutathion-S-transferaze conform reacției:

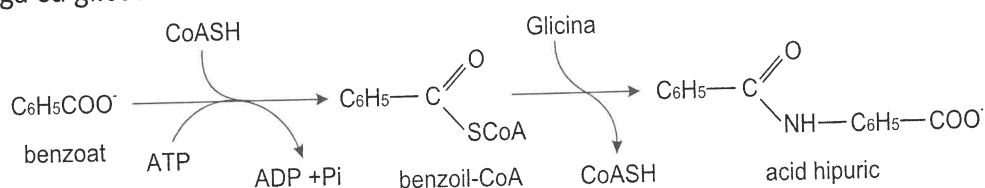


### Reacția de conjugare

Acizii biliari în reacția cu glicina se transformă în acizi biliari conjugați (acizi biliari primari) care sub formă de săruri biliare (agenți tensioactivi) intervin în absorbția lipidelor.

Mulți metaboliți și medicamente hidrofobe sunt conjugate, în ficat, cu glicocolul, fiind transformate în compuși hidrosolubili care se pot elimina din organism.

De exemplu, benzoatul, compus ce este utilizat pentru conservarea alimentelor, în ficat, se conjugă cu glicocolul rezultând acid hipuric.



Capacitatea ficatului de a converti benzoatul la acid hipuric este utilizată pentru evaluarea funcției hepatice.

Serina este un aminoacid neesențial care poate fi convertit fie în acid piruvic, fie în glicocol (Figura 5.9). Intervine în sinteza sfingolipidelor, a fosfolipidelor, a colinei.

Treonina este un aminoacid esențial și de aceea trebuie adus în organism prin alimentație. Sub acțiunea enzimei treoninaldolazei (piridoxal dependente), se transformă în acetaldehidă și glicocol. Acetaldehida prin oxidare și activare trece în acetyl CoA.

#### 5.4.3.3.2 Metabolismul cisteinei

Cisteina se poate metaboliza la acid piruvic prin oxidare, transaminare și desulfurare (Figura 5.11). Cisteina intervine în sinteza fosfo-adenozil-fosfo-sulfatului, fiind donator de sulf al organismului. Prin oxidare formează cistină, iar prin decarboxilare tioetanolamină, compus ce intervine în sinteza coenzimei A și a 4'-fosfopanteteinei. Zilnic, organismul uman excretă între 0,64-0,96 g sulf, în principal anorganic. Acesta provine în principal din degradarea cistinei (disulfura cisteinei) care sub acțiunea cistin-reductazei trece în cisteină.

**Cistinuria (cistin-lisinuria)** este consecința unui defect genetic la nivelul unui transportor de aminoacizi la nivelul membranei tubulare a nefronului. Se caracterizează prin eliminare urinară crescută de cistină, lizină, arginină și ornitină. În mod normal acești aminoacizi sunt

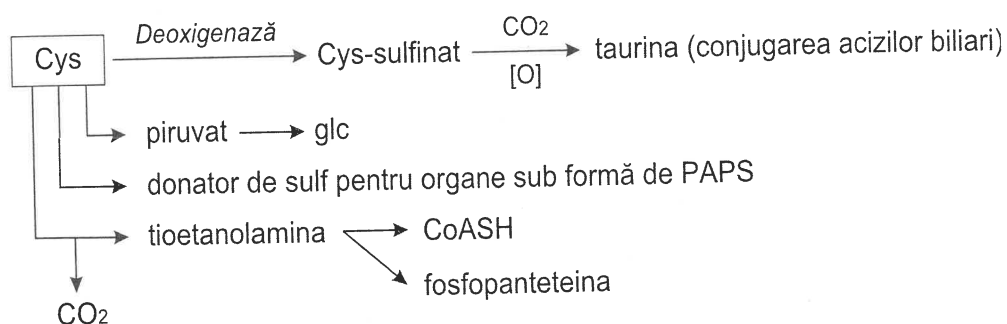


Figura 5.11 Reprezentare schematică a metabolismului ei

filtrați la nivel glomerular și apoi reabsorbiți la nivelul tubului proximal renal cu ajutorul unor proteine transportoare specifice. Există probabil trei tipuri de transportori: unul pentru cistină, altul pentru lizina, arginină și ornitină și al treilea care transportă toți acești aminoacizi. Cistinuria este datorată celui de-al treilea sistem transportor.

Singura manifestare clinică din cistinurie este tendința de formare de calculi urinari, din cauza solubilității reduse a cistinei. Administrarea de lichide sau penicilamină favorizează solubilizarea cistinei.

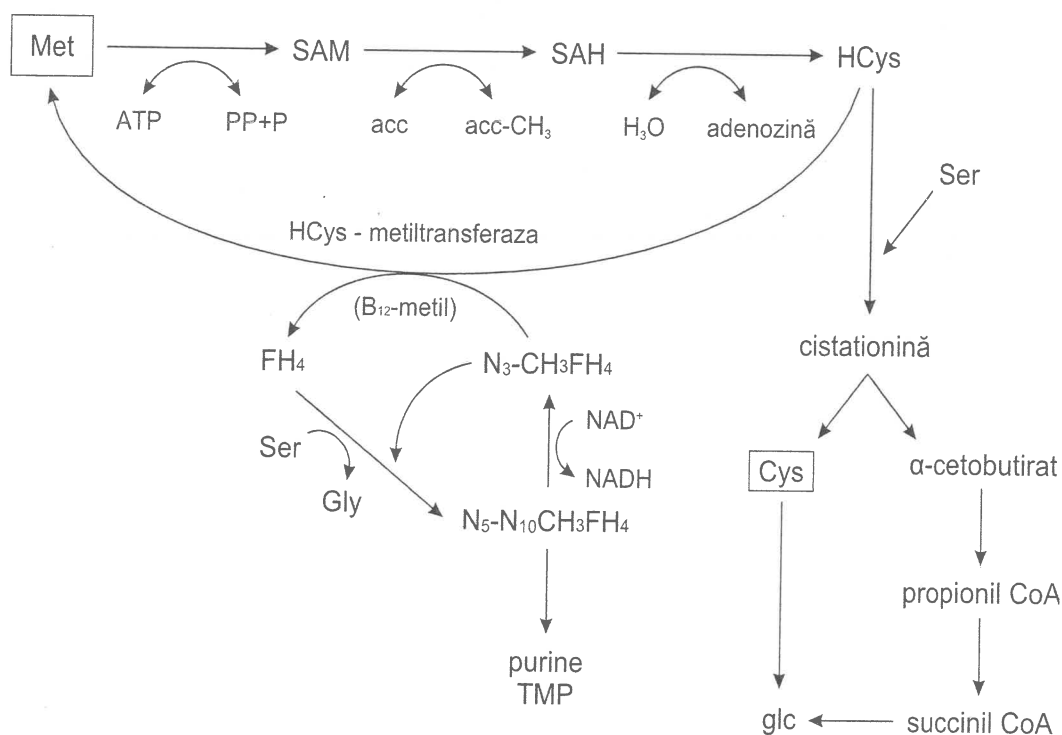
#### 5.4.3.3 Metabolismul metioninei

Metionina, aminoacid esențial, este metabolizată în organism pe calea succinatului printr-o secvență de reacții ce includ activarea metioninei la S-adenozil metionină, urmată de formarea în fază intermediară a homocisteinei (Figura 5.12).

Homocisteina poate condensa cu serina, în prezența cistationin –sintetazei, piridoxal dependentă, cu formarea unui intermediar cistationina, care prin clivare va determina formarea cisteinei.

**Homocistinuria** reprezintă un grup de afecțiuni caracterizate prin creșterea homocisteinei la nivelul țesurilor organismului. Incidența bolii este de 1:200.000 de cazuri. Se datorează defectului de cistationin β-sintază sau defectului de metilare a homocisteinei.

**Defectul de cistationin β-sintază** reprezintă cauza cea mai frecventă de homocistinurie. Datorită blocajului existent între homocisteină și cistationină (Figura 5.11) homocisteina și



**Figura 5.12 Metabolismul metioninei - interrelația cu cisteina;** acceptorii de grupări metil pot fi etanolamina pentru sinteza colinei, noradrenalina pentru sinteza adrenalinei, glicociamina pentru sinteza creatinei etc; acc – acceptor de grupare metil; acc-CH<sub>3</sub> – acceptor de grupare metil metilat; SAM-S – adenozil metionina; SAH – S adenozil homocisteina; Hcys – homocisteina; FH<sub>4</sub> – acid tetrahidrofoli; glc – glucoza; TMP – acid timidilic monofosfat

precursorul său- metionina- se acumulează în organism, cu scăderea cisteinei și a cistinei. Urina acestor pacienți va conține homocisteină și alți compuși cu sulf: metionină, metionin-sulfoxid, etc. Simptomatologia apare treptat, după perioada neonatală, cu semne la nivel ocular, scheletic, vascular. Cele mai grave forme sunt datorate trombozelor vasculare și arteriale care pot duce la decese chiar din primii ani de viață. Retardul mental care apare la aproximativ 40% din cazuri s-ar putea datora trombozelor cerebrale.

Din punct de vedere genetic boala este în general heterozigotă, cu scăderea parțială sau totală a activității enzimatică. De aceea bonavii pot fi tratați cu doze mari de piridoxină, un cofactor al enzimei defective. La subiecții la care activitatea enzimatică este zero, se indică o dietă săracă în metionină și suplimentată cu cistină.

**Creșterea homocisteinei serice este legată de patogeneza bolilor cardiovasculare.** Numeroase studii au arătat că homocisteina reprezintă un factor de risc independent pentru bolile cardiovasculare. Mecanismele prin care hiperhomocisteinemia (HHcys) ar determina disfuncție endotelială nu sunt pe deplin elucidate, dar o teorie ar cea a radicalilor liberi. Se știe că în plasmă, homocisteina (Hcys) poate exista sub diferite forme: se poate oxida la homocistină, prin trecerea grupării sale SH- la disulfid S-S, poate forma complexe homocistein-cisteină, sau poate forma un tioster ciclic – tiolactona – forma sa cea mai reactivă. Oxidarea Hcys și formarea tiolactonei sunt procese care se însoțesc de apariția speciilor de radicali liberi (ROS) - anion superoxid, apă oxigenată ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil. Acești radicali liberi au efecte devastatoare asupra endoteliului vascular: scad producția de oxid nitric, moleculă cu efect vasodilatator și antiinflamator și în consecință antiaterogen. (Figura 5.13)

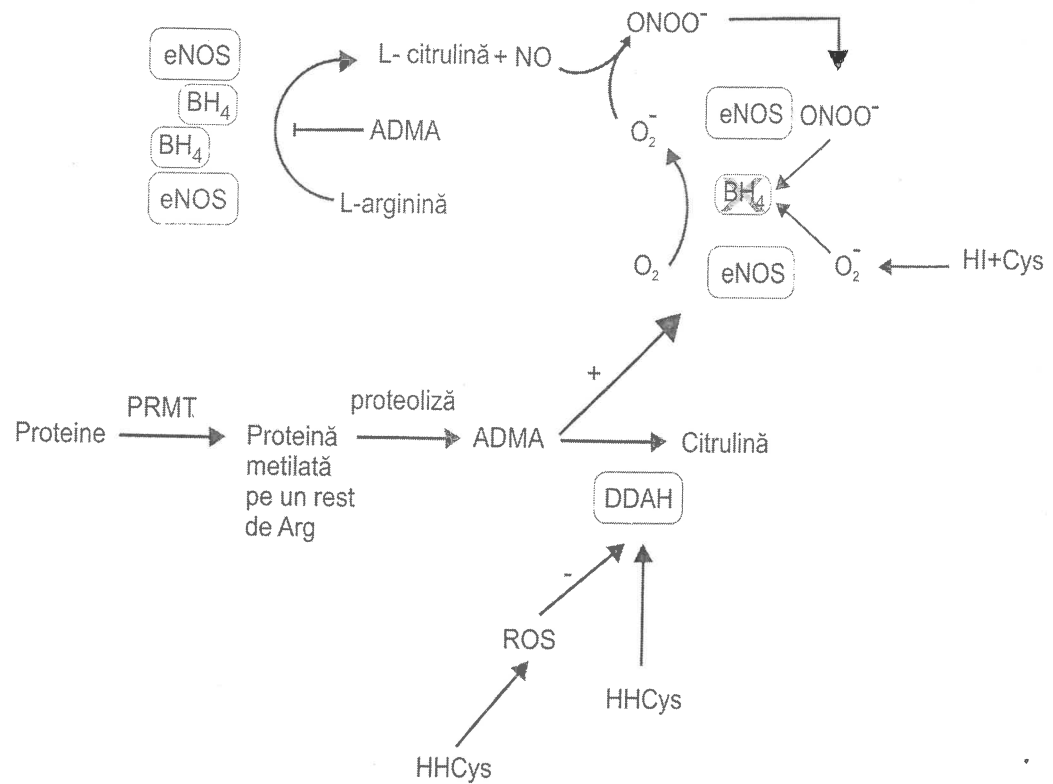
HHcys determină inactivarea cofactorului NO sintetazei – tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) (prin speciile radicalice pe care le produce) și decuplarea enzimei de  $BH_4$ . În consecință NO sintetaza își modifică activitatea și va produce specii reactive ale oxigenului (ROS) care se vor cupla cu NO producând un alt radical liber foarte activ: anion peroxinitrit ( $ONOO^-$ ).

De asemenea, ROS generate de HHcys vor determina oxidarea LDL care vor fi recunoscute doar de receptorul „scavenger” de pe monocite și vor iniția prin acest mecanism, apariția plăcii de aterom.

Speciile radicalice produse de HHcys vor determina creșterea malondialdehidei (MDA) care va determina scăderea activității paraoxonazei (PON), enzimă cuplată cu HDL și care are efect antiradicalic.

În consecință HHcys determină disfuncția endotelului vascular atât prin scăderea producției de oxid nitric cât și prin efectul său generator de radicali liberi determină atât apariția de particule LDL oxidate, blocând concomitent și funcția antiradicalică a paraoxonazei (enzimă care in vitro și in vivo și-a demonstrat eficacitatea în degradarea homocistein tiolactonei). Disfuncția endotelului vascular reprezintă „pivotalul principal” al tuturor bolilor vasculare și este asociată cu patologii variate incluzând ateroscleroza, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, boala cronică renală.

Se știe că homocisteina se poate metaboliza la metionină în prezența acidului folic și vitaminei B12 sau la cisteină, în prezența vitaminei B6. Lipsa acestor vitamine duce la acu-



**Figura 5.13 Efectele nocive ale hiperhomocistinemiei (HHcys) asupra producției de oxid nitric (NO);** eNOS- NO sintetaza endotelială; BH4 tetrahirobiopterina –cofactor esențial al eNOS; ADMA (asimetric dimetilarginina) – se sintetizează din arginină și acționează prin inhibiție competitivă asupra eNOS determinând scăderea sintezei NO. Dar ADMA stimulează și disocierea eNOS (este activă în formă dimerică), forma monomerică fiind responsabilă de producția de radicali liberi (ROS) ai oxigenului

mularea de homocisteină și la apariția disfuncției endoteliale care este responsabilă de multiple maladii cronice.

O altă cauză de hiperhomocisteinemie este deficiența de metilen-tetrahidofolat reductază, (MTHFR) enzimă implicată în transformarea Hcys în metionină (fig.5.12). Până în prezent s-au descris cel puțin 40 de mutații la subiecți cu HHcys și homocistinurie, majoritatea mutațiilor constând în înlocuirea unui singur aminoacid.

Aceste mutații se asociază cu scăderea activității enzimatice până la pierderea totală a acesteia. Cele mai studiate mutații ale genei MTHFR sunt C677T (constă în substituirea, la nivelul enzimei, a unui rest de alanină cu valina) și A1298C (înlocuirea unui rest de glutamat cu alanina). În ambele situații activitatea enzimei este scăzută, iar pacienții prezintă HHcys care va determina creșterea stresului oxidativ, disfuncție endotelială cu inducerea unui status procoagulant, care va crește riscul pentru infarct de miocard și accidente vasculare cerebrale. Studiile clinice arată că mutațiile MTHFR sunt prezente la 28% din subiecții cu boală vasculară prematură.

#### 5.4.3.3.4. Metabolismul fenilalaninei

Fenilalanina, aminoacid esențial, este convertită la tirozină prin acțiunea fenilalaninhidroxilazei, o oxidază cu funcție mixtă, prezentă în ficat și absentă în alte țesuturi.

Reacția implică încorporarea unui atom de oxigen în poziția para- a fenilalaninei, iar cel de al doilea atom de oxigen, în apă.

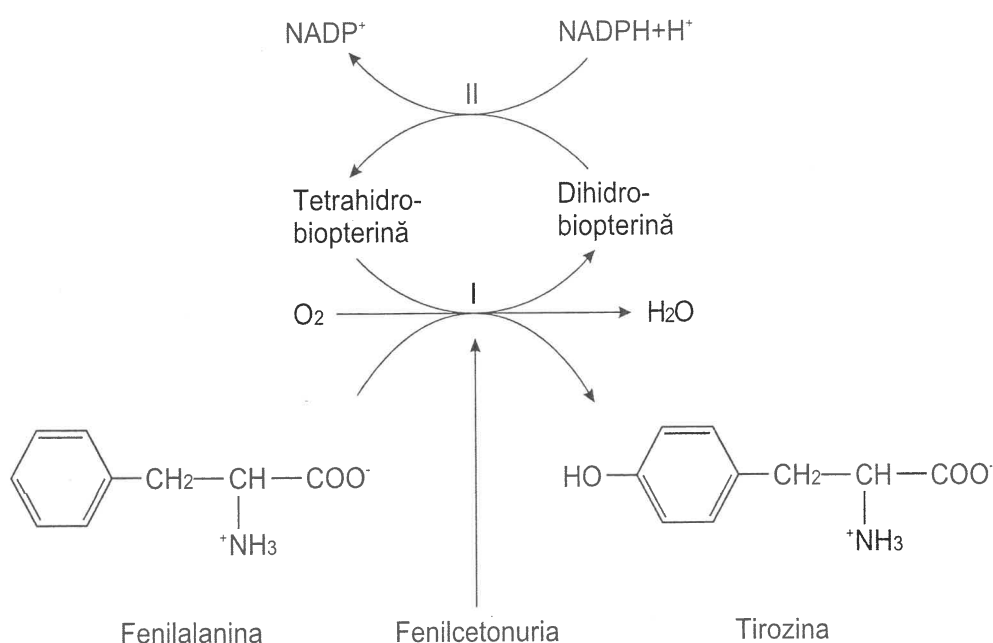
Agentul reducător este NADPH care cedează hidrogenii prin intermediul tetrahidroxi-biopterinei, compus asemănător acidului folic.

### **Anomalii în metabolismul fenilalaninei**

Reprezintă un grup de afecțiuni genetice caracterizate prin incapacitatea totală sau parțială de transformare a fenilalaninei în tirozină datorată în principal deficienței fenilalanin-hidroxilazei (I). Totuși 1-3% din hiperfenilalaninemii se datorează fie defectului dihidrobiopterin reductazei (II) sau unei enzime pe calea de sinteză a biopterinei. Incidența bolii este de 1:10.000 de nașteri. Clinic se caracterizează prin retard mental sever. La naștere copiii sunt aparent sănătoși, iar ulterior dezvoltă semne nespecifice: dezvoltare întârziată, dificultăți în deglutiție, stări de vomă. Unii copii dezvoltă un miros caracteristic secundar producției crescute de acid fenilpiruvic. Fără tratament, retardul mental progresează și devine ireversibil. Unii dezvoltă în timp hipopigmentație, deoarece fenilalanina în cantități mari inhibă tirozinaza, enzima responsabilă de transformarea tirozinei în pigment melanic.

În țările occidentale diagnosticul se face prin teste screening la toți nou-născuții. Confirmarea se face prin evidențierea defectului genetic.

*Fenilcetonuria clasică* se caracterizează printr-un deficit în funcționalitatea fenilalanin-hidroxilazei. În aproximativ 50% din cazuri funcționalitatea enzimei este abolită complet. Deoarece fenilalanina nu mai poate fi metabolizată în tirozină, începe să se acumuleze în toate fluidele organismului concentrația sa serică crescând de la < 2mg/dL la peste 20mg/dL. De asemenea, se activează căile secundare de metabolizare a fenilalaninei, cu transformarea sa în fenilpiruvic, fenilactic și fenilacetic. Acești derivați sunt rapid eliminați în urină (Figura 5.14).



**Figura 5.14 Metabolismul fenilalaninei.**

I = fenilalanin hidroxilaza, II = dihidrobiopterin reductaza

*O variantă a fenilcetonuriei clasice se caracterizează printr-o activitate a fenilalaninhidroxilazei scăzută cu 94% din normal, iar nivelul seric al fenilalaninei nu depășește 8 mg/dL. În această formă cetonuria poate fi absentă.*

*Hiperfenilalaninemia neonatală, tranzitorie, se datorează unor sisteme enzimatice hepatice insuficient maturate la naștere, iar nivelul fenilalaninei nu depășește 12 mg/dL.*

*Hiperfenilalaninemia maternă apare la paciente gravide cu fenilcetonurie clasică, care au ținut un regim igienico-dietetic încă din copilărie, ajungând astfel la vârsta adultă. Cantitățile mari de derivați cetonici ai fenilalaninei trec placentă, determinând efecte dezastruase la nivelul fătului.*

*Hiperfenilalaninemia secundară deficitului de dihidrobiopterin reductază sau a unui deficit în sinteza biopterinei, se caracterizează clinic prin diverse sindroame neurologice, ce se instalează progresiv. Lipsa biopterinei în forma sa activă, va determina o scădere a sintezei serotoninei, dopaminei, noradrenalinei, toți acești compuși având rol de neurotransmițători. Tratamentul constă în administrarea de precursori ai acestor neurotransmițători sau de biopterină.*

#### **5.4.3.3.5 Metabolismul tirozinei**

Tirozina este un aminoacid care se poate sintetiza în organism din fenilalanină. Este precursorul hormonilor tiroidieni, medulosuprarenalieni, pigmentului melanic.

Degradarea tirozinei se face pe calea acetoacetyl-CoA și acidului fumaric (Figura 5.15).

#### **Anomalii în catabolismul tirozinei**

##### **Alcaptonuria**

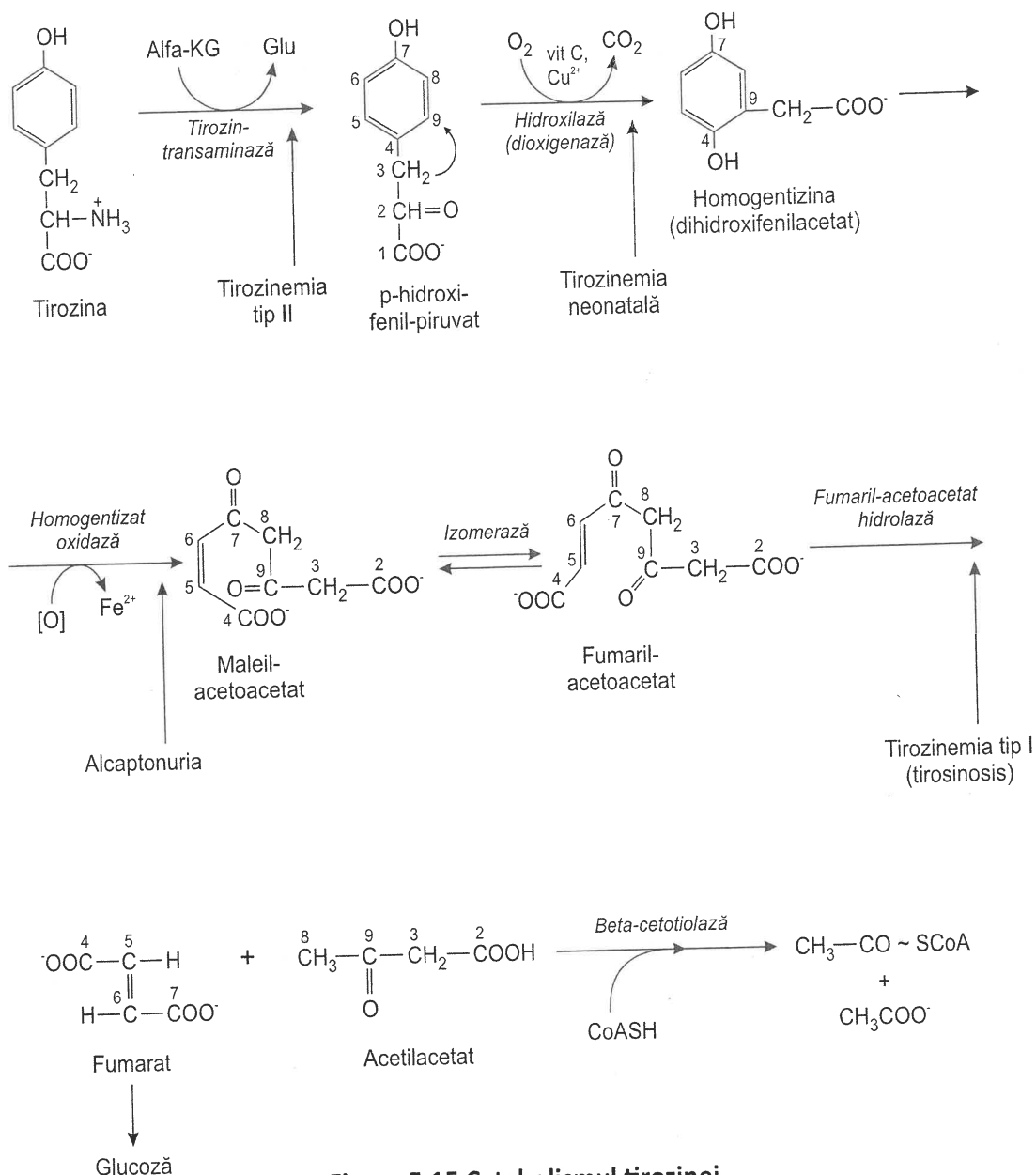
Cea mai importantă etapă în calea metabolică de degradare a tirozinei este deschiderea nucleului aromatic catalizată de homogentisinat oxidaza (reacția 3). Absența ei conduce la acumularea acidului homogentisinic în țesuturi și eliminarea lui prin urină. Urina care conține homogentisinat se înnețește în prezența aerului prin transformare în acid benzoquinonacetic și polimerizarea acestuia la pigmentul brun "alcapton". Alcaptonuria a fost descrisă încă din 1649 și definită ca defect enzimatic de Archibald Garrod în 1902.

Depunerea de alcapton în cartilajii duce la colorarea acestora în brun (ocronoză) asociată clinic cu simptome de artroză.

Descompunerea tirozinei este dependentă de două vitamine hidrosolubile, acidul ascorbic și acidul folic, care pot preveni defectul de oxidare a tirozinei observat la cobaii alimentați cu o dietă lipsită de aceste vitamine. Alcaptonuria a fost observată la cobaii cu scorbut, dar și la copiii prematuri privați de vitamina C. Administrarea de vitamină C și acid folic înlătură alcaptonuria. Rolul vitaminei C în acest proces este înlăturarea inhibiției de la nivelul homogentizinat oxidazei.

În cazul unei alcaptonurii de origine genetică, vitamina C nu are efect.

Tirozinemia tip I (tirosinosis) – defect de fumaril-acetoacetat-hidrolază (reacția 4) și posibil de maleilacetoacetat-hidrolază; se produce acumularea metaboliților ce afectează sistemele de transport intracelular al aminoacizilor.



**Figura 5.15 Catabolismul tirozinei**

Tratamentul constă într-o dietă cu concentrații scăzute de fenilalanină, tirozină și ocazional de metionină.

Tirozinemia tip II, sindromul Richner-Hanhart, este cauzat de lipsa tirozin-transaminazei hepatice (reacția 1) care conduce la creșterea concentrației de tirozină în plasmă. Se produc leziuni caracteristice la ochi și piele, întârziere mentală moderată, automutilare și perturbări de coordonare.

În urină este crescută tirozina, alături de metaboliții ei: p-hidroxipiruvat, p-hidroxifenil-lactat, p-hidroxifenilacetat, N-acetiltirozină și tiramină.

Tirozinemia neonatală— defect de p-hidroxifenilpiruvat hidroxilază (reacția 2), conduce la creșterea tirozinei și fenilalaninei în sânge și eliminarea acestor aminoacizi și a metaboliților lor prin urină. Terapia constă într-o dietă săracă în proteine.

Tirozina servește drept precursor pentru câțiva compuși biologic activi: catecolamine, melanine, hormoni tiroidieni.

### Biosinteza catecolaminelor

Celulele neuronale convertesc tirozina la norepinefrină și epinefrină prin următoarea succesiune de reacții:

În medulosuprarenală, noradrenalina este metilată la azot cu *S*-adenozilmetionină ca donor de grupări metil. Sinteza transmetilazei este indusă de glucocorticoizi și inhibată de epinefrină.

### Sinteza melaninei

Are loc în melanocite pe calea DOPA, reacția de hidroxilare fiind catalizată de o tirozin-hidroxilază dependentă de cupru. DOPA este apoi oxidată la Dopachinonă și în final prin polimerizare trece în melanină (Figura 5.16).

Albinismul reprezintă un grup de sindroame clinice caracterizate prin deficit de melanină, localizate la ochi și piele. Semnele clinice comune pentru toate cele zece forme de albinism uman oculocutanat includ scăderea pigmentării pielii și ochilor; diferențierea se bazează pe caracteristicile lor clinice, biochimice, ultrastructurale sau genetice.

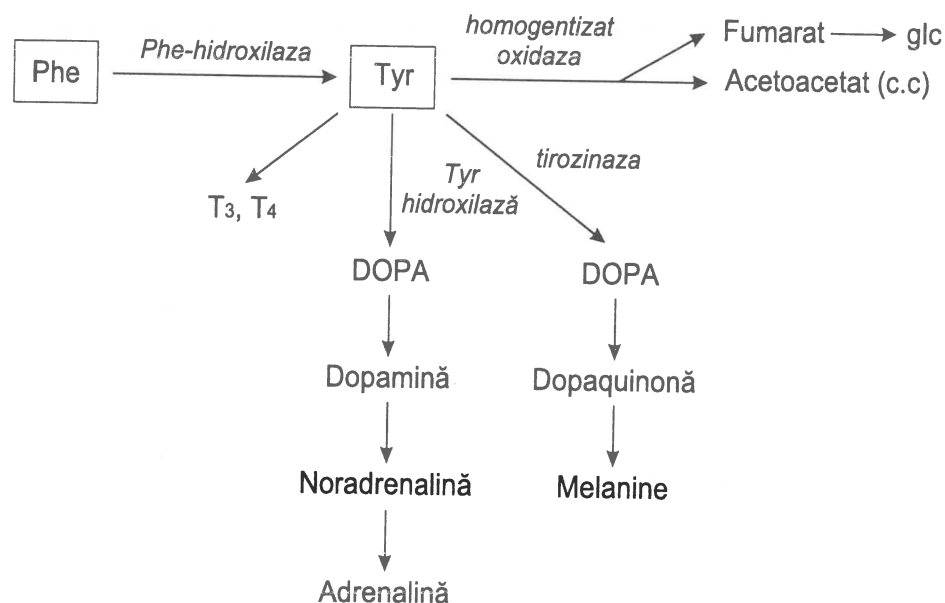
Enzima defectivă în albinism este tirozin-hidroxilaza din melanocite. În unele forme, cauza este un defect în transportul tirozinei prin membrană.

### Biosinteza hormonilor tiroidieni

Glanda tiroidă secretă doi derivați ai tirozinei: tiroxina sau T4 (3,3',5,5'-tetraiodtironină) și T3 (3,3',5'-triiodtironină).

Hormonii se formează în celulele foliculare din glanda tiroidă prin iodurarea resturilor de tirozină din tiroglobulină.

Monoiodtirozina (MIT) și diiodtirozina (DIT) formați reacționează pentru a forma T3 și T4.



**Figura 5.16 Biosinteza catecolaminelor și melaninei.** glc-glucoză; c.c.-corp cetonic; T3, T4-triiodotironina, tiroxina; DOPA-dioxifenilalanina; NA-noradrenalină; A-adrenalină;

Tiroglobulina iodurată este păstrată în lumenul foliculilor tiroidieni și hidrolizată pentru eliberarea T3 și T4 care trec în circulație.

T3 este forma activă fiind aptă să se fixeze pe receptorii din nucleii celulari. Aproximativ 2/3 din T3 plasmatic rezultă prin deiodurarea T4 în țesuturile periferice.

#### 5.4.3.3.6 Metabolismul triptofanului

Triptofanul se descompune pe calea kinurenină - acid antranilic, prin care patru atomi de carbon sunt convertiți la acetoacetyl-CoA și doi, la acetyl-CoA (Figura 5.17). Calea este importantă deoarece servește atât pentru descompunere cât și pentru convertirea triptofanului la nicotinamidă.

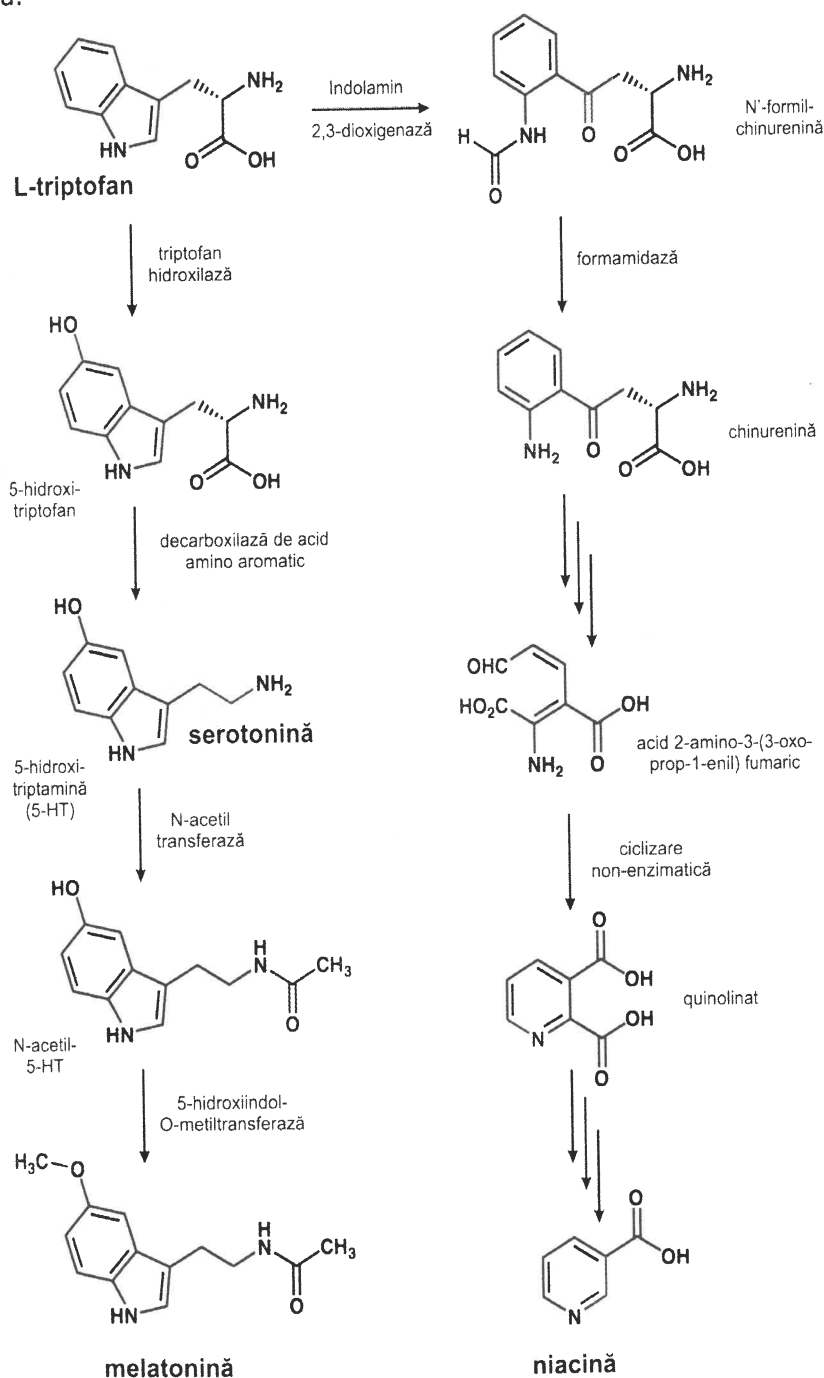


Figura 5.17 Metabolismul triptofanului

Sub acțiunea triptofan oxigenazei (triptofan-pirolază) are loc clivarea nucleului indolic prin oxidare rezultând N-formil-kinurenina, care prin hidroliză pierde radicalul formil și trece în kinurenină. Aceasta, prin hidroxilare, formează 3-hidroxi-kinurenină.

Kinureninaza care îndepărtează hidrolitic alanina din 3-hidroxi-kinurenină este dependentă de piridoxal-5-fosfat (P-5-P). În deficit de vitamina B6, kinurenina nu se mai degradează pe cale normală, ci este convertită la acid xanturenic, compus identificat în urină.

Triptofanul este precursor pentru  $\text{NAD}^+$ , serotonină și melatonină.

### **Biosinteza nicotinamidei (vitamina PP)**

Biosinteza vitaminei PP este comună cu calea de degradare până la acidul 2-acroleil-3-amino fumaric. Mai departe 97% din compus se degradează la acetyl-CoA și numai 3% este convertit la acid nicotinic. Din 60 mg triptofan se sintetizează 1 mg acid nicotinic.

Deficitul de vitamină B6 afectează biosinteza vitaminei PP prin blocarea acțiunii kinureninazei, condiție ce favorizează pelagra.

Utilizarea excesivă a făinii de porumb în alimentație crează condiții de apariție a pelagrei deoarece nicotinamida există în făină sub formă complexă din care nu poate fi eliberată.

Acidul nicotinic (dar nu și nicotinamida) a fost utilizat pentru scăderea colesterolului plasmatic, deoarece inhibă trecerea acizilor grași liberi (AGL) din țesutul adipos și conduce la scăderea încorporării colesterolului în fracțiunile lipoproteice VLDL, IDL și LDL.

### **Biosinteza serotonininei**

Serotonina este sintetizată în neuroni, în glanda epifiză și în celulele cromafine din tractul gastrointestinal.

Triptofan-hidroxilaza este etapa limitantă a sintezei necesitând tetrahidrobiopterină.

Decarboxilarea este realizată de aceeași enzimă care decarboxilează DOPA la Dopamină.

Serotonina este stocată în granule asociată cu ATP. Serotonina (enteramina sau trombocitina) este vasoconstrictor și stimulator al musculaturii netede. Ea participă la reglarea activității nervoase superioare.

Catabolismul serotonininei duce la formarea de derivați indolici care sunt excretați prin urină sub formă de sulfo și glucuronoconjugați.

### **Biosinteza melatoninei**

Melatonina este un hormon produs de glanda epifiză care are efecte asupra sistemului hipotalamus-hipofiză.

Se formează prin acetilarea la azot a serotonininei, urmată de metilarea la gruparea  $-\text{OH}$  din poziția 5.

### **Anomalii în metabolismul triptofanului**

Sindromul carcinoid (argenta carcinoma) este produs de o proliferare benignă sau malignă a celulelor argentofine (care produc serotonină) din intestin și se caracterizează prin producerea de cantități mari de serotonină.

Sindromul este considerat ca o anomalie în metabolismul triptofanului deoarece o cantitate mai mare de triptofan este metabolizat pe calea hidroxiindolului. În mod normal, numai 1% din triptofan se metabolizează la serotonină, dar în cazul sindromului carcinoid, peste 60%.

Sinteza crescută de serotonină scade mult sinteza de acid nicotinic. În consecință apar simptomele de pelagră, cu un bilanț azotat negativ.

În urină, pe lângă hidroxiindol, pot fi identificați și alți metaboliți ai serotoninei: acidul 5-OH-indolacetic (acidul 5-OH-indolacetic conjugat cu glicocolul) și N-acetil-serotonina, conjugată cu acid glucuronic.

Pentru diagnostic se cercetează în urină acidul 5-hidroxi indolacetic (3 ml urină + 3 ml reactiv Erlich → colorație albastră), care crește de la 2-8 mg/24 h, la 76-580 mg/24 h.

Melatonina, ca și serotonină, este oxidată de MAO la acidul corespunzător. Melatonina circulantă este distribuită în toate țesuturile, inclusiv creier, dar este rapid metabolizată prin hidroxilare în poziția 6, urmată de conjugarea cu sulfat (70%) și cu acid glucuronic (6%). Restul este convertită la compuși neindolici.

În mod normal, 1% din triptofan este transformat în serotonină.

Sindrom Hartnup – defect genetic de transport al acizilor monoaminomonocarboxilici. Paralel există și un defect de absorbție al acestor aminoacizi.

Principală cauză în boala Hartnup este deficitul de triptofan – aminoacid esențial necesar atât pentru sinteza de proteine cât și pentru sinteza vitaminei PP. Din acest motiv manifestările clinice sunt similare celor din pelagră (leziuni cutanate ale pielii expusă la lumina solară, ataxie cerebeloasă reversibilă și confuzie mintală de diferite grade). Fenomenele se ameliorează prin administrarea de vitamină PP. Deși este deficit de triptofan, nu apar fenomene de carență proteică, probabil datorită absorbției unor lanțuri polipeptidice care conțin triptofan.

Din triptofanul neabsorbit și supus acțiunii bacteriilor intestinale rezultă indol care se absoarbe și se elimină apoi prin urină sub formă de sulfoconjugați (indican).

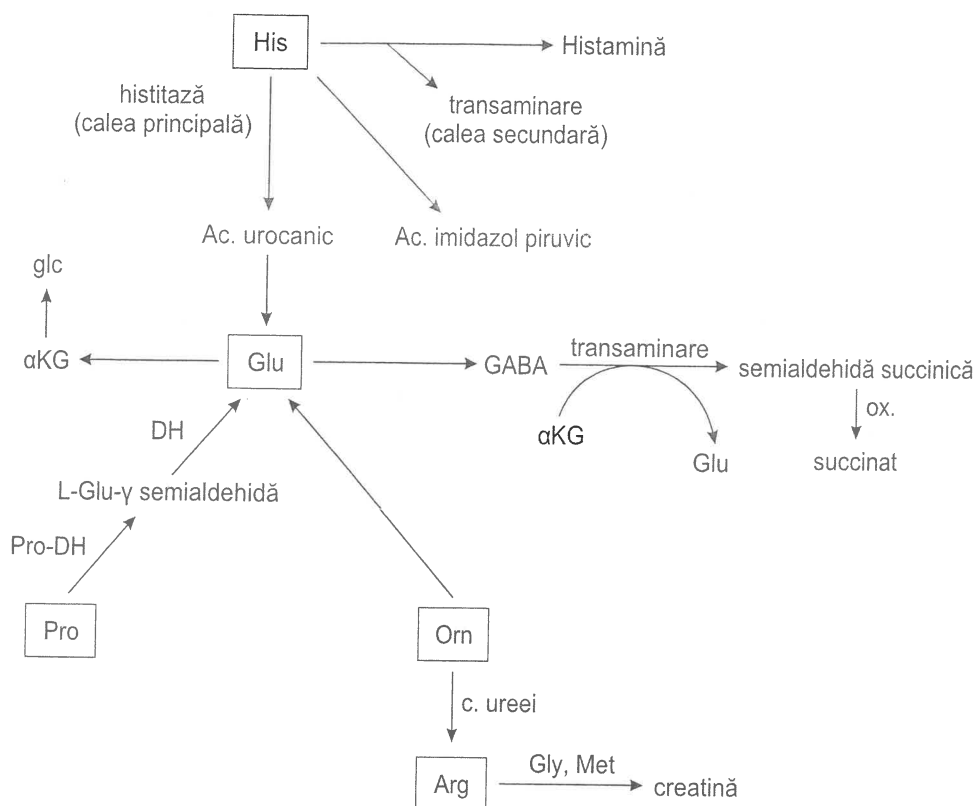
#### **5.4.3.3.7 Metabolismul histidinei, acidului glutamic, prolinei, argininei**

Schematic, interconversiunea dintre aminoacizi cât și principalele căi de metabolizare sunt schematizate în Figura 5.18.

**Histidina** participă la mai multe căi metabolice: poate fi convertită la acid urocanic sub acțiunea histidazei (calea majoră de metabolizare) sau prin transaminare, rezultă acid imidazolpiruvic. Prin decarboxilare rezultă histamină, amină biogenă cu importante roluri în organism.

Acidul urocanic este fi converit în acid glutamic.

Histidinemia este un defect genetic al histidazei, prima enzimă de pe calea principală de metabolizare, ceea ce va determina o creștere a histidinei în ser. Sunt activate căile secundare de metabolizare ale acestui aminoacid, cu apariția în urină a imidazolpiruvatului și a altor metaboliți. Incidența globală a acestei maladii este de 1:20.000, dar în Japonia incidența este de 1:8.000. Majoritatea pacienților prezintă o dezvoltare neuro-psihică normală, totuși s-au descris cazuri de retard mental și dificultăți în vorbire.



**Figura 5.18. Metabolismul histidinei, acidului glutamic, prolinei și argininei;**

transam - transaminază; glc - glucoză; α KG – α-cetoglutarat;

DH – dehidrogenază; Orn - ornitină; c. ureei – ciclul ureei

**Acidul glutamic** este un aminoacid neesențial care poate fi convertit în alți aminoacizi: prolină, ornitină, glutamină. Poate intra în ciclul Krebs prin transformare în alfacetoglutarat, sau prin decarboxilare rezultă acidul γ-aminobutiric.

De asemenea, acidul glutamic reprezintă „colectorul final” al amoniacului din aminoacizi.

**Prolina** poate fi convertită în acid glutamic sau ornitină.

#### 5.4.3.3.8 Metabolismul alaninei, acidului aspartic, asparaginei, acidului glutamic, glutaminei

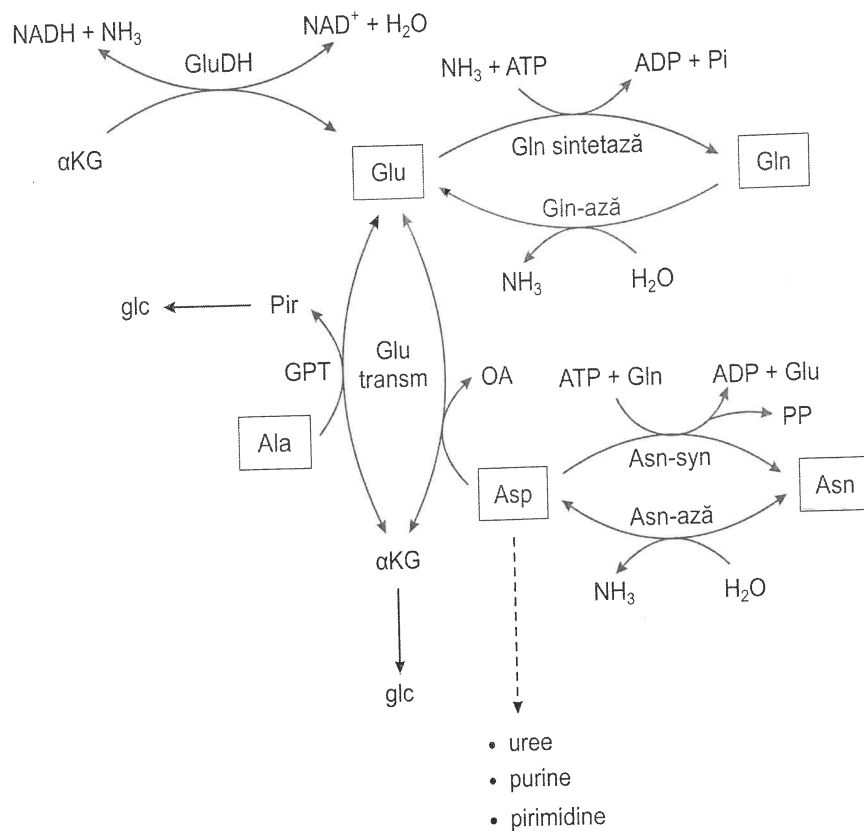
Alanina, prin transaminare, este convertită în acid piruvic. Toți cei patru atomi ai acidului aspartic cât și ai asparaginei se regăsesc în acidul oxalacetic (Figura 5.19). Analog, acidul glutamic și glutamina se transformă în acid α-cetoglutamic, prin transaminare.

Acidul glutamic reprezintă „colectorul final” al amoniacului din aminoacizi, datorită reacțiilor de transaminare cât și de dezaminare oxidativă.

Ambii aminoacizi dicarboxilici - acidul aspartic și acidului glutamic - se pot transforma în amidele lor – glutamina și asparagina. Glutamina reprezintă forma de transport a amoniacului în sânge.

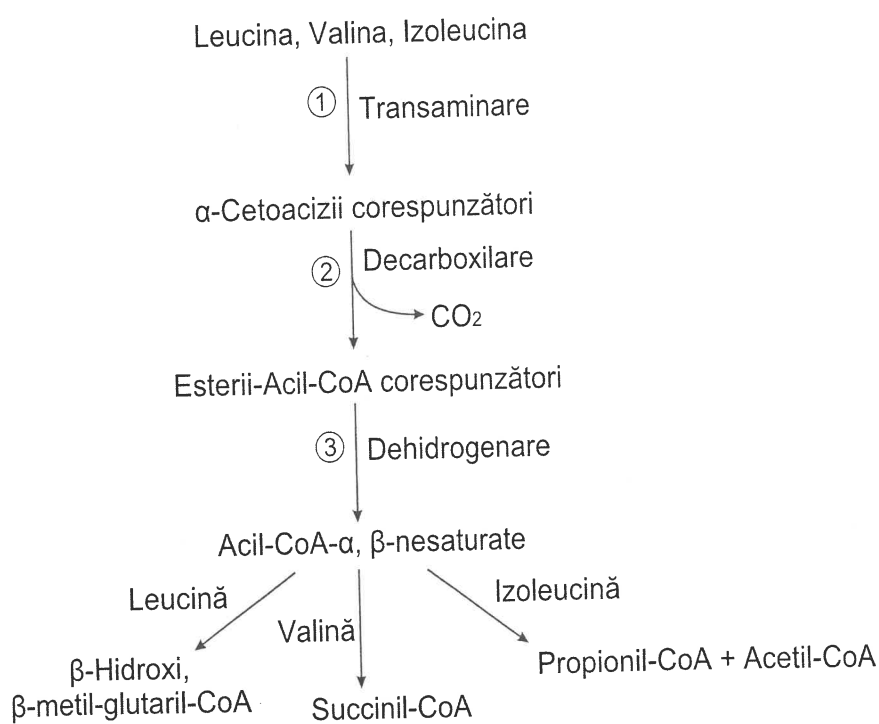
#### 5.4.3.3.9 Metabolismul aminoacizilor ramificați

Leucina, valina și izoleucina se degradează în fază inițială prin reacții comune în urma cărora rezultă resturi acil-CoA αβ-nesaturate care, mai departe, pe căi separate, vor conduce la com-



**Figura 5.19 Metabolismul alaninei, acidului aspartic, asparaginei, acidului glutamic, glutaminei;** glc – glucoză; α KG – α cetoglutarat; Glu transm – glutamic transaminaza; GluDH – glutamatdehidrogenază; Gln-ază – glutaminază; Asn-syn – asparagin sintetază; Asn-ază – asparaginază

puși diferiți (Figura 5.20). Structura acestor compuși determină clasificarea aminoacizilor din care provin în glucogenici (valina), cetogenic (leucina) și cetogenic și glucogenic (izoleucina).



**Figura 5.20 Metabolismul aminoacizilor cu catena ramificată**

Reacția 1, transaminarea, este catalizată de o singură enzimă. Întrucât reacția este reversibilă, acești aminoacizi pot fi înlocuiți în dietă de cetoacizii respectivi.

Reacția 2, decarboxilarea oxidativă a  $\alpha$ -cetoacizilor ramificați corespunzători leucinei, izoleucinei și valinei, este catalizată de un complex enzimatic mitocondrial asemănător în privința structurii și reglării cu piruvat dehidrogenaza. Complexul cuprinde o  $\alpha$ -cetoaciddecarboxilază, o transacilază și o dihidrolipoildehidrogenază.

Reacția 3 este analoagă cu dehidrogenarea acil-CoA din degradarea acizilor grași.

Trecerea valinei în succinil-CoA are loc printr-o fază intermediară de metil-malonil-CoA, necesitând drept coenzimă adenzil-cobalamină. Enzima care catalizează această izomerizare este metil-malonil-CoA-mutaza implicată și în catabolismul propionil-CoA rezultată din degradarea izoleucinei. În deficit de vitamină B12, activitatea mutazei este afectată.

### **Anomalii în metabolismul aminoacizilor cu catena ramificată**

Boala urinii cu miros de arțar (Maple Syrup Urine Disease, Branched Chain Ketonuria) se caracterizează printr-un defect genetic al complexului decarboxilazic de pe calea degradativă a acestor aminoacizi cu radical ramificat. Incidența bolii este de 1:250.000 de nou-născuți. În literatură sunt descrise mai multe variante clinice și biochimice. În tipul clasic cei trei aminoacizi (leucina, valina, izoleucina) se acumulează în sânge și se elimină prin urină, împreună cu produșii lor de degradare (ceto și hidroxiacizi), imprimând urinii un miros de sirop de arțar (asemănător mirosului de zahar caramelizat).

Mecanismul toxicității nu este suficient cunoscut. Se presupune că excesul de aminoacizi ramificați împiedică transportul intracelular al altor aminoacizi, perturbând astfel sinteza proteinelor. Copilul prezintă tulburări digestive, vomă și este letargic. Defectul este însoțit de leziuni nervoase severe și duce la deces în câteva luni.

Depistarea timpurie a deficitului prin analiză enzimatică și instituirea unei diete sărace în valină, leucină și izoleucină permite dezvoltarea normală a copilului.

A fost descrisă și o formă intermitentă a bolii, care se manifestă mai târziu, cu un prognostic mai favorabil.

Ambele forme sunt cauzate de mutații diverse în structura primară a aceleași enzime.

Hipervalinemia – caracterizată prin creșterea concentrației sanguine de valină (dar nu și de leucină și izoleucină) indică incapacitatea de a transamina valina la  $\alpha$ -cetoizovalerat (reacția 1), fără afectarea transaminării celorlalți doi aminoacizi.

Acidemia izovalerică - perturbarea activității izovaleril-CoA-dehidrogenazei (reacția 3) conduce la acumularea de izovaleril-CoA care este hidrolizat la izovalerat și eliminat prin urină și transpirație. Simptomele includ un miros caracteristic de brânză pentru respirație și fluidele organismului, vomisme, acidoză și comă, precipitată de ingestia excesivă de proteine.

Aciduria metilmalonică - datorită deficitului de metil-malonil-mutază, dar în primul an de viață apare acidoză (pH-ul sângelui arterial având valoarea 7,00) și se elimină prin urină mari cantități de metilmalonat (1 g sau chiar mai mult pe zi) față de normal (5 mg/zi).

La unii pacienți, administrarea parenterală de doze farmacologice de vitamină B12 determină o ameliorare a simptomelor, pH-ul sângelui arterial revenind la normal și scăderea

marcată a eliminărilor urinare de metilmalonat. În acest caz, este vorba de un defect de transferază care catalizează sinteza deoxicobalaminei.

Alți pacienți nu răspund la administrarea de vitamină B12, defectul fiind situat la nivelul apoenzimei metilmalonilmutazei. Această formă este frecvent letală.

### Bibliografie selectivă

1. Bhagavan N. V. - Medical Biochemistry. 4th ed. Harcourt Academic Press, 2002
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. – Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999
3. David L. Nelson and Michael M. Cox – Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed. W. H. Freeman & Co, 2004
4. Esin Eren, Hamit Yasar Ellidag, Ozgur Aydin Necat Yilmaz - Homocysteine, Paraoxonase-1 and Vascular Endothelial Dysfunction: Omnibus viis Romam Pervenitur Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2014 Sep, Vol-8(9): CE01-CE04 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>)
5. Gaw A., Murphy M.J., Cowan R.A., O'Reilly D.St.J., Stewart M.J., Shepherd J. -Clinical Biochemistry – an illustrated colour text. 3rd ed. Churchill Livingstone, 2004
6. Gilbert H.F. – Basic concepts in biochemistry; a student survival guide. 2nd ed. McGraw-Hill: Health Professions Division, 2000
7. Kaplan L.A., Pesce A.J. – Clinical Chemistry - theory, analysis, and correlation. 3rd ed. Mosby Co, 1996
8. Koolman J., Roehm K-H. – Color Atlas of Biochemistry. 2nd ed. Thieme Co, 2005
9. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell P.W. – Harper's Illustrated Biochemistry. 26th ed. McGraw-Hill: Health Professions Division, 2003
10. Romana Vulturar, Mircea Cucuianu – Aminoacidopatii - aspecte genetice, biochimice și clinice. Casa cărții de știință, Cluj Napoca, 2011.
11. Swanson T. A., Kim S.I., Glucksman M.J. – Biochemistry and Molecular Biology. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007
12. Terwecoren A, Steen E, Benoit D, Boon P, Hemelsoet D., Acta Neurol Belg. 109(3):181-8, 2009

# 6

## Proteine – structură, funcții și metabolism

Minodora Dobreanu

Proteinele sunt macromolecule cu greutate moleculară cuprinsă între zeci de mii și mai multe milioane de daltoni, alcătuite din aminoacizi. În funcție de numărul aminoacizilor constituenți, polimerii se numesc peptide (di-, tri-, tetra-, penta-, oligo- și polipeptide). După forma particulelor, proteinele pot fi fibrilare, alungite sau globulare / sferice, cu lanț(uri) peptidic(e) răsucit(e) sub formă de ghem.

### 6.1 STRUCTURA PROTEINELOR

Proteinele sunt alcătuite din aminoacizi legați covalent prin legături peptidice între grupările aminice ( $-NH_2$ ) și carboxilice ( $-COOH$ ) conținute de toți aminoacizii, dar și fizic prin legături secundare: de hidrogen, ionice, hidrofobe sau forțe van der Waals între radicalii hidrofilii sau hidrofobi ai aminoacizilor. Din mulțimea aminoacizilor posibili, în proteine se găsesc 20 de aminoacizi naturali. Gruparea amino este localizată de obicei la atomul de carbon cel mai apropiat grupării carboxilice (numit  $C\alpha$ ). Acești derivați sunt aminoacizi corespunzând formei L (levogire) a izomerilor optici.

Există patru nivele de organizare structurală a proteinelor:

*I. Structura primară* (secvență): este dată de numărul și succesiunea aminoacizilor legați covalent în lanțul proteic.

*II. Structura secundară*: se datorează orientării în spațiu a lanțului proteic sub forma unui  $\alpha$ -helix sau foi  $\beta$ -pliate, determinată de atracția electrostatică între centrele de sarcină create prin distribuția inegală a electronilor între atomii participanți la legăturile covalente peptidice situate în proximitate. Forțele fizice care determină această structură sunt legături de hidrogen realizate între atomii de oxigen și hidrogen implicați în legătura peptidică.

*III. Structura terțiară*: este asigurată de aranjamentul în spațiu al diferitelor regiuni cu structură secundară ale lanțului proteic, determinat de legăturile hidrofobe, ionice, prin forțe van der Waals sau prin legătură bisulfidică ( $-S-S-$ ), realizate între radicalii aminoacizilor componenți situați la distanță unul de celălalt.

*IV. Structura cuaternară*: definește maniera de asociere prin legături necovalente, a două sau mai multe catene proteice.

### 6.1.1 STRUCTURA PRIMARĂ

Gruparea carboxilică (C-terminală) a unui aminoacid și cea aminică (N-terminală) a unui alt aminoacid pot reacționa (cu eliminarea unei molecule de apă), formând o legătură amidică numită legătură peptidică. Prin repetarea succesivă a acestei cuplări, se formează lanțuri cu diferite compoziții și lungimi, numite peptide, conținând câte o grupare aminică liberă (la capătul N-terminal) și una carboxilică (la capătul C-terminal). Tipul și secvența aminoacizilor constituenți dintr-un lanț peptidic formează structura primară. În mod convențional, număratoarea aminoacizilor din cadrul unui peptid sau unei proteine, începe de la capătul N-terminal al moleculei. Lanțurile peptidelor, respectiv ale proteinelor, sunt de fapt structuri polimerice liniare. Deși între lanțurile individuale se pot forma variate legături secundare, lanțul peptidic însuși nu se poate ramifica.

Atomii participanți la formarea legăturii peptidice ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ) se situează în același plan și formează axa principală a lanțului peptidic. Pe laturile acestei axe se situează catenele laterale ale aminoacizilor constituenți. Prin această așezare, aminoacizii constituenți determină într-o măsură substanțială proprietățile moleculelor peptidice sau proteice. Deși legătura chimică între atomii de carbon și de azot din cadrul legăturii peptidice reprezintă un cuplaj foarte rigid, totuși prin intermediul atomilor de carbon  $\alpha$ , legătura peptidică însăși are o mobilitate mare în toate planurile, ceea ce conferă lanțului o flexibilitate considerabilă. Schema structurii lanțului peptidic este redată în Figura 6.1.

### 6.1.2 STRUCTURA SECUNDARĂ

Un rol determinant în realizarea structurilor secundare ale moleculelor proteice revine legăturilor de hidrogen realizate între atomii de oxigen și hidrogen legați covalent de atomii de carbon, respectiv de azot angajați în legătura peptidică, poziționați la distanță de-a lungul lanțului peptidic.

Proteinele prezintă structuri tridimensionale, așezarea și orientarea în spațiu a întregii molecule proteice determinând conformația proteinei, dar și caracteristicile fizico-chimice și biologice. Structura secundară se obține prin orientarea ordonată în spațiu a lanțului polipeptidic, datorată legăturilor de hidrogen realizate între atomii de hidrogen și oxigen conținuți în

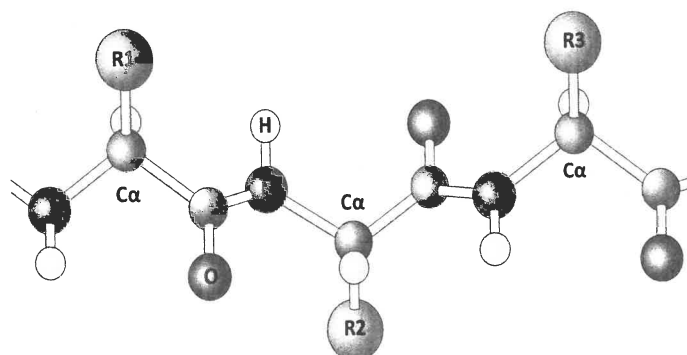


Figura 6.1 Schema structurii legăturii peptidice (atomii implicați sunt situați coplanar)

legăturile peptidice; această conformație se realizează în două forme structurale deosebite: spirala  $\alpha$  și foaia  $\beta$  pliată (schemele spiralei  $\alpha$  și foi  $\beta$  pliate sunt redată în Figurile 6.2 a, b).

**Spirala  $\alpha$**  este o structură răsucită într-o spirală strânsă, având axa interioară compactă, formată de secvența legăturilor peptidice și din care se desprind catenele laterale ale aminoacizilor constituenți. Spirala se rotește de la stânga spre dreapta, înălțimea unui segment este de 0,54 nm (5,4 Å), cuprinzând o medie de 3,6 molecule de aminoacizi pe fiecare spirală. Stabilitatea structurii spirale este determinată de formarea legăturilor de hidrogen între atomii de hidrogen și de oxigen din legăturile peptidice apropiate. În structurile proteice, lungimea acestor spirale nu depășește, de obicei, limita de 4 nm (40 Å). În schimb două sau mai multe  $\alpha$  - spirale răsucite sub formă de cablu, pot forma fibre proteice deosebit de rezistente, elastice, uneori contractile.

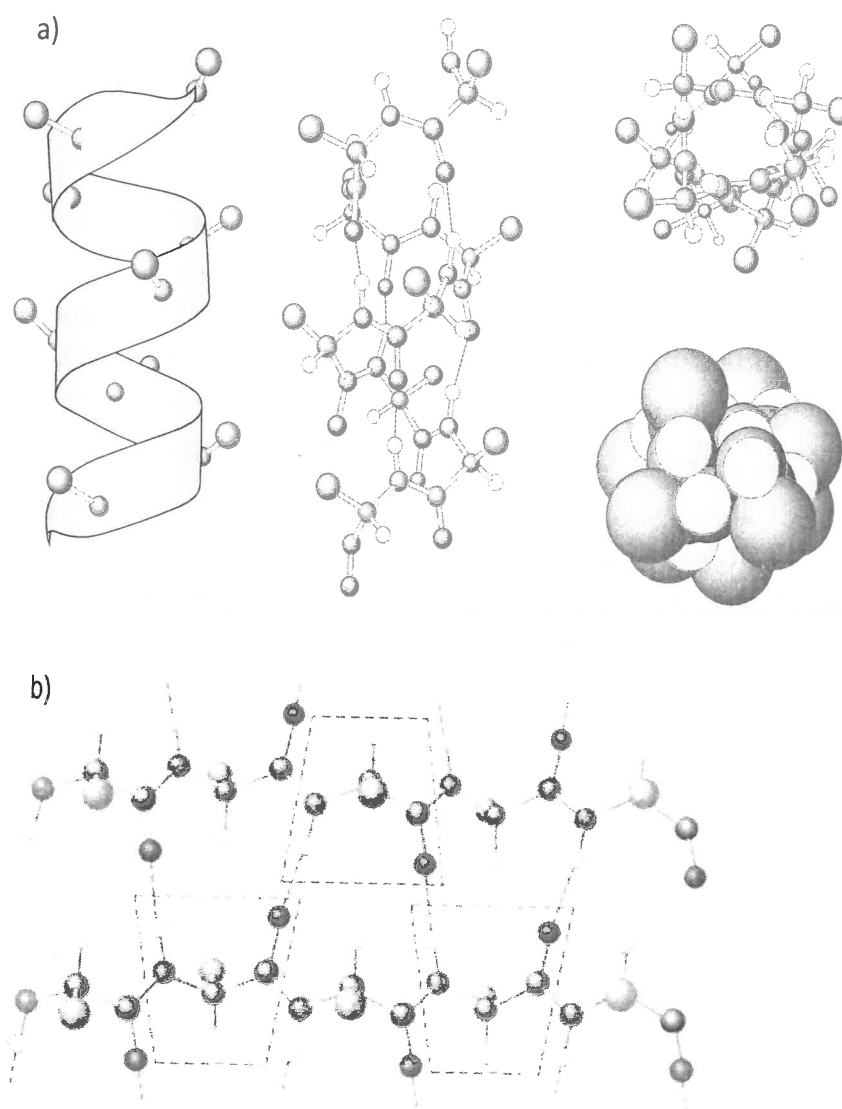


Figura 6.2 a. Modele structurale pentru spirala  $\alpha$  și  
b. Structura în foaie pliată  $\beta$  a lanțului peptidic

**Foaia pliata  $\beta$**  este o structură aproape plată, dispusă pe orizontală, în care unghiurile valențelor atomilor de carbon  $\alpha$  cu planurile legăturilor peptidice, sunt obtuze. Punțile de hidrogen care fixează poziția lanțurilor paralele sunt așezate între legăturile peptidice situate la distanțe mari de-a lungul lanțului peptidic. Sensul plierii acestor lanțuri poate fi paralel sau antiparalel. Aceste două variante pot apare izolat sau simultan în structura majorității proteinelor.

### 6.1.3 STRUCTURILE TERȚIARĂ ȘI CUATERNARĂ

Orientarea în spațiu a tuturor structurilor secundare determină structura terțiară, iar așezarea de ansamblu a peptidelor constitutive (monomeri), reprezintă structura cuaternară (doar la structurile proteice alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice). Conformația în spațiu a moleculelor proteice native se realizează prin legături secundare și uneori covalente (-S-S-), stabilite între diferitele porțiuni ale peptidului, situate la distanță de-a lungul lanțului peptidic (structura terțiară) sau prin legături secundare între lanțurile constitutive (structura cuaternară). Printre aceste legături figurează forțele slabe (van der Waals), legăturile ionice (electrostatice) și legăturile apolare. Orice acțiune fizică (reacția mediului: temperaturi extreme, ultrasunete, radiații UV etc), chimică (acizi și baze tari, săruri ale metalelor grele) sau biologică (enzime), care duce la schimbarea conformației, produce și denaturarea proteinelor (schimbarea ireversibilă a proprietăților fizico-chimice și biologice). În unele condiții speciale conformația poate fi schimbată și fără denaturare: modificările alosterice presupun oscilarea conformației între două forme extreme: relaxată (R) și tensionată (T).

## 6.2 PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE PROTEINELOR

Proprietățile fizico-chimice și biologice ale proteinelor sunt determinate de cele ale aminoacizilor constituenți. Masa moleculară a proteinelor poate fi determinată fie prin ultracentrifugare (Svedberg), fie prin filtrare în gel și poate varia între câteva zeci și mai multe mii de kDa. Proteinele pot fi separate și prin precipitare salină, cu ajutorul cromatografiei pe coloană, precum și prin electroforeză, pe baza vitezei diferite de migrare în câmp electric.

### 6.2.1 SOLUBILITATEA

Solubilitatea în apă a proteinelor este influențată de repartizarea pe suprafața moleculei proteice a radicalilor aminoacizilor apolari, încărcăți sau neîncărcăți. Solubilitatea proteinelor este minimă la pH-ul izoelectric (pHi) - pH-ul la care sarcina electrică netă este nulă. Solubilitatea proteinelor depinde nu numai de pH-ul mediului, dar și de prezența unor **electroliti** (acizi, baze slabe, săruri ale metalelor ușoare: NaCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> în soluții diluate). Proteinele fibrilare sunt insolubile în apa pură și de asemenea insolubile în soluții saline diluate, iar proteinele globulare sunt greu solubile în apă pură și solubile în soluții saline diluate (fenomen denumit "*salting in*"). La concentrații crescute de sare are loc salifierea ("*salting out*"), adică scăderea solubilității proteinei prin deshidratare. Acest procedeu este utilizat pentru separarea albuminelor de globuline, deoarece albuminele precipită doar în soluții saturate de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, iar globulinele în soluții semisaturate.

### 6.2.2 DENATURAREA

Denaturarea constă în perturbarea interacțiunilor necovalente din moleculele proteice (dezagregarea structurii secundare, terțiare, cuaternare) cu modificarea conformației native a proteinei. Denaturarea nu afectează structura primară a proteinei.

Agenții denaturanți pot fi:

- de **natură fizică**:

- temperaturi peste 50-60°C denaturează majoritatea proteinelor (cu puține excepții);
- radiațiile ultraviolete, X și gama;
- agitația mecanică.

- de **natură chimică**:

- pH-uri extreme (soluții de acizi sau baze tari) precum și soluțiile sărurilor metalelor grele, denaturează aproape toate proteinele (modifică încărcătura electrică a grupărilor de pe suprafața moleculei, astfel se desfac legăturile ion-dipol).
- ureea și guanidina produc o denaturare reversibilă prin desfacerea punților de hidrogen din proteina nativă și stabilizarea altor legături de hidrogen noi (după îndepărtarea ureei sau guanidinei, punțile inițiale se refac și de asemenea forma nativă a proteinei).
- solvenții organici, agenții tensioactivi (surfactanți) influențează interacțiunile hidrofobe din interiorul moleculei proteice.

### 6.2.3 PROPRIETĂȚI ELECTROCHIMICE

Din cauza prezenței simultane a grupărilor carboxilice - acide și a celor aminice - bazice, în moleculele lor, aminoacizii disociază electrolitic, atât în medii alcaline cât și acide. Valoarea pH-ului la care ambele grupări (aminică și carboxilică) sunt ionizate, reprezintă pH-ul izoelectric al aminoacizilor. Proteinele sunt macromolecule încărcate (amfoliți macromoleculari) cu sarcina electrică netă egală cu suma algebrică a tuturor sarcinilor de pe suprafață, influențată de pH-ul mediului în care se găsește. pH-ul izoelectric al proteinelor solubile în apă (pHi) este acea valoare a pH-ului la care sarcina globală netă a macromoleculei este nulă. În funcție de pH, proteinele pot exista sub trei forme electrice: forma cationică ( $\text{NH}_3^+$ -Proteină-COOH) la  $\text{pH} < \text{pHi}$ , amfiionică ( $\text{NH}_3^+$ -Proteină-COO<sup>-</sup>) la  $\text{pH} = \text{pHi}$  și anionică ( $\text{NH}_2$ -P-COO<sup>-</sup>) la  $\text{pH} > \text{pHi}$ . La pH fiziologic majoritatea radicalilor sunt ionizați (histidina este ionizată în proporție de ~50%). Cu cât pH-ul mediului este mai îndepărtat de pHi, sarcina proteinei este mai mare. Proprietatea de a migra în câmp electric este utilizată în separarea proteinelor prin electroforeză, realizată în mediu alcalin (vezi Capitolul 7).

### 6.3 CLASIFICAREA PROTEINELOR

Interiorul celulei are o încărcătură proteică mai bogată decât spațiul extracelular, atât din punct de vedere calitativ cât și cantitativ. Totalitatea proteinelor dintr-un spațiu biologic dat

(celulă, țesut sau compartiment biologic) este definit actualmente **Proteom**. Clasificarea proteinelor se face după diverse criterii: solubilitate, natura grupărilor prostetice, funcțiile în organism.

### 6.3.1 CLASIFICAREA DUPĂ SOLUBILITATE

Se disting proteine:

- *solubile* în apă: majoritatea sunt globulare, situate intracelular și plasmatic (albumine, globuline, histone)
- *insolubile* în apă: fibrilare, mai ales extracelular, în structurile de susținere (scleroproteine: colagenul și keratinele).

### 6.3.2 CLASIFICAREA DUPĂ NATURA GRUPĂRILOR PROSTETICE

- **holoproteinele** sunt proteine simple, fără grupări prostetice;
- **heteroproteine**, proteine complexe, cu grupări prostetice (proteine conjugate formate din apoproteină și grupare prostetică).

Din grupa heteroproteinelor fac parte:

1. *fosfoproteine*;
2. *glicoproteine*: aproape toate proteinele sunt de acest tip, mai ales cele din membrane și cavități;
3. *lipoproteine*: sunt formate din apolipoproteină și lipide legate necovalent;
4. *cromoproteine*: conțin grupare prostetică colorată în roșu (în cazul hemoproteinelor: hemoglobina, mioglobina, citocromii – transportori de electroni) sau în galben (în cazul flavoproteinelor cum ar fi cele cuplate cu vitamina B2 - riboflavină - transportor de protoni);
5. *metaloproteine* (ferritina, ceruloplasmina, anhidraza carbonică);
6. *nucleoproteine* (proteinele bazice – histone - legate de acizii nucleici prin legături saline);
7. proteinele formate prin conjugarea mai multor grupe prostetice cum ar fi *fosfoglicoproteinele*.

### 6.3.3 CLASIFICAREA DUPĂ FUNCȚII

În organismele vii, proteinele au următoarele funcții mai importante:

- Elemente structurale extra- și intracelulare, cu funcții de susținere (fibrele de colagen, respectiv de tubulină) sau de fixare, ca adevăratele (fibronectina, respectiv clatrinele). Prin elasticitate (elastina) asigură și plasticitatea micro- și macrostructurilor.

• Ca elemente contractile, joacă roluri multiple în mișcările active și pasive ale celulelor, dar și în asigurarea elasticității și plasticității acestora. Sistemul tubular proteic, localizat în citoplasmă, în apropierea suprafeței interioare a membranei celulare, are un rol fundamental nu numai în formarea și funcționarea pseudopodelor, dar și în realizarea modificărilor rapide de formă ale celulelor. Este de remarcat că, alături de proteinele contractile propriu-zise (ca

actomiozina), practic toate proteinele sunt capabile ca, prin modificări conformaționale, să-și modifice atât structura în spațiu, cât și funcțiile.

- Ca elemente vehiculante, fixează diferite substanțe pe suprafața lor, transportându-le în organism sau în celule. În organism circulația majorității substanțelor anorganice și organice nu are loc sub formă liberă, ci sub formă legată de diferite proteine (albumine, fracțiuni globulinice), aspectul având o mare importanță din punctul de vedere al uniformizării concentrației acestor constituenți în diverse compartimente lichidiene: din cauza diferențelor mari de concentrație între spațiul vascular și lichidul interstițial sau între lichidul interstițial și spațiul intracelular, schimburile componentelor dizolvați s-ar desfășura foarte rapid, ceea ce ar fi deosebit de dezavantajos din punct de vedere metabolic: pe de o parte cantitățile lor ar oscila între valorile maxime și zero, iar pe de altă parte celulele nu ar fi în stare să prelucreze cantitățile excesive de nutrienți cu un randament corespunzător. În schimb, substanțele fixate de proteine, se pot deplasa dintr-un compartiment (plasmă, lichid tisular) în altul (lichidul interstițial, citoplasmă) numai dacă în aceasta se găsește, în cantitate suficientă, un alt vehicul (receptor) care dispune de suprafețe de transport disponibile pentru preluarea substanței sau substanțelor vehiculate de transportor. Schimburile de substanțe de acest gen, se desfășoară cu viteze substanțial mai mici, decât cele prin difuziune simplă. În urma saturației capacității de fixare a transportorului, rămâne și substanță liberă, producând uneori daune considerabile organismului, ca în cazul icterului patologic al nou născutului - bilirubina formată în exces, saturează capacitatea de transport a albuminelor plasmatiche. Componenta liberă se depune în țesutul conjunctiv și în nucleii de la baza creierului, ducând la manifestarea icterului nuclear.

- Ca enzime (biocatalizatorii), participă la toate fazele metabolismului celular, de la cataliza reacțiilor celor mai simple (ca formarea și descompunerea acidului carbonic, sub acțiunea carboanhidrazei), până la biosinteza materialului genetic (ADN). Biocataliza reprezintă una dintre cele mai importante funcții biologice ale proteinelor.

- Ca imunoglobuline (anticorpi), fac parte din sistemul de apărare umorală specifică a organismului. Prin intermediul porțiunilor lor structurale complementare și specifice (Fab - paratopii), anticorpii pot fixa în mod specific structurile corespunzătoare (epitopii) ale altor proteine proprii sau străine. Ca urmare, proteinele fac parte din grupa mare a structurilor receptoare din organism.

- Ca purtătoare de semnale, cuprind în structurile lor mesaje pe care le transmit celulelor în cadrul comunicărilor inter- și intracelulare (mesageri primari, mediatori, hormoni) sau le propagă spre enzimele / structurile țintă, în interiorul celulelor (mesageri secundari).

- Ca structuri receptoare de semnale, pot fixa în mod specific moleculele mesagerilor primari (mediatori, hormoni). În același timp, propagă spre interiorul celulei mesajul recepționat, prin declanșarea formării / eliberării mesagerilor secundari (cAMP, cGMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , inozitoltrifosfat- $\text{IP}_3$ , diacil glicerol-DAG, monoxid de azot-NO).

- Ca structuri determinante individuale (markeri), sub forma unor molecule glicoproteice specifice localizate pe partea externă a membranelor celulelor (antigenele de histocompatibilitate, HLA, MHC), exprimă identitatea tuturor structurilor proprii celulare ale unui individ.

## 6.4 PROTEINELE PLASMATICE

O proteină este considerată ca aparținând plasmei dacă are concentrație mai mare în spațiul plasmatic decât extravascular și dacă își desfășoară principala funcție în plasmă. Plasma sanguină conține câteva sute de specii proteice, în concentrație totală de 60-80 g/l, ceea ce corespunde unei cantități de 150-250 g proteine circulante. Câteva sute de specii proteice plasmatică au fost izolate și caracterizate structural și funcțional, fiind extrem de heterogene și cu concentrații individuale variind pe o plajă de 6 puteri ale lui zece (de ex. albumina: 40 g/L, IgE 40 μg/L). Greutatea lor moleculară variază de la câteva zeci de mii (alfa 1 globulinele) la mai multe sute de mii de daltoni (macroglobulinele).

Cu câteva excepții, marea majoritate a proteinelor sunt sintetizate în hepatocite. Din cauza scăderii biosintezei, pierderii sau degradării excesive a proteinelor plasmatică, apar hipoproteinemiile, în schimb, creșterea sintezei produce hiperproteinemie. Capacitatea maximă de transport a celulelor tubulare renale pentru proteinele filtrate glomerular, este limitată; la valori ale proteinemiei de peste 100 g/l, din cantitatea filtrată a proteinelor cu greutate moleculară mică se reabsorbe numai o parte, restul eliminându-se prin urină (proteinurie prerenală).

Pentru determinarea / fracționarea proteinelor din plasmă se utilizează mai multe metode: precipitarea salină a albuminelor și globulinelor, ultracentrifugarea, electroforeza liberă și în zonă, cromatografia pe coloană, tehnicile imunologice etc.

### 6.4.1 FUNCȚIILE BIOLOGICE ALE PROTEINELOR PLASMATICE

- Cantitatea circulantă a proteinelor reprezintă o importantă rezervă proteică / aminoacidică pentru organism.
- Prin concentrația mai mare în plasmă decât în lichidul interstițial, proteinele asigură presiunea coloid-osmotică plasmatică, responsabilă de desfășurarea normală a schimburilor de apă și de substanțe dizolvate între plasmă și țesuturi.
- Alături de elementele circulante celulare, prin forma reologică optimă a moleculelor lor (globuloasă), proteinele plasmatică asigură o vâscozitate minimă posibilă a sângelui.
- Pe suprafața lor moleculară fixează o serie de substanțe micromoleculare organice și anorganice, pentru care îndeplinesc funcția de vehicul nespecific și/sau specific în sânge.
- Proteine / enzime cu importante roluri biologice chiar în circulația sanguină (enzime proprii ale plasmei), sunt LPL, LCAT, factorii de coagulare, inclusiv factorii sistemului properdinic și de complement. O parte a enzimelor din celulele unor organe și țesuturi ajung (în condiții fiziologice) în plasmă numai în cantități minime. Astfel, creșterea activității lor plasmatică reprezintă un bun indicator al afectării / lizei țesuturilor și organelor de origine (LDH, GOT, GPT etc). O formă deosebită a proteinelor plasmatică biologic active o constituie antiproteazele cu acțiune anticoagulantă, dar și antiinflamatoare.
- O cantitate însemnată (10-15 g/L) din totalul proteinelor plasmei o reprezintă imunoglobulinele, cu funcții importante în apărarea umorală specifică a organismului.
- Ca molecule amfoterice, proteinele au o oarecare capacitate de tamponare (5-10%

din capacitatea de tamponare sanguină): deși într-o mai mică măsură, contribuie totuși la echilibrul acido-bazic.

## 6.4.2 METABOLISMUL PROTEINELOR PLASMATICE

Concentrația proteinelor plasmatică este un parametru dinamic, determinat de trei factori principali: rata de sinteză, rata de eliminare (prin catabolism sau pierderi externe) și volumul de distribuție între spațiul intravascular și extravascular (inclusiv pierderile în lichidele de ascită și exudate).

### 6.4.2.1 Sinteza

Fiecare celulă își sintetizează propriile proteine (enzime, receptori, MHC, transportori etc). Cele mai multe proteine plasmatică sunt sintetizate în **hepatocite** (albumina, factori de coagulare, unele apoproteine, globuline), dar există și proteine plasmatică sintetizate în **limfocite** (limfocitele B transformate secretor secretă imunoglobuline), **celule endoteliale** (factori de coagulare și fibrinoliză, molecule de adeziune celulară), **enterocite** (apoproteine), **macrofage** (citokine, factori de complement și inhibitori de proteaze), **adipocite** (secretă factorul properdinic D - esențial în activarea sistemului complementului pe calea alternativă). Zilnic se sintetizează și se degradează aproximativ 25 g de proteine plasmatică. Nu există depozite intracelulare de proteine, cu excepția celulelor glandulare producătoare de hormoni de natură proteică.

Mecanismul general de sinteză al proteinelor este comun tuturor celulelor și implică interacțiuni multiple între ADN genomic și ARN mesager, migrarea ARN mesager în citoplasmă unde, la nivelul ribozomilor, are loc translația informației din ARNm - sinteza proteinelor. În timp ce proteinele intracelulare sunt sintetizate și de ribozomi citoplasmatici / liberi, proteinele plasmatică (dar și acelea lizozomale și membranare) sunt sintetizate în poliribozomi legați în/de membranele reticulului endoplasmic rugos, în interiorul căruia sunt apoi stocate temporar. Pentru a deveni funcționale proteinele necesită apoi modificări post-translaționale în membranele reticulului endoplasmic sau ale aparatului Golgi, constând în carboxilări, glicozilări, lipidări, formarea legăturilor disulfidice, plierea lanțului, formarea legăturilor secundare, terțiare, cuaternare. Ulterior trec în aparatul Golgi în care se formează granule secretorii. Cele mai multe glicozilări se fac la reziduurile de asparagină (carbohidrați N-legați), excepții fiind alfa-1-glicoproteina acidă și C1 INH, la care resturile glucidice se leagă la resturi de serină sau treonină (carbohidrați O-legați). Sinteza propriu-zisă a lanțului polipeptidic nu durează mai mult de 1-2 minute, fenomenele de procesare post-translațională prelungesc însă, cu 20-40 minute, secreția proteinelor. După modificările post-translaționale, proteinele sunt transportate prin vezicule secretorii, care se desprind din membranele aparatului Golgi și se contopesc/ fuzionează cu membrana celulară, proteinele fiind exocitate în spațiul extracelular. Dacă proteinele nu corespund calitativ, vor fi degradate în citosol.

**Reglarea sintezei** depinde de:

- existența și calitatea materiei prime (în primul rând a aminoacizilor), statusul nutrițional fiind vital;

- factori genetici (deficite, polimorfism genic)
- inducerea / represia genică sub acțiunea unor hormoni (corticosteroizii, androgenii, tiroxina – au efect stimulator, iar estrogenii – inhibitor asupra sintezei albuminei și a altor transportori specifici);
- existența unor factori toxici (de exemplu alcoolul: inhibă sinteza proteinelor la nivel hepatic);
- scăderea presiunii coloid-osmotice plasmatice este un stimul important pentru accelerarea sintezei proteinelor și lipoproteinelor în ficat;
- produșii de degradare ai fibrinogenului și protrombinei stimulează sinteza respectivelor proteine în ficat.
- Citokinele: IL-1 și IL-6 sunt factori de stimulare hepatică a sintezei reactanților de fază acută (prin inducerea transcripției genice a unor proteine plasmatice, ca proteina C reactivă, haptoglobina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteina acidă etc), TNF- $\alpha$  are efect citotoxic asupra celulelor tumorale, IFN- $\gamma$  are efecte antivirale. Sinteza citokinelor are loc ca răspuns la stimuli extracelulari, sunt reglate de corticoizi și se degradează rapid după dispariția semnalelor care le-au determinat sinteza.

#### 6.4.2.2 Distribuția

Aproximativ 250 g proteine (70 g/l) se găsesc în compartimentul vascular. Lichidul interstițial/ extravascular conține în jur de 350 g proteine. Concentrația în proteine a plasmei sau a lichidului interstițial depinde de mișcarea liberă a apei din spațiul vascular în interstițiu și invers, dar și a unor proteine care trec permanent prin spațiile intercelulare sau traversează celule endoteliale prin vezicule de pinocitoză. Produsul acestei “cerneri moleculare” se numește transudat: conține < 30 g/L proteine.

Un aspect particular îl reprezintă trecerea proteinelor prin filtrul glomerular și prin bariera hemato-encefalică (BHE).

În funcție de dimensiunea și sarcina de suprafață, proteinele pot ajunge în cantitate limitată (< 0,15 g/24h) și în urină. În urina persoanelor sănătoase pot fi prezente: albumina,  $\alpha$ -1-microglobulina, IgG,  $\alpha$ -1-glicoproteina acidă,  $\alpha$ -1-antitripsina, transferina, RBP,  $\beta$ -2-microglobulina, lizozim, cistatină C. Factorii care influențează proprietățile electrostatice și/sau structurale ale membranei bazale glomerulare (afecțiuni inflamatorii renale, de exemplu) pot crește eliminarea zilnică de proteine prin urină. **Proteinuria** poate fi de asemenea de origine pre- sau postrenală (vezi și 7.1.5 și 9.4.4), frecvența relativă a tipurilor de proteinurie fiind:

**Renală > Post renală > Prerenală.**

**Proteinorahia** – conținutul total de proteine în LCR, este considerabil mai mic decât al plasmei (aproximativ 0,5% din acesta – maximum 0,4 g/l). Compoziția relativă în proteine a LCR este aproximativ similară cu cea serică, cu excepția faptului că prealbumina este mai bine exprimată, în timp ce imunoglobulinele se găsesc în proporție mai mică. Peste 80% din proteinele prezente în mod normal în LCR, provin din plasmă (prin transport pasiv), restul fiind produse local, în sistemul nervos central.

Există numeroși indici pentru aprecierea transferului fiziologic / patologic prin BHE a proteinelor, respectiv pentru sinteza locală de imunoglobuline în diverse patologii (vezi și 8.4).

### 6.4.2.3 Catabolismul / Eliminarea

Majoritatea proteinelor sunt degradate de propriile celule conform unui turn-over propriu sau imediat după sinteză, datorită unor imperfecțiuni structurale. Aminoacizii sunt eliberați în lizozomi (proteoliză), trec în fondul comun citoplasmatic, unde o parte sunt utilizați pentru resinteză proteică, iar alții sunt degradați chimic (prin dezaminare, decarboxilare). Localizări importante din punctul de vedere al ratei de catabolizare sunt: tractul gastrointestinal (proteinele alimentare sunt degradate sub acțiunea proteazelor), ficatul și tubii contorți proximali renali.

Traversând filtrul glomerular, proteinele cu moleculă mică (de ex. lanțuri ușoare libere,  $\beta 2$  microglobulina) ajung în urina primară, de unde în mod normal sunt reabsorbite și dezintegrate de către celulele tubulare renale. În cazul creșterii concentrației plasmatice a acestor proteine, procesul de reabsorbție renală poate fi depășit (proteinurie prerenală – vezi 9.4.4). Rata de degradare a proteinelor plasmatice este descrisă de timpul de înjumătățire (Tabel 6.I), acest parametru având importanță specială în analiza markerilor tumorali (vezi 23.1).

### 6.4.3 CARACTERISTICILE PRINCIPALELOR PROTEINE PLASMATICE

Proteinele plasmatice sunt mai des studiate în scop diagnostic, comparativ cu alte proteine din organism. Marea majoritate sunt glicoproteine (cu un conținut variabil de carbohidrați: 10-25%), cu excepția albuminelor, amilazei- $\alpha$ , proteinei C reactive (PCR),  $\beta 2$  microglobulinei (și a altor câteva mai puțin analizate), care sunt alcătuite exclusiv din aminoacizi. Tabelul 6.II conține clasificarea principalelor proteine plasmatice, după funcția și caracteristicile fizice ale acestora.

**Tabelul 6.I. Timpul de înjumătățire al unor proteine plasmatice**

Proteina	$t_{1/2}$	Proteina	$t_{1/2}$
Albumina	19-21 zile	Ig M	5 - 7 zile
$\alpha 1$ -antitripsina	4 zile	Ig D	3 zile
Complement C3	0,5 – 1 zi	Ig E	2 zile
Complement C4	0,5 – 1 zi	Receptorul solubil al transferinei	10 zile
Ceruloplasmina	4 – 10 zile	$\alpha 2$ - Macroglobulina	4 - 7 zile
PCR	12 – 24 ore	$\beta 2$ - microglobulina	40 minute
Feritina	10 minute	Mioglobina	15 minute
$\alpha 1$ - fetoproteina	4 zile	Prealbumina	1 – 2 zile
Fibrinogen	3 zile	Procalcitonina	24 – 30 ore
Haptoglobina	2 – 4 zile	$\alpha 1$ - glicoproteina acidă	5 - 6 zile
Ig A	6- 8 zile	Transferina	7 – 10 zile
Ig G	17 - 35 zile	Factorul VII al coagulării	5 ore

**Tabelul 6.II Clasificarea proteinelor plasmatice după caracteristicile fizico-chimice ale acestora**

Funcții	Denumire	Migrarea EF	GM (kDa)	Concentrația
<b>I. Transportori</b>	<b>Nespecifici</b>			
	Albumina	Albumină	68	35-45 g/L
	<b>Specifici</b>			
	Prealbumina	Prealbumină	55	0,2-0,3 g/L
	RBP (retinol binding protein)	$\alpha$ 1-globulină	21	2 – 6 mg/dL
	Transcortina	$\alpha$ 1-globulină	56	4-8 mg/dL
	Transferina	$\beta$ -globulină	77-88	2-4 g/L
	Transcobalamina	$\alpha$ 1-globulină		0,1 – 0,5 mg/dL
	Haptoglobina	$\alpha$ 2-globulină	85	2,5 – 4,5 g/L
	TBG (tiroxin binding globulin)	$\alpha$ 1-globulină	61	1 – 3 mg/dL
	ApoA	$\alpha$ 1-globuline	20-40	1,2 – 2,5 g/L
	ApoB	$\alpha$ 2-globuline	514	0,8 -1,5 g/L
<b>II. Apărare</b>	<b>Specifică</b>			
	Ig G	$\gamma$ 1,2,3-globuline	130	6-16 g/L
	Ig A	$\gamma$ 1,2-globuline	140 - 420	0,7-4 g/L
	Ig M	$\gamma$ 1-globuline	900	0,4-2 g/L
	<b>Nespecifică</b>			
	Factorii coagulării	$\alpha$ , $\beta$ -globuline	variabilă	4-5 g/L
	PCR (proteina C reactivă)	$\gamma$ -globulină	140	0,3 mg/dL
	C3	$\beta$ -globulină	180	0,8-1,2 g/L
	Inhibitori de Proteaze cu serina în centrul activ (SERPIN-ice)			
	$\alpha$ 1-antitripsina	$\alpha$ 1-globulină	54	2-3,8 g/L
	$\alpha$ 1-antichimotripsina	$\alpha$ 1-globulină	68	0,35-0,55 g/L
	$\alpha$ 2-antiplasmina	$\alpha$ 2-globulină	70	4-8 mg/dL
	Antitrombina III	$\alpha$ 2-globulină	65	0,2-0,4 g/L
	PC Inh	$\alpha$ 2-globulină	57	0,3-0,6 mg/dL
	C1 Inh	$\alpha$ 1-globulină	104	0,2-0,3 g/L
	PAI (Inhibitorul activatorului plasminogenului)		50	1-3 $\mu$ g/dL
	Inhibitori de Proteaze ne-SER- PIN-ice			
	$\alpha$ 2-macroglobulina	$\alpha$ 2-globulină	820	2,5-4 g/L
<b>III. Hormoni proteici și enzime plasmatice</b>	Insulina			
	Renina			
	$\alpha$ -Amilaza			
	Lecitin-colesterol-acil-transferaza (LCAT)			
	Lipoproteinlipaza (LPL)			
	Colinesteraza (CHE)			
<b>IV. Funcție controversată</b>	$\alpha$ 1-glicoproteina acidă	$\alpha$ 1-globuline	44	0,6-1 g/L
	Ceruloplasmina	$\alpha$ 2-globulină	132	0,3-0,4 g/L
	$\beta$ 2-microglobulina	$\beta$ 2-globuline	11,8	0,2 mg/dL

## 6.4.4 PROTEINE TRANSPORTOARE

### 6.4.4.1 Albuminele

Plasma umană conține 35-45 g/L (0,5-0,8 mmol/L) albumine. Moleculele de albumină au forma globulară și sunt alcătuite dintr-un singur lanț peptidic pliat de mai multe ori, conținând 580 aminoacizi. În poziția N-terminală se găsește acid aspartic, în cea C-terminală-leucina. În structura peptidică se repetă secvențe hidrofile și hidrofobe la nivelul cărora se pot fixa ioni ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), acizi grași, coloranți, bilirubină, medicamente, hormoni etc. Albuminele au o importantă funcție de transportor plasmatic nespecific. În contrast cu celelalte metale vehiculate în plasmă de proteine transportoare specifice, zincul plasmatic este fixat lax de albumine și de unii aminoacizi (histidina, cisteina), iar mult mai puternic de moleculele  $\alpha_2$ -macroglobulinei, ale lactat-dehidrogenazei și fosfatazei alcaline.

O moleculă de albumină conține 10 locusuri de legare pentru substanțele transportate, din care în mod normal sunt ocupate, în medie, doar 7. În condiții fiziologice la concentrația normală a AGL în plasmă, această capacitate de fixare a albuminelor este folosită numai într-o proporție de 8-10%. În urma unei lipolize excesive (de ex. în cursul unei inflamații grave), cantitatea AGL în plasmă poate fi atât de crescută, încât saturează întreaga capacitate de fixare a unor molecule de albumine bogate în triptofan, care fixează și tironinele. Încărcarea electronegativă puternică a AGL, va duce și la creșterea electronegativității moleculelor fixatoare, ducând la creșterea mobilității lor electroforetice și la apariția fracțiunii prealbuminice în proteinogramă. Capacitatea de fixare a albuminelor este competitivă și saturabilă. Astfel, în caz de icter neonatal, bilirubina fixată anterior poate fi eliberată de pe suprafața albuminelor de către unele antibiotice administrate în scop terapeutic la nou-născut, fixându-se cu o afinitate mai mare pe aceleași locusuri. Albuminele din plasmă se formează exclusiv în hepatocite și nu conțin glucide legate covalent. Sinteza hepatică de albumină este de aproximativ 20 g/zi, dar poate fi triplată la nevoie. Catabolizarea are loc în toate țesuturile, mai ales în țesutul hepatic, renal sau în tractul gastro-intestinal. Timpul lor de înjumătățire plasmatică este de 15-25 de zile.

#### Reglarea sintezei:

- *scăderea presiunii oncotice* a plasmei este stimul pentru accelerarea sintezei hepatice.
- *hormonii tiroidieni* și glucocorticoizi stimulează metabolismul albuminei plasmatic.

#### Patologie:

- *hiperalbuminemia* este o entitate patologică rară, se datorează cel mai frecvent deshidratării.
- *analbuminemia* este o boală genetică foarte rară, transmisă autosomal recesiv. Clinic se manifestă doar la homozigoți prin edeme maleolare, hipotensiune, steatoree.
- *hipoalbuminemia* este o scădere a concentrației plasmatică a albuminei sub 30 g/l (sub valoarea de 15 g/l prognosticul este rezervat). Scăderea poate fi datorită scăderii sintezei hepatice, sau poate fi consecința unor pierderi mai importante la nivel renal sau intestinal.

Cauzele hipoalbuminemiei pot fi grupate în trei categorii:

1. *fiziologic*: apare în timpul sarcinii și în clinostatism prelungit (datorită creșterii volumului de distribuție). Cantități mici de albumină străbat filtrul glomerular chiar în lipsa unei patologii renale (mai puțin decât ar fi de așteptat cunoscând diametrul moleculei albuminei - 7 nm, similar cu al porilor filtrului glomerular - datorită încărcăturii electrice negative atât a albuminei, cât și a endoteliului glomerular). Proteinuria fiziologică nu depășește însă 100-150 mg/zi. Albuminuria fiziologică nu depășește în mod obișnuit 10-20 mg/zi.
2. *artefactual*: prin diluție;
3. *patologic*:
  - a. *digestiv*: scăderea cantității de aminoacizi disponibili duce la scăderea sintezei albuminei în malnutriție, malabsorbție, enteropatie exudativă.
  - b. *hepatic*: în afecțiunile hepatice cu distrugerea parenchimului, hipoalbuminemia apare relativ târziu (când mai mult de 70-80% din țesutul hepatic este lipsit de funcție), deoarece parenchimul sănătos are o mare capacitate de amplificare a sintezei.
  - c. *renal*: afecțiunile renale (glomerulare, tubulare) duc la pierderi de proteine prin urină. Proteinuriile pot fi selective (se pierd doar albumine și o parte din globulinele de dimensiune mică) sau neselective. În sindroamele nefrotice pierderea de proteine urinare depășește 3 g / 24 ore. Hipoalbuminemia de cauză renală sau intestinală se instalează doar când pierderile de albumină depășesc capacitatea de sinteză hepatică compensatorie.
  - d. *prin creșterea permeabilității vasculare*: fenomenul are caracter acut și este datorat cel mai adesea activării sistemului complementului, a sistemului fibrinolitic, activării plachetare sau hipoxiei endoteliale. Are ca și principală consecință trecerea proteinelor din spațiul vascular în interstițiu, cele mai elocvente exemple fiind exudatele din șocul septic sau arsurile tegumentare extinse.
  - e. *prin hipercatabolism endogen*: la pacienții cu diverse patologii maligne în stadii terminale, apare o combinație de status hipercatabolic cu reacție de fază acută; celulele maligne preiau albumina ca și sursă de aminoacizi.

Examinări de laborator:

- VSH (viteza de sedimentare a hematiilor) crește;
- teste pozitive de *disproteinemie* (scade raportul albumine/globuline);
- scade concentrația de albumine;
- crește timpul de înjumătățire al albuminei plasmatică până la 50 zile;
- concentrația globulinelor crește;
- pe proteinogramă se modifică raportul între fracțiuni.

**Clinic** se constată edeme periferice (la concentrații de albumină sub 20 g/l), evitabile prin creșterea concentrației globulinelor. Hipoalbuminemii mai mult sau mai puțin accentuate

apar, aproape fără excepție, în toate stările patologice cunoscute, din cauza consumului sporit (secreție, excreție) sau a formării insuficiente (hepatopatii).

#### 6.4.4.2 Transferina

Din cantitatea totală a fierului din organism (3-5 g), plasma conține 15-25  $\mu\text{mol/L}$  (100-130  $\mu\text{g/dL}$ ), sub formă legată de o glicoproteină numită transferină sau siderofilină. Sintetizată în hepatocite, dar în cantități reduse și în splină, în ganglionii limfatici și în celulele epiteliale ale mucoasei intestinale, transferina are rolul de a transporta fierul absorbit din intestin și de la locul de degradare al hemoglobinei spre locurile de depozitare și sinteză a hemoglobinei. Conținutul normal în transferină al plasmei este de 60  $\mu\text{mol/L}$  (2-4 g/L). Transferina este o glicoproteină cu mobilitatea electroforetică a  $\beta 1$ -globulinelor, formată dintr-un singur lanț peptidic cu masa moleculară de 80 kDa, cu mai multe forme alotipice. Fiecare moleculă de transferină are două subunități glucidice fixatoare de fier trivalent ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Glicoproteina conținând un ion de fier este semisaturată, iar cu 2 ioni de fier este total saturată. În condiții fiziologice, doar 30% din locusurile de legare de pe transferină sunt saturate. Coeficientul de saturație se calculează din raportul sideremiei și a capacității totale de fixare a fierului. Celulele consumatoare (eritroblaști, hepatocite, macrofage) preiau fierul transportat de transferină în urma fixării acesteia pe structurile receptoare specifice. Internalizarea  $\text{Fe}^{3+}$  legat de transferină se face prin intermediul receptorului membranar pentru transferină. În veziculele de endocitoză, pH-ul scăzut la 5,5 (realizat cu ajutorul unei pompe de  $\text{H}^+$ , ATP-dependente) favorizează eliberarea fierului și reducerea acestuia. Transferina și receptorul său se întorc pe suprafața celulei reluând ciclul de endocitoză. Transferina este și un factor de creștere pentru celule. Receptorul celular al transferinei (CD71) este o proteină de activare localizată pe suprafața celulelor care, pentru a prolifera, au nevoie de fier. Cantitatea de receptori pe suprafața celulelor, dar și componenta solubilă eliberată în plasmă (sTfR), este proporțională cu deficitul de fier al celulei purtătoare (excepție: în sarcină, afecțiuni maligne, procesele inflamatorii cronice – probabil IL-1 eliberată inhibă sinteza receptorilor de transferină). Cea mai mare încărcătură de receptori pentru transferină (80% din total) se găsește pe suprafața seriei eritroide de maturare medulară – eritroblastul policromatofil conține cea mai mare concentrație. Creșterea concentrației serice a sTfR apare în toate patologiiile însoțite de intensificarea eritropoezei (crește necesarul de fier medular).

În cursul inflamațiilor, macrofagele activate înglobează cantități însemnate de fier plasmatic, împreună cu transferina. Această formă a hiposideremiei (deficit funcțional al fierului) poate fi totuși ușor deosebită de hiposideremia cauzată de o carență reală de fier. În cursul inflamațiilor cantitatea fierului seric scade paralel cu cantitatea transferinei, pe când în anemiile feriprive concomitent cu scăderea sideremiei apare o creștere marcată a cantității transferinei și mai ales a sTfR. În infecțiile cronice însoțite de o carență reală de fier, dozarea concomitentă a feritinei clarifică starea depozitelor de fier.

#### 6.4.4.3 Feritina

Este cunoscută ca metaloproteină de depozit a fierului în organism (fiecare moleculă poate stoca până la 4.500 ioni  $\text{Fe}^{3+}$ ). Proteina (apoferitina) este alcătuită din 24 subunități bazice

(forma -L) sau acide (forma -H), cu greutatea moleculară de 450 kDa. Izoferitinele acide se găsesc în miocard, iar cele bazice - în țesuturile axate pe stocarea fierului (hepatic, splenic, sideroblastii medulari); rinichiul conține izoferitină cu ambele tipuri de subunități. Prin supraîncărcarea cu fier a feritinei, aceasta se transformă în hemosiderină (proteină denaturată în mare parte – datorită încărcăturii ferice deosebite, concentrată în special în sideroblasti). Sinteza feritinei în celule depinde de conținutul în fier al acestora: creșterea concentrației în fier favorizează sinteza feritinei și inhibă sinteza receptorului transferinei.

Izoferitina serică este de tip bazic (spre deosebire de cea celulară, este însă glicozilată și fără fier), concentrația acesteia fiind proporțională cu conținutul în fier al celulelor care îl înmagazinează (este marker-ul acceptat pentru aprecierea fierului depozitat): 1  $\mu\text{g/L}$  feritină serică corespunde la 8 mg fier în țesuturile de depozit. Pragul inferior al concentrației serice a feritinei la femei este de 12  $\mu\text{g/L}$  (la bărbații din grupa de vârstă 20-50 ani, valoarea fiind aproximativ triplă). Feritina serică este preluată de ficat (timpul de înjumătățire este de cca. 10 minute). Spre deosebire de sideremie, concentrația serică a feritinei nu are ritm circadian, iar spre deosebire de concentrația transferinei, cea a feritinei nu depinde de sinteza hepatică și nici de prezența estrogenilor. Feritina este și marker tumoral, precum și proteină de fază acută.

#### 6.4.4.4 Hepcidina

Hepcidina este un hormon peptidic, sintetizat în ficat, având rolul de reglator al metabolismului fierului. Este produsă inițial sub formă de preprohormon (84 Aa), apoi se transformă în prohormon (60 Aa) și în final, sub acțiunea furinei, rezultă hormonul funcțional (25 Aa). Rolul reglator asupra eliberării fierului din depozite în circulație se realizează prin blocarea transportorului membranal de fier (Ferroportina), responsabil pentru exportul fierului la nivelul enterocitului, macrofagului și hepatocitului.

Deoarece organismul uman nu posedă un mecanism fiziologic de eliminare a excesului de fier, absorbția acestuia este foarte bine controlată, elementul cheie fiind hepcidina cu rol reglator negativ asupra fierului plasmatic, având ca efect scăderea eliberării de fier din enterocit și din celulele sistemului reticulo-endotelial. Sinteza de hepcidină este stimulată de inflamație, sau atunci când depozitele de fier ale organismului sunt saturate. În inflamații nivelul seric al hepcidinei crește, fierul rămâne captiv în macrofagele din diverse depozite, iar sideremia scade. Sinteza și secreția hepatică a hepcidinei este reglată de depozitele de fier din macrofage, inflamație, hipoxie și eritropoeză. Hipoxia ca și creșterea necesarului de fier pentru eritropoeză, inhibă sinteza hepatică a hepcidinei. Afectarea mecanismului reglator al hepcidinei – respectiv a moleculelor semnal ce intervin în stimularea sau inhibarea sintezei acesteia – are rol în patogeneza unor afecțiuni datorate tulburărilor metabolismului fierului (anemia feriprivă, hemocromatoza ereditară, încărcarea cu fier din eritropoeza inefficientă, anemia asociată cu infecții și inflamații, anemia din bolile cronice).

#### 6.4.4.5 Haptoglobina

Este o glicoproteină cu masa moleculară de cca. 100 kDa, care migrează electroforetic în fracțiunea  $\alpha_2$ -globulinelor. Este alcătuită din două perechi de lanțuri peptidice ușoare (9

kDa) și grele (16 kDa), legate între ele prin punți disulfidice. Există trei tipuri diferite de haptoglobină: 1-1 monomerică (85 kDa), 2-1 dimerică (200 kDa) și 2-2 tetramerică (400 kDa). Rolul fiziologic al haptoglobinei constă în captarea echimoleculară a hemoglobinei libere, rezultate în urma hemolizei intravasculare și transportul acesteia la locul de degradare în sistemul reticuloendotelial (SRE). Hemoglobina monomer este o proteină cu masa moleculară (17 kDa) mai mică decât a albuminei, deci există pericolul pierderii acesteia prin filtrul glomerular. Nivelul plasmatic al haptoglobinei (2,5-4,5 g/L) scade datorită sintezei hepatice deficitare (scăderea producției), sau în hemoliză accentuată (se consumă cantități mari). Timpul de înjumătățire plasmatic al haptoglobinei scade de la 2-4 zile la 30 de minute în caz de hemoliză intravasculară. Dublarea ratei de hemoliză fiziologică conduce la o scădere dramatică a concentrației haptoglobinei plasmatice (aproape de zero). Creșterea consumului nu conduce la o creștere compensatorie imediată a sintezei hepatice. Concentrația haptoglobinei este crescută în inflamații acute (este un reactant de fază acută), în colestază, boala Hodgkin, terapia cu corticosteroizi.

#### 6.4.4.6 Apoproteinele

Sunt transportorii lipidelor plasmatice (vezi 14.2.1).

#### 6.4.5 INHIBITORII PLASMATICI AI PROTEAZELOR

Inhibitorii plasmatici ai proteazelor sunt  $\alpha$ -globuline reprezentând 10% din totalul proteinelor plasmatice. Au rol în protejarea organismului față de acțiunea proteazelor: inactivează proteazele, complexul celor două proteine fiind recunoscut de receptorii macrofagici specifici hepatici și îndepărtat din circulație. În lipsa antiproteazelor apar leziuni tisulare severe. Principalii inhibitori proteazici plasmatici sunt SERPINE (serin-protease inhibitors):  $\alpha_1$ -AT ( $\alpha_1$ -antitripsina),  $\alpha_1$ -ACT ( $\alpha_1$ -antichimotripsina) migrează în fracțiunea electroforetică  $\alpha_1$ , iar  $\alpha_2$ -AP ( $\alpha_2$ -antiplasmina), AT III (antitrombina III) și C1Inh aparțin fracțiunii  $\alpha_2$ -globulinelor. În categoria antiproteazelor mai intră PAI (plasminogen activator Inhibitor) și  $\alpha_2$ -Mg ( $\alpha_2$ -macroglobulina).

La nivel tisular există inhibitori metalo-proteazici (care inhibă collagenaza, gelatinaza) și inhibitori ai cistein-proteazelor (inhibitorii catepsinei B). Antiproteazele au specificitate relativă de acțiune (de exemplu plasmina este inhibată de  $\alpha_2$ -AP,  $\alpha_1$ -AT și  $\alpha_2$ -Mg). Legarea inhibitorului se realizează de obicei specific, la nivelul situsului de legare al substratului (cu excepția  $\alpha_2$ -Mg, care copleșește proteaza, izolând-o nespecific de mediul înconjurător).

##### 6.4.5.1 $\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ -AT)

Este o glicoproteină cu masa moleculară de 55 kDa, formată în hepatocite. Concentrația normală în plasmă este de 2 - 3,8 g/L. În condiții fiziologice reprezintă aproximativ 90% din fracțiunea  $\alpha_1$ -globulinică a serului.  $\alpha_1$ -AT sau  $\alpha_1$ -PI ( $\alpha_1$ -protease inhibitor) este un reactant de fază acută. Tripsina și chimotripsina, deși enzime digestive, sunt eliberate în cantități mici în circulație ca și elastaza și trombina. Enzimele proteolitice de natură endogenă (digestivă, bacteriană, leucocitară) sau exogenă cu rol în apărarea nespecifică a organismului, pot avea

efect autoagresiv dacă sunt eliberate în plasmă. Efectul antiproteazic al  $\alpha_1$ -antitripsinei se manifestă prin blocarea reversibilă a centrului activ al serinproteazelor, formând complexe echimoleculare cu ele. Din cauza molarității reduse,  $\alpha_1$ -antitripsina traversează ușor spațiile interendoteliale, pătrunde în lichidul interstițial, inactivând și serinproteazele eliberate prin exocitoza micro- și macrofagelor. Complexele echimoleculare realizate se întorc în circulație, unde proteazele sunt transmise moleculelor de  $\alpha_2$ -macroglobulină, iar  $\alpha_1$ -antitripsina eliberată își reia activitatea. Deficiența înăscută de  $\alpha_1$ -AT duce la apariția emfizemului, hepatitei neonatale și cirozei în copilărie. Alelele posibile sunt următoarele: M - normală, Z - deficit de procesare și eliberare din hepatocite, S - formă ușor degradabilă și varianta nul 0 - (lipsa sintezei). Boala apare la genotipurile 00, ZZ, MZ și MS.

#### 6.4.5.2 $\alpha_2$ -macroglobulina ( $\alpha_2$ -Mg)

Este o glicoproteină cu masa moleculară între 725-850 kDa, heterogenitatea masei moleculare fiind cauzată de conținutul variabil în glucide. Se formează în hepatocite, concentrația normală în plasmă fiind de 2,5-4,0 g/L. Acționează ca o antiprotează împotriva serinproteazelor (pepsina, plasmina, elastaza, collagenaza), dar numai în interiorul patului vascular. Inactivează antiproteazele atât în mod direct, cât și sub formele transmise de către  $\alpha_1$ -antitripsina, dar și de alte antiproteaze ale sistemului de coagulare sanguină. Deși nu este un reactant de fază acută (cantitatea ei plasmatică nu crește în cursul inflamațiilor), cantitatea ei crește la boala renală cu sindrom nefrotic și scade în hepatopatii. Limitează reacția de fază acută prin legarea citokinelor nefixate pe receptori celulari.

#### 6.4.5.3 AT III (antitrombina III)

Inactivează eficient trombina și factorul Xa, doar în prezența heparinei. În lipsa heparinei procesul are loc cu o viteză de aproximativ 1000 de ori mai mică.

#### 6.4.5.4 $\alpha_2$ -AP ( $\alpha_2$ -antiplasmina)

Are trei situsuri: unul de legare al plasminogenului, altul de inactivare a plasminei și al treilea de legare la fibrină sub acțiunea factorului XIII activat. Deficitul are drept consecință liza prematură a cheagului hemostatic.

#### 6.4.5.5 $\alpha_1$ -ACT ( $\alpha_1$ -antichimotripsina)

Nu este esențială ca inhibitor proteazic. Este crescută în țesutul nervos al pacienților cu boala Alzheimer.

### 6.4.6 PROTEINE DE FAZĂ ACUTĂ

Proteine de fază acută sunt  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  și  $\beta$ -globuline a căror producție hepatică crește sub acțiunea citokinelor produse și eliberate de imunocitele implicate în reacții inflamatorii. Concentrația plasmatică a acestora se modifică nespecific, ca răspuns la anumite situații patologice: IMA (infarct miocardic acut), reacții inflamatorii acute și cronice, tumori maligne, traumatisme, intervenții chirurgicale majore.

Funcția acestor proteine este una nespecifică: anihilează proteazele în exces produse în leucocite sau eliberate de bacterii și favorizează fagocitoza.

Proteinele de fază acută sunt clasificate după evoluția activității lor serice, în:

- proteine cu creșterea rapidă (1-2 ore) și intensă (de 10-2000 ori) a concentrației serice: PCR (proteina C reactivă), amiloidul seric A (SAA),
- proteine cu creștere mai lentă (24 - 48 ore) și moderată (de 2-5 ori):  $\alpha_1$ -AT,  $\alpha_1$ -GPac ( $\alpha_1$ -glicoproteina acidă), haptoglobina și fibrinogenul,
- proteine cu creștere lentă (2-3 zile) și modestă (maximum de 2 ori): Ceruloplasmina, C3, C4 și C1 INH,
- componentele negative ale reacției de fază acută sau proteine anti – fază acută: albumina, prealbumina, colinesteraza, factorul XIII al coagulării și transferina (a căror sinteză hepatică scade de cele mai multe ori în inflamații, sub acțiunea inhibitoare a TNF- $\alpha$ ; în cazul transferinei, are loc adeseori o captare a acesteia de către macrofage, împreună cu ioni de fier).

#### 6.4.6.1 Proteina C reactivă (PCR)

Este o proteină pură sintetizată de hepatocite, alcătuită din cinci lanțuri polipeptidice (masa moleculară fiind 5 x 20 kDa) care nu sunt legate covalent între ele. Concentrația plasmatică normală este sub 1 mg/L (mai mare la supraponderali, fumători, femei la menopauză cu terapie de substituție hormonală), nivelul PCR crescând nespecific în multe procese inflamatorii acute infecțioase (mai puțin în cele virale) sau neinfecțioase, uneori de 100-1000 ori în numai 24 ore. Denumirea provine de la faptul că precipită polizaharidul "C" al peretelui pneumococului în prezența  $\text{Ca}^{2+}$ . Fenomenul de atașare a fost însă observat și în prezența altor microorganisme și chiar a celulelor lizate, fiind urmat de activarea fagocitozei și a sistemului complementului pe calea clasică. S-a dovedit că interacțiunea este nespecifică: având afinitate pentru receptorul Fc al macrofagelor și limfocitelor, PCR facilitează endocitoza bacteriană printr-un proces similar opsonizării. PCR poate precipita și policationi, hemocianină, fibrinogen și fibronectină (independent însă de ionul de calciu). Timpul de înjumătățire plasmatică este de 12-24 ore.

Creșterile modeste ale concentrației PCR (până la 10 mg/L), determinabile doar prin tehnici cu sensibilitate înaltă, sunt importante în evaluarea microinflamatiei în plăcile de aterom și au valoare predictivă în evaluarea riscului cardiovascular. Valori peste 3 mg/L, la 90% dintre pacienții cu angină pectorală instabilă, prezic un infarct miocardic acut în următoarele 3 luni. Valori peste 5 mg/L la 72 de ore de la implantarea de stent, indică evoluția leziunilor aterosclerotice în următoarele luni, iar la 20% dintre pacienți – complicații pe termen scurt.

Creșteri ale concentrației PCR la 10-50 mg/L pot surveni în infecții acute bacteriene locale, infecții cronice (tbc, sifilis), infecții virale, colagenoze, colita ulceroasă, infecții intrauterine în ruptura prematură a membranelor (dozarea procalcitoninei este alternativa preferată în diferențierea infecțiilor bacteriene).

Creșteri ale concentrației PCR peste 50 mg/L pot apare în infecții bacteriene severe (cel mai adesea generalizate), vasculite sistemice, pancreatită acută, tumori metastatice.

#### 6.4.6.2 Procalcitonina (pCT)

Nu este un reactant de fază acută (sinteza sa nefiind reglată de citokine), ci un prohormon cu importanță în diagnosticul diferențial al reacțiilor inflamatorii.

Polipeptidul alcătuit din 116 aminoacizi (13 kDa), cu porțiunea mijlocie (Aa 60-91) identică cu a calcitoninei, este sintetizat în celulele C ale glandei tiroide, inițial sub forma preprocalcitoninei (141 Aa). Clivarea polipeptidului până la calcitonină este blocată în infecții bacteriene sistemice (nu și în infecții virale, afecțiuni neoplazice, reacții alergice sau autoimune), în carcinomul tiroidian cu celule C și în carcinomul bronșic cu celule mici - concentrația plasmatică a procalcitoninei crescând peste 10  $\mu\text{g/L}$ . Specificitatea marker-ului în diagnosticul sepsis-ului este de peste 90% și poate fi îmbunătățită prin dozarea concomitentă a PCR și a IL-8 (mai ales în cazul infecțiilor nou-născutului).

#### 6.4.6.3 Amiloidul seric A (SAA)

Este produs de macrofagele și fibroblaștii hepatici sub acțiunea stimulatoare a IL-1, -6, TNF- $\alpha$ , eliberate de imunocite implicate în procese inflamatorii bacteriene și virale. Concentrația serică (normal sub 10 mg/L) crește chiar mai repede (2-4 ore) și mai pronunțat (până la 2000 ori) decât a PCR. SAA se leagă la micelii lipidice, în special la HDL3, accelerând degradarea hepatică a acestei subclase Lp. Concentrația crescută a SAA se asociază de obicei cu valori scăzute ale paraoxonazei (PON-1) – o enzimă antioxidantă importantă în protecția antiaterosclerotică, prezentă în HDL.

#### 6.4.6.4 $\alpha_1$ -GP acidă

Se mai numește și orosomucoid. Este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 44 kDa și cu un conținut glucidic între 40-45% din greutate, cu predominanța acidului neuraminic (NANA) și sialic, care realizează caracterul acid al substanței. Se formează în hepatocite în cantități reduse, sub acțiunea interleukinei 6 (IL-6), alcătuind doar 5% din cantitatea totală a fracțiunii  $\alpha_1$ -globulinice. Concentrația normală în plasmă a glicoproteinei  $\alpha_1$ -acide este de 0,6 – 1,0 g/L. Fiind unul dintre reactanții de fază acută care participă la apărarea organismului împotriva reacțiilor proprii de apărare excesive, cantitatea ei crește mult în cursul inflamațiilor acute, subacute și cronice, dar și la bolnavii cu tumori maligne. Funcția ei nu este cunoscută în totalitate. Se leagă nespecific la suprafața bacteriilor, virusurilor, medicamentelor bazice, cum ar fi diverse miorelaxante, psihotrope, beta blocante, progesteron. Se pare că are acțiune imunosupresivă, datorită efectului său inhibitor asupra activării PMN (leucocite polimorfonucleare), dar și de inhibare a agregării plachetelor. Concentrația de acid sialic este o măsură a lizei celulare din afecțiuni acute și/sau cronice.

#### 6.4.6.5 Ceruloplasmina

Este o  $\alpha_2$ -globulină care conține peste 90% din cuprul seric, astfel încât acesta nu poate fi cedat rapid țesuturilor. Organismul adult sănătos conține în total 75-150 mg (14-24 mmol) cupru, în primul rând sub forma depozitată în hepatocite. Concentrația normală în cupru a plasmiei este între 15 și 24  $\mu\text{mol/L}$  (90-110  $\mu\text{g/dL}$ ); 10% din cuprul plasmatic este fixat labil de albumine, reprezentând cantitatea cuprului "liber", rapid cedabil în țesuturi. Din cauza conținutului ei glucidic variabil, greutatea moleculară a ceruloplasminei se modifică între 130 – 160 kDa, glicoproteina având o structură octamerică (este formată din 4 perechi de peptide  $\alpha$ - $\beta$ , capabile să fixeze fiecare câte un ion cupric). Până în prezent s-au identificat 7 alotipuri diferite ale ceruloplasminei.

Conținutul în ceruloplasmină al plasmei sanguine a noului născut este foarte redus. Ca urmare, transportul cuprului în organismul lui se face aproape exclusiv sub formă legată de albumine. În cursul primelor luni de viață, cantitatea ceruloplasminei crește treptat în plasmă, realizând la vârsta de un an valoarea normală (respectiv 35 mg/dL). Fiind un reactant de fază acută, cantitatea ceruloplasminei este crescută și în plasma gravidelor, dar și în cazuri patologice (inflamații microvasculare, ciroză hepatică, infarctul miocardic, tumori maligne etc). Ceruloplasmina dispune și de o acțiune enzimatică oxidoreductazică, manifestată în cursul lanțului respirator și nu numai. Se consideră actualmente că ceruloplasmina este importantă mai degrabă ca oxidoreductază, având rolul de a inactiva radicalii liberi capabili să producă leziuni tisulare și de a oxida ionul de fier în forma transportabilă de transferină ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Rolul de transportor nu este unul real, deoarece cuprul legat de ceruloplasmină nu mai este cedat țesuturilor, ci este transportat la ficat și eliminat pe cale biliară. Printr-o alimentație obișnuită organismul primește zilnic o cantitate 50-80  $\mu\text{mol}$  (3-5 mg) cupru. Cantitatea reabsorbită ajunge în ficat și se fixează de proteinele fixatoare de metale, numite metalotionine, printre care și hepatocupreina. O parte a cuprului depozitat în hepatocite, prin intermediul aparatului Golgi se excretă în bilă. Prin urină se elimină zilnic 0,3  $\mu\text{mol}$ /zi (20  $\mu\text{g}$ /zi). În boala Wilson (degenerescența hepato-lenticulară) această cantitate poate fi și de 3 ori mai mare. Boala Wilson se moștenește autosomal recesiv (forma heterozigotă are prevalența de 1:200) și este caracterizată prin scăderea marcată sau chiar lipsa excreției în bilă a cuprului din lizozomii hepatocitelor, datorită scăderii sau absenței ceruloplasminei, ceea ce provoacă intrarea rapidă a cuprului în țesuturi, cu depunerea în special în ficat și nucleii de la baza creierului. Cuprul acumulat în hepatocite provoacă distrugerea acestora. În locul parenchimului hepatic se formează țesut conjunctiv, ducând la manifestarea progresivă a unei ciroze hepatice grave. Cantitatea mare de cupru eliberată în sânge se fixează lax de albumine. În ciuda creșterii exagerate a cuprului eliminat prin urină, se depun totuși cantități din ce în ce mai mari în țesuturi, cu precădere în creier, în rinichi și în cornee. Din această cauză apar tulburări funcționale nervoase (psihice, motorii), renale și apariția inelelor lui Kaiser-Fleischer pe cornee. Depunerea cuprului în țesuturi poate fi redusă cu ajutorul unor substanțe chelatoare, ca D-penicilamina.

#### 6.4.6.6 Factorii $\text{C}_3$ și $\text{C}_4$ ai sistemului complementului

Cascada complementului intervine în liza bacteriană și celulară, stimularea chemotaxiei și fagocitozei.

$\text{C}_3$  este o glicoproteină cu masa moleculară de 180 kDa, formată din două lanțuri peptidice  $\alpha$  și  $\beta$ , legate între ele prin 3 punți disulfidice. Conținutul normal al plasmei în  $\text{C}_3$  se situează între 0,8-1,2 g/L. Scăderea cantității factorului  $\text{C}_3$  semnifică un consum sporit (activitate citolitică marcată), iar creșterea valorilor  $\text{C}_3$  în plasmă pledează pentru scăderea consumului, adică pentru încetinirea mecanismelor citolitice. Lipsa congenitală a  $\text{C}_3$  este o anomalie ereditară rară, transmisă autosomal recesiv, caracterizată prin reducerea capacității de apărare umorală nespecifică.

Factorul  $C_4$  al complementului se găsește în concentrații mult mai mici 0,1 – 0,4g/L și se consumă în procesele inflamatorii care decurg cu activarea căii clasice a complementului.

#### 6.4.7 PROTEINE – MARKERI TUMORALI

(vezi și Capitolul 23)

##### 6.4.7.1 $\alpha_1$ -fetoproteina

Este o glicoproteină cu masa moleculară de 70 kDa. Se formează în hepatocite, dar numai în cantități foarte mici (sub 5 ng/ml). În cursul vieții embrionare însă are o concentrație mare în sângele fetal, având funcția de a fixa și a neutraliza efectele dăunătoare ale estrogenilor pătrunși transplacental la făt din organismul mamei. Cantitatea  $\alpha_1$ -fetoproteinei scade rapid în sângele nou-născutului. În cazuri de carcinom hepatic însă, gena suprimată se reactivează și se declanșează biosinteza citoplasmatică a acestui marker tumoral (care nu este un antigen tumoral, ci un antigen asociat cancerului) într-o măsură în care el poate fi pus în evidență calitativ sau determinat cantitativ. Totuși, specificitatea apariției în plasmă a acestui marker nu este exclusivă, deoarece poate fi întâlnită și în ciroză hepatică, respectiv în inflamații severe.

##### 6.4.7.2 $\beta_2$ -microglobulina

Este formată dintr-un singur lanț peptidic cu masa moleculară de 11,8 kDa. Reprezintă lanțul peptidic ușor al haplotipurilor antigenice de histocompatibilitate de clasa I-a (HLA-A, B și C). Plasma normală conține cantități reduse (1-2 mg/L) de  $\beta_2$ -microglobulină, deoarece se filtrează la nivelul glomerulilor renali și se elimină repede prin urină. Cantitatea eliminată renal crește în cursul distrugerilor tisulare (inflamații, tumori maligne, respingerea grefelor), iar cantitatea ei serică crește în stări de anurie. Este necesară alcalinizarea urinei recoltate timp mai îndelungat, deoarece pH-ul acid o descompune.

##### 6.4.7.3 Antigenul carcino-embriionar (CEA)

Antigenul carcino-embriionar (CEA) este o glicoproteină cu masa moleculară de 180 kDa. Se formează în celulele limfatice din plăcile Payer ale tubului digestiv în cursul vieții embrionare. După naștere, gena structurală este reprimată și în condiții fiziologice plasma copilului și a adultului conțin numai urme de CEA (sub 10 ng/ml). În celulele transformate malign ale tubului digestiv (de la esofag până la rect) gena reprimată este derepresată și determină biosinteza CEA ca un antigen asociat cancerului tubului digestiv. În urma eliminării chirurgicale a tumorii primare, cantitatea în plasmă a CEA scade într-o măsură considerabilă, iar în urma unei recidive crește paralel cu creșterea masei tumorale.

#### 6.4.8 PROTEINE CU ROL ÎN APĂRAREA SPECIFICĂ A ORGANISMULUI

Imunoglobulinele sunt proteine din clasa  $\gamma$ -globulinelor, produse de limfocitele B transformate secretor în plasmocite.

##### 6.4.8.1 Structura imunoglobulinelor

Imunoglobulinele sunt compuși glicoproteinici tetramerici formați din câte o pereche de lanțuri peptidice grele (heavy, H) și ușoare (light L), cu masele moleculare de 44 - 66 kDa,

respectiv 22kDa, conținând un număr de 200, respectiv 330 - 340 aminoacizi. Lanțurile sunt cuplate între ele disulfidic în așa fel, încât cele două porțiuni N-terminale sunt îndepărtate între ele sub formă de Y.

Punctul de despărțire a furcii este mobil, sub formă de balama (*hinge*), permițând celor două ramuri o mobilitate unghiulară considerabilă. Prin porțiunile lor cu structura specifică epitopului antigenic, numită paratop, cele două capete N-terminale bifurcate, fixează antigenul și sunt desemnate fragmente Fab (*antigen binding*). Porțiunea C-terminală a moleculei Ig poate fixa factorul C1q al complementului; sub formă izolată poate fi și cristalizată. Din acest motiv a fost desemnată ca fragmentul Fc (c provine de la complement, respectiv cristalizabil), cu care imunoglobulina se fixează în membrana monocitelor și limfocitelor sau poate activa factorii complementului.

Structura secundară a lanțurilor ușoare și grele prezintă bucle, numite domenii (domain), fixate între ele prin punți disulfidice (Figura 6.3).

Conform mării variabilități a structurilor epitopilor antigenici și secvența aminoacizilor din cele două domenii N-terminale ale lanțurilor L și H este deosebit de variabilă, dar foarte constantă în restul domeniilor. Ca urmare, fiecare lanț ușor și greu are câte un domeniu N-terminal cu secvența variabilă (LV, HV) și unul cu secvența constantă (LC, HC1).

În porțiunile N-terminale atât ale lanțului greu cât și ale lanțului ușor, există anumite poziții ale aminoacizilor cu caracter hipervariabil, acești aminoacizi fiind esențiali în legarea epitopului antigenic în cavitatea numită buzunar (pocket). Aceste porțiuni reprezintă regiunile determinante ale complementarității anticorpilor (Aa30 - CDR1, Aa50 - CDR2 și Aa95 - CDR3, Complementarity Determining Regions). Între domeniile variabile și constante se situează și o porțiune de joncțiune, desemnată J, formată din 4 - 6 resturi de aminoacizi, iar în cazul lanțurilor H încă o porțiune numită D (de diversitate), cuprinzând 8 - 10 resturi de aminoacizi.

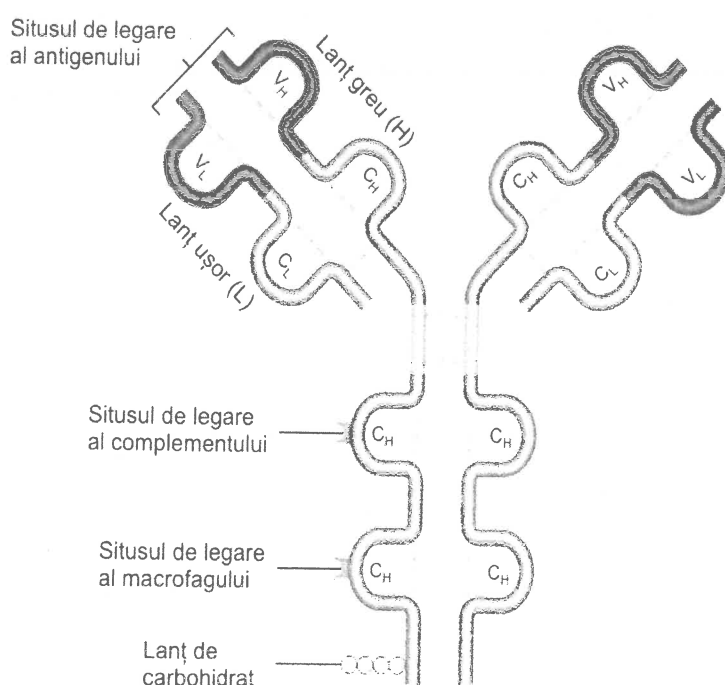


Figura 6.3 Structura pe domenii a imunoglobulinelor

În restul domeniilor (HC2 și HC3, respectiv în IgA și HC4) secvența aminoacizilor este constantă. Catenele glucidice laterale sunt fixate pe resturi de acid aspartic sau glutamic, exclusiv în lanțurile H. Lanțurile L nu conțin glucide.

#### 6.4.8.2 Clasificarea imunoglobulinelor

Pe baza secvențelor aminoacidice deosebite (markerilor) prezente în domeniile cu secvența constantă, dar și variabilă ale lanțurilor L și H, pot fi deosebite mai multe grupe: izotipuri, allotipuri și idiotipuri.

- Lanțurile L au numai două izotipuri:  $\kappa$  sau  $\lambda$ ; în molecula unei Ig poate fi prezent numai un singur izotip.

- Lanțurile H pot exista sub forma a 5 izotipuri:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$  și  $\epsilon$ . Markerii acestora sunt localizați în domeniile cu secvența aminoacidică constantă și determină clasele de imunoglobuline prezente la toți indivizii speciei umane: IgG, IgA, IgM, IgD și IgE.

- Unele izotipuri au și allotipuri (subclase), ca urmare a variației unor Aa în zona C a lanțurilor H. Astfel clasa IgG poate avea 4 allotipuri: IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4; cele 2 allotipuri ale clasei IgA sunt IgA1 (forma serică, monomerică) și IgA2 (forma secretorie / dimerică).

- Idiotipurile sunt variantele individuale (idiospecifice) ale claselor Ig, caracterizate prin markeri localizați în domeniile cu secvența aminoacidică variabilă ale lanțurilor LV și HV. În condiții fiziologice sunt mascate (cuprinse în adâncul structurii terțiare a lanțului peptidic).

În cursul reacției antigen - anticorp ele se pot descoperi participând activ la reglarea răspunsului imun umoral (provoacă uneori formarea anticorpilor antiidiotipici sau a anti-anticorpilor). Caracteristicile structurale și funcționale ale claselor de imunoglobuline sunt redate în Figura 6.3 și Tabelul 6.III.

**Ig G** constituie 75% din imunoglobulinele plasmatiche. Sunt anticorpi majori produși ca răspuns la un contact secundar cu un antigen. Străbat endoteliile și placenta, de aceea intervin în imunitatea pasivă a nou-născutului. Neutralizează toxine bacteriene și funcționează ca opsonine (se leagă la suprafața bacteriană favorizând fagocitoza).

**Ig A** sunt anticorpi majori secretori, se găsesc în lacrimi, salivă, secreții respiratorii, secreții gastro-intestinale, secreții ale tractului uro-genital. În forma binară (IgA2) conțin 2 lanțuri oligopeptidice: unul joncțional și altul secretor (o glicoproteină). Ig A2 este rezistentă la acțiune proteolitică și are rol în legarea bacteriilor (le aglutinează), împiedicând penetrarea de către acestea a mucoaselor.

**Tabelul 6.III Principalele caracteristici ale claselor de imunoglobuline plasmatiche**

Clasa de Ig	GM (kDa)	Unități	Fab	Concentrație	Subclase	T1/2
Ig G	150	1	2	6-16 g/L	IgG 1 - 4	17 - 35 zile
Ig A	160	1,2	2,4	0,7-4 g/L	IgA 1 - 2	6 - 8 zile
Ig M	900	5	5	0,4-2 g/L	?	5- 7 zile
Ig D	185	1	2	< 40 mg/L	?	3 zile
Ig E	200	1	2	< 0,5 mg/L	?	2 zile

**Ig M** sunt anticorpi majori produși în timpul răspunsului imun primar. Se produc după naștere (prezența lor la nou-născut indică o infecție intrauterină). Au structură pentamerică, 5 macromolecule de Ig M sunt legate cu un polipeptid joncțional. Factorul reumatoid și izoaglutininele ( $\alpha$  și  $\beta$ ) de grupă sanguină ABO aparțin acestei clase.

**Ig D** sunt imunoglobuline aflate pe suprafața limfocitelor B, cu rol de receptor al acestora pentru antigene. Fiecare limfocit B produce un singur idiotip imunoglobulinic.

sunt imunoglobuline fixate prin fragmentul Fc, pe suprafața mastocitelor. Cuplarea lor cu antigenul induce degranularea mastocitului cu declanșarea reacției alergice (tip I, anafilactic). Intervin în patogeneza reacției imune patologice de tip I.

### 6.4.8.3 Hipergamaglobulinemii

#### *A. Policlonale*

Stimularea mai multor linii limfocitare B duce la amplificarea sintezei mai multor tipuri de Ig (pe electroforegramă se constată creșterea globală a fracțiunii  $\gamma$ -globulinelor). Hipergamaglobulinemiile policlonale se produc în infecții acute și cronice (mononucleoza infecțioasă, tuberculoză, endocardită bacteriană), boli autoimune (lupus eritematos diseminat - Ig G și Ig M, poliartrită reumatoidă - Ig A, Ig M, sindromul Sjögren, sclerodermie), afecțiunile hepatice acute și cronice (ciroză, hepatită cronică activă, hepatită virală acută).

#### *B. Oligoclonale*

Stimularea unui număr restrâns de clone limfocitare B duce la amplificarea sintezei tipurilor de imunoglobuline produse de acestea (pe electroforegramă apar zone mai restrânse ca dispunere, benzi discrete, omogene în fracțiunea  $\gamma$ -globulinelor). În paraproteinemii pot apare de asemenea benzi oligoclonale.

#### *C. Monoclonale*

Proliferarea unei singure clone celulare B duce la sinteza excesivă a unui singur tip de imunoglobulină patologică (paraproteină), care formează "gradientul M" (monoclonal) în electroforegramă. Cea mai frecventă cauză este de natură malignă - mielomul multiplu (plasmocitom), macroglobulinemia Waldenström, rar leucemia limfocitară cronică, limfoamele nonhodgkiniene cu celule B (ultimele două se caracterizează prin proliferări de limfocite cu dimensiune redusă și producție scăzută de imunoglobuline) și cauze "benigne" (hepatita cronică, ciroza hepatică).

#### **Mielomul multiplu**

Mielomul multiplu este cauza cea mai comună a paraproteinemiei, constând din proliferarea malignă diseminată a plasmocitelor în măduva osoasă.

*Caracteristici clinice:*

- dureri osoase (datorită proliferării tumorale), fracturi osoase;
- anemie, sângerări (datorită înlocuirii măduvei osoase hematogene);

- infecții recurente (datorită scăderii leucocitelor și cantității imunoglobulinelor normale);
- tulburări ale funcției renale (proteinurie, creșterea calciului și acidului uric în ser și urină);
- sindrom de hipervâscozitate (datorat creșterii concentrației proteinelor plasmatiche).

*Biochimic:*

- creșterea concentrației proteinelor plasmatiche prin creșterea sintezei proteinelor anormale (paraproteine) de tipul Ig G sau Ig A (foarte rar Ig D sau Ig E), formând gradientul "M" în proteinogramă. De obicei caracterul monoclonal se manifestă și prin sinteza unui singur tip de lanț ușor ( $\kappa$  sau  $\lambda$ ), care se produce excedentar, prin comparație cu lanțul greu.
- proteinurie (proteine Bence-Jones) cu lanțuri ușoare libere, apare în 50% din cazuri, fiind patognomonică (ca și gradientul "M");
- scăderea concentrației Ig plasmatiche, prin supresia sintezei Ig normale;
- sindrom Fanconi, datorită leziunilor tubulare renale;
- uremie datorită citolizei accelerate și afectării renale grave;
- hipercalcemie datorită distrucției osoase (fosfataza alcalină osoasă este normală).

### **Macroglobulinemia Waldenström**

Această boală este caracterizată printr-o tumoră cu limfo-plasmocite (celulă cu un stadiu de maturare intermediar între limfocitele B și plasmocite) producătoare de Ig M – lanțuri grele libere de tip  $\mu$ .

Macroglobulinemia Waldenström nu provoacă dureri osoase sau creșterea calcemiei, deoarece tumora se dezvoltă în ganglioni, splină, ficat (limfadenopatii și hepato-splenomegalie). Hipervâscozitatea plasmatică (datorită greutatei moleculare mari a Ig M) dă principalele manifestări clinice (scade viteza circulației prin capilare): dureri de cap, oboseală, tulburări de vedere, retinopatie, tendință crescută la tromboze, anemie, scăderea rezistenței la infecții. Are un prognostic mai favorabil decât mielomul multiplu. Paraproteinele sunt frecvent crioglobuline.

*Crioglobulinele* sunt Ig care precipită la 4°C și se redizolvă prin încălzire la 37°C. 50% din crioglobuline sunt paraproteine, altele sunt complexe Ig - anti Ig (cel mai adesea produse la factorul reumatoid). Unele crioglobuline precipită chiar la temperaturi peste 22°C, acestea cauzează simptome clinice. Iarna sau la temperatură scăzută în capilarele extremităților pot precipita crioglobuline. *Sindromul Raynaud* (caracterizat prin dureri episodice de natură ischemică la nivelul extremităților, determinate de scăderea temperaturii) are printre cauze și crioglobulinemia.

### **Investigarea paraproteinemiilor**

Electroforeza proteinelor, pe care se poate observa "gradientul M", cel mai frecvent în zona  $\gamma$  globulinelor, mai rar în zonele  $\alpha_2$ - $\beta$ . În fracțiunea  $\gamma$  apar paraproteinele de tip Ig, iar în fracțiunile  $\alpha_2$  și  $\beta$  găsim de obicei polimeri de lanțuri ușoare.

- Concentrația paraproteinelor peste 10 g/L și valoarea crescândă în evoluție sunt parametri importanți.
- Concentrațiile Ig G, A și M fiziologice sunt scăzute.
- Proteinuria Bence-Jones.
- Plasmocite medulare peste 7% din elementele nucleate.

Modificări secundare:

- Creșterea calcemiei.
- Creșterea nivelului seric al acidului uric.
- Creșterea concentrației  $\beta$ 2-microglobulinei plasmatice poate indica o masă tumorală de dimensiune mare sau o funcție renală alterată.

Fosfataza alcalină este normală.

#### 6.4.8.4 Deficitul de imunoglobuline

Se consideră deficiență semnificativă dacă valoarea Ig este de 10 ori mai mică decât limita normală inferioară (IgG - 0,6g/L, IgA - 0,07g/L, IgM - 0,04g/L).

La nou-născut există o deficiență "fiziologică" de Ig, deoarece cu excepția Ig G, restul nu trec prin placentă (IgG trece în ultimul trimestru al sarcinii). Ig G matern conferă imunitate pasivă nou-născutului față de diferiți agenți patogeni. Aceste Ig G sunt catabolizate la 1-3 luni de viață, când sinteza Ig proprii este încă deficitară.

Deficiențele de Ig pot fi:

- **secundare:** în tumori limfoide (mielom multiplu, boala Hodgkin, leucemie limfocitară cronică), tratament cu medicamente citotoxice și steroizi, sindrom nefrotic, enteropatii cu pierderea proteinelor din tubul digestiv.
- **primare (genetice):**
  - *Agamaglobulinemia primară Bruton*, legată de cromozomul X (apare la băieți).
  - *Deficitul selectiv de Ig A* (ambele subclase): incidența acestei boli este 1:500 în populație. Unii indivizi par sănătoși, alții au frecvent infecții respiratorii și gastro-intestinale, diaree cronică, sunt predispuși la boli cu complexe imune circulante, cum ar fi lupusul eritematos diseminat (LED), poliartrita reumatoidă (PR).
  - *Sindromul de hiper-Ig E* (sindromul Job): se caracterizează prin infecții pulmonare și cutanate. Deși crește nivelul Ig E, există o deficiență funcțională a leucocitelor polimorfonucleare (PMN), crește numărul eozinofilelor.

#### 6.4.9 PROTEINOGRAMA SERICĂ

Fracționarea electroforetică a proteinelor serice la pH alcalin se face în medii gelificate (agar, agaroză, acrilamidă, amidon, acetat de celuloză etc). În funcție de vitezele lor de migrare, proteinele se separă în 5 fracțiuni deosebite: albuminele migrează cel mai rapid, urmate succesiv de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  și  $\gamma$  globulinele. Aspectul traseului electroforetic, precum și interpretarea densitometrică, sunt prezentate în Figurile 6.4 a, b (vezi și Capitolul 7).

În cursul evoluției diferitelor procese patologice, cantitatea proteinelor se modifică în mod nespecific, prin manifestarea hipoproteinemiilor sau hiperproteinemiilor, cu scăderea cantității albuminelor și creșterea globulinelor. Totuși, pe baza unor aspecte caracteristice/ tipice ale proteinogramelor, pot fi deosebite următoarele 5 tipuri de disproteinemie:

#### 6.4.9.1 Tipul inflamației acute

Acest tip este caracterizat printr-o creștere moderată a proteinemiei, o scădere mai puțin accentuată a cantității albuminelor, o creștere accentuată a  $\alpha_1$  și una marcată a  $\alpha_2$ -globulinelor, purtătoarele reactanților de fază acută, însoțită de o moderată creștere a  $\gamma$  globulinelor.

#### 6.4.9.2 Tipul inflamației cronice

Este caracterizat printr-o hiperproteinemie și o hipoalbuminemie exprimată, o creștere mai moderată a  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  globulinelor, însă printr-o creștere însemnată a  $\gamma$ -globulinelor neomogene (cu bază largă în proteinogramă). Creșterea concomitentă a  $\alpha_2$ -globulinelor pledează pentru o inflamație subacută sau cronică - activată.

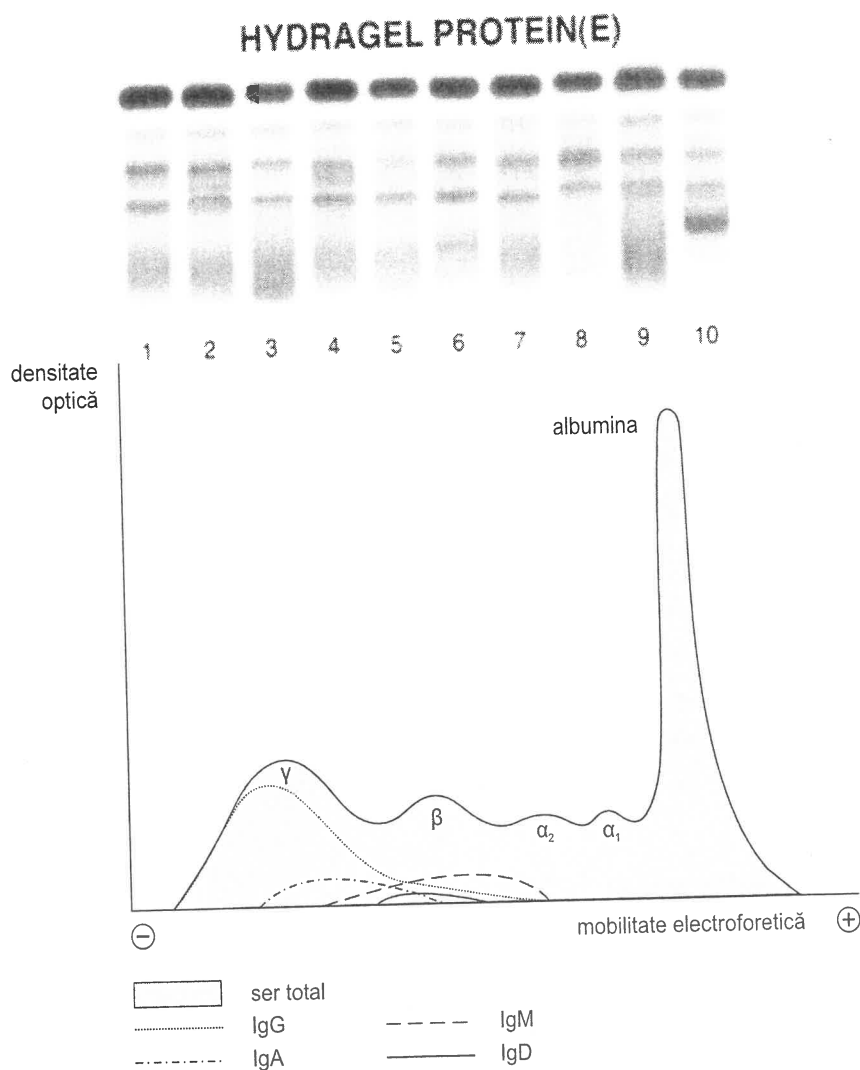


Figura 6.4 a. Aspectul grafic al unor proteinograme normale (5) și patologice: inflamație acută (1, 2, 4); inflamație cronică (3); ciroză (9); sindrom nefrotic (8); gradient monoclonal "M" în  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  (6 și 10). b. Interpretarea densitometrică a unui traseu electroforetic proteic

În afecțiuni hepatice acute apar modificări necaracteristice și neînsemnate ale proteino-gramei, comparativ cu creșterea transaminazelor și scăderea raportului AST/ALT. În sindromul posthepatitic creșterea fracțiunii  $\gamma$ -globulinelor indică evoluția spre cronicizare. Aspectul este policlonal, mai accentuat în cirozele hepatice. În angiocolite și ciroze biliare se remarcă creșterea fracțiunii  $\alpha_2$ -globulinelor și mai puțin a  $\gamma$ -globulinelor. În neoplasme hepatice electroforeza proteinelor are valoare diagnostică redusă, cu excepția tumorilor hepatice cu ciroză: scad albuminele, cresc  $\gamma$ -globulinele și cresc foarte mult  $\alpha_1$ -globulinele.

#### 6.4.9.3 Tipul sindromului nefrotic

Prin scăderea marcată (din cauza eliminării lor renale) a cantității albuminelor serice, proteinograma prezintă aspectul opus al tipului anterior. În sindromul nefrotic se pierd proteine cu masă moleculară mică: albumine și  $\alpha_1$ -globuline ( $\alpha_1$ -AT,  $\alpha_1$ -ACT,  $\alpha_1$ -GPacidă, AT III, transferina). Excepția o constituie factorii coagulării vitamina K dependenți (II, VII, IX, X) și proteina C, care datorită radicalilor de acid gama-carboxiglutamic din moleculă au sarcini negative suplimentare, ceea ce le conferă o puternică electronegativitate și astfel se resping cu membrana electronegativă a capsulei Bowman. Pierderea proteinelor prin urină duce la scăderea presiunii coloid-osmotice din plasmă, ceea ce produce stimularea globală a sintezei hepatice de proteine. Proteinele cu masă moleculară mică se pierd în continuare, iar cele cu masă moleculară mai mare ( $\alpha_2$ ,  $\beta$ -globuline:  $\alpha_2$ -Mg, fibrinogenul, factorul XIII al coagulării, lipoproteinele cu ApoB, Ig M, fibronectina) sunt reținute, contribuind la menținerea presiunii oncotice în plasmă.

#### 6.4.9.4 Tipul gradientului monoclonal "M"

În cazul transformării maligne a unei populații omogene (clone) limfocitare B, populația plasmocitară derivată din aceasta produce un singur fel de imunoglobulină sau fragment al acesteia, numită „monoclonală”. Aceste proteine se prezintă în clasa gamaglobulinelor proteinogramelor sub forma unor fracțiuni omogene, intense și cu baza îngustă, numită gradient monoclonal ("M"). Proteinele din gradientul M au fost denumite paraproteine, pe baza considerentului că ele au compoziția aminoacidică și structura diferite de cele normale. În cazul moleculelor complete tetramerice, clasa imunoglobulinelor monoclonale poate fi stabilită cu o aproximație bună, după localizarea lor: IgM în  $\gamma_1$  (macroglobulinemia Waldenström), IgA în  $\gamma_{1-2}$  și IgG în  $\gamma_{2-3}$ . Lanțurile ușoare sau grele izolate, pot fi identificate cu ajutorul unor seruri imune monospecifice precipitante. Lanțurile ușoare sau grele izolate - agregate pot migra împreună cu orice fracțiune a proteinogramei (mai ales în  $\alpha_2$  și  $\beta$ ), în funcție de încărcarea lor electrică și de gradul lor de agregare. Este de remarcat că, din cauza maselor lor moleculare relativ mici (22, respectiv 44 KDa), la nivelul glomerulilor renali se filtrează în primul rând lanțurile ușoare sub forma proteinuriei Bence-Jones (boala Kahler) și grele (boala Franklin) separate.

## 6.5 CAZURI CLINICE COMENTATE

### 6.5.1 MIELOM MULTIPLU IGA-K

Bărbat de 75 ani, cu scădere în greutate de 5 kg în ultima lună, se prezintă la medicul generalist acuzând amețeli, dureri la nivelul coloanei vertebrale lombare și repetate infecții respiratorii în ultimele luni. Investigațiile solicitate inițial au avut următoarele rezultate:

- Ureea – 80 mg/dL
- Creatinina – 1,6 mg/dL
- Proteinele totale – 85 g/L
- Albumina – 31 g/L
- Acidul uric – 9 mg/dL
- Calciul total – 2,76 mM/L
- VSH – 100 mm/h
- Hemoglobina – 8,8 g/dL
- Frotiul periferic: anemie normocromă, normocitară și hematii așezate în rulouri

Radiografiile osoase au demonstrat leziuni tipice pentru mielomul multiplu (rarefierii cu aspect perforant) la nivelul vertebrelor lombare, coastelor și sternului. Electroforeza proteinelor serice solicitată ulterior a demonstrat prezența unei paraproteine în zona gama2 a globulinelor (cu hipogamaglobulinemie marcată), care la imunofixare s-a dovedit a fi IgA-k. În urină s-a evidențiat proteina Bence-Jones de tip k.

**Comentariu:** descrierea este tipică pentru un mielom multiplu; în mai mult de 50% din cazuri paraproteina este de tip Ig G, sub 20% din cazuri de tip IgA. Anemia și deficitul imun se datorează înlocuirii măduvei osoase normale de către linia plasmocitară malignă. Diagnosticul se bazează pe triada: Paraproteina serică + Bence-Jones urinare + prezența masivă a plasmocitelor în măduva osoasă (> 7 %). Deși modificările sunt tipice, punctatul medular rămâne investigația care confirmă diagnosticul (dacă infiltrația nu este masivă, adeseori examenul de măduvă nu evidențiază însă plasmocite).

### 6.5.2 DEFICIT DE ALFA-1-ANTITRIPSINĂ

Un nou-născut de sex feminin prezintă la controlul medical postnatal: detresă respiratorie, emfizem pulmonar, valori crescute ale transaminazelor și icter încă de la naștere:

- Bilirubina totală – 4 mg/dL
- Bilirubina directă – 0,3 mg/dL
- Proteinele totale – 54 g/L
- Albumina – 30 g/L
- GOT – 80 U/L
- GPT – 90 U/L
- Hemoglobina – 14,2 g /dL.

Având în vedere sindromul de hepatoliză, se solicită ulterior testele serologice virale hepatice (HBs Ag, HBe Ag, HCV Ab) - al căror rezultat este negativ – și electroforeza proteinelor serice.

Rezultatul proteinogramei confirmă hipoalbuminemia și scoate în evidență un deficit major al fracțiunii globulinice  $\alpha_1$ .

**Comentariu:** Tabloul clinic și paraclinic sugerează un deficit de  $\alpha_1$  AT, proteină care ocupă în mod fiziologic aproape în totalitate fracțiunea  $\alpha_1$  globulinică a proteinogramei. Diagnosticul de suspiciune este confirmat de testarea imunologică a lipsei proteinei în serul nou-născutului și eventual de diagnosticul molecular, care poate clarifica defectul genetic.

### 6.5.3 REACȚIE DE FAZĂ ACUTĂ

Un tânăr de 20 de ani, accidentat grav în urma unui eveniment rutier, este internat de urgență și se intervine chirurgical pentru o fractură deschisă la nivelul coapsei stângi. La internare în spital pacientul prezenta următoarele rezultate de laborator:

- Ureea – 40 mg/dL
- Creatinina – 1,1 mg/dL
- Proteinele totale – 65 g/L
- Albumina – 36 g/L
- Acidul uric – 5 mg/dL
- CK total – 250 U/L
- VSH – 10 mm / h
- Hemoglobina – 10,2 g /dL.

După 2 zile de la intervenție, starea pacientului s-a deteriorat – acesta prezentând febră severă, frisoane, obnubilare, evoluție crescătoare a concentrațiilor PCR serice și a procalcitoninei, scăderea albuminei și creștere a  $\alpha_1 / \alpha_2$  globulinelor în electroforegrama proteinelor serice.

**Comentariu:** Tabloul clinic și al proteinelor serice sugerează o exacerbare a reacției de fază acută; se suspicionează stare de sepsis, se recoltează hemoculturi și se lărgeste spectrul antibioterapiei.

### 6.5.4 ANEMIE FERIPRIVĂ

Un bărbat de 39 de ani, cu ulcer duodenal în antecedente, se prezintă la consult acuzând vertij, migrene, slăbiciune, dispnee, scaune repetate închise la culoare (melenă), în zilele precedente. Gastroscoopia a evidențiat o nișă duodenală hemoragică. Investigațiile de laborator au dat următoarele rezultate:

- Ureea – 40 mg/dL
- Creatinina – 1,0 mg/dL
- Proteinele totale – 65 g/L
- Glicemia – 86 mg/dL
- Fier – 6  $\mu$ M /L
- Transferina – 4,6 g/L
- VSH – 20 mm/h
- Hemoglobina – 9,6 g/dL

- Hematocrit: 30%
- Numărul de hematii (RBC):  $3,6 \times 10^{12}/L$
- HEM (MCH): 27 pg
- VCM (MCV): 83 fL
- Frotiul periferic: hematii hipocrome, microcitare.

**Comentariu:** Tabloul clinic și paraclinic sugerează o anemie microcitară secundară pierderilor îndelungate la nivel digestiv. Odată cu scăderea sideremiei, apare o creștere marcată a capacității latente de legare a transferinei și mai ales a receptorului solubil al transferinei TfR. Dozarea concomitentă a acestor parametri, precum și a feritinei clarifică gradul deficienței. Starea depozitelor de fier la pacientul în cauză: concentrația serică a feritinei este  $13 \mu g/L$  (valoare normală la femei, mică însă la bărbați).

### 6.5.5 CIROZĂ HEPATICĂ ALCOOLICĂ

O femeie de afaceri de 44 de ani prezintă la un control medical de rutină următoarele rezultate ale testelor de laborator:

- Bilirubina totală –  $1,4 \text{ mg/dL}$
- Bilirubina directă –  $0,4 \text{ mg/dL}$
- Proteinele totale –  $65 \text{ g/L}$
- Albumina –  $33 \text{ g/L}$
- GOT –  $150 \text{ U/L}$
- GPT –  $130 \text{ U/L}$
- Falc –  $350 \text{ U/L}$
- GGT –  $200 \text{ U/L}$ .

**Comentariu:** Având în vedere că persoana se afla în stare de aparentă sănătate, fără antecedente care să explice afectarea hepatică, dar cu teste pozitive de citoliză hepatică și cu relativă colestază (activitate crescută a enzimelor produse de tractul biliar), se recomandă efectuarea testelor serologice virale hepatitice, o proteinogramă și a unui examen ecografic abdominal. Testele virale au ieșit negative, dar ecografia abdominală a evidențiat steatoză hepatică. La electroforeza de proteine serice a fost evidențiată o hiper  $\gamma$  globulinemie și puntea  $\gamma$ - $\beta_2$ , caracteristică pentru ciroza hepatică. În ciuda faptului că persoana neagă consumul de alcool, tabloul paraclinic sugerează o ciroză hepatică pe fondul unui consum cronic de alcool. Puncția biopsie hepatică ar putea clarifica gradul de afectare al parenchimului. Renunțarea la alcool este esențială pentru stoparea procesului.

### Bibliografie recomandată

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – Medical Biochemistry, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.7-34.
2. Bishop M.L., Fody E.P. – Reference values for frequently assayed clinical chemistry analytes. In Clinical Chemistry: Principles procedures, correlations, Ed 5, Philadelphia, 2005, Lippincott, Williams & Wilkins.

3. Bradwell A.R., Mead G.P., Carr-Smith H.D. – Serum Free Light Chain Analysis, Ed. 3, Bradwell, 2005.
4. Campbell P., Smith A.D. – Biochimie ilustrată, Ed. Academiei Române 2004, traducere după - Biochemistry illustrated, Churchill Livingstone - Elsevier Science 2000.
5. Cucuianu M., Crîșnic I., Pleșca-Manea Luminița – Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică, 2003.
6. Fischbach F. – A Manual of Laboratory Diagnostic Tests, Ed. 3, Lippincott Company, 1988.
7. Kaplan L.A., Pesce A.J. – Clinical Chemistry - theory, analysis, correlation, 5th Ed, Mosby, 2010, p 507-527.
8. Laker M.F. – Clinical Biochemistry for Medical Students, W.B.Saunders Company, 1996.
9. Marshall W., Bangert S., Lapsley M. – Clinical Chemistry, Ed.7, Mosby, 2012, p.223-238.
10. Mihele Denisa – Biochimie Clinică. Metode de laborator, Ed. Medicală, 2000.
11. Mody E., Funduc Ileana, Alexandrescu Ruxandra, Dobreanu Minodora – Biochimie Clinică, MedicALL Educational, 2000.
12. Nelson D., Cox M. – Lehninger Principles of Biochemistry, Ed. 4, W.H. Freeman and Company, 2005.
13. Pagana Kathleen, Pagana T. - Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 173-175, 434- 440.
14. Popescu Aurora, Cristea Elena, Zamfirescu-Gheorghiu Marcela – Biochimie medicală, Ed. Medicală, 2000.



# 7

## Metode de separare și caracterizare a proteinelor

Ileana Funduc

### INTRODUCERE

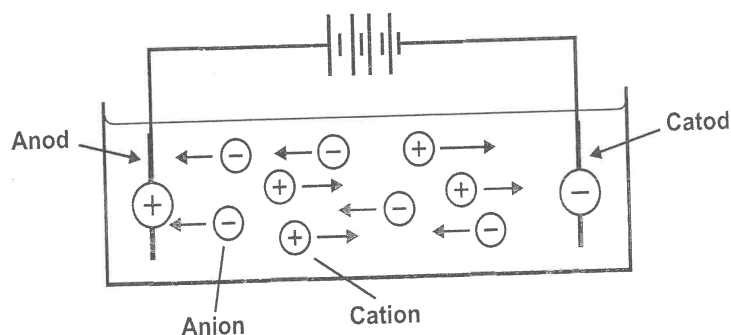
Pentru separarea proteinelor s-au efectuat de mult timp studii, datorită importanței sale și a impactului major pe care îl are asupra sănătății umane. În prezent, tehnologia pentru separările proteinelor își are originile în nanotehnologie și metodele includ determinările imune, electroforeza și cromatografia. O importanță deosebită o are identificarea proteinelor de concentrație scăzută din matrițele biologice complexe.

Separările multidimensionale de proteine trebuie să fie de viteză înaltă și să utilizeze pentru identificare spectrometria de masă. Abordarea prin care metodele de separare se combină între ele (incluzând recunoașterea, electroforeza și cromatografia) se explică prin faptul că numai o singură variantă nu poate caracteriza proteinele dintr-o matriță biologică. Separarea proteinelor reprezintă o arie de dezvoltare tehnologică, iar înțelegerea principiilor separării proteinelor din punct de vedere molecular și a posibilității evidențierii de concentrații foarte mici, vor deschide noi direcții de cercetare.

### 7.1 ELECTROFOREZA

#### 7.1.1 PRINCIPIU

Electroforeza se definește ca migrarea particulelor încărcate electric sub influența unui câmp electric. Metoda permite separarea amestecurilor de proteine, deoarece speciile individuale ale acestora prezintă viteze diferite când sunt supuse acțiunii unui câmp electric, datorită grupărilor încărcate pozitiv și negativ pe care le posedă. Proprietățile proteinelor acide și bazice în soluție apoasă depind de numărul grupărilor acide și bazice libere, de constantele de disociere și de distribuția acestor grupări în moleculă. Cum proteinele se pot comporta ca acizi sau ca baze, în funcție de pH-ul soluției, ele se definesc ca substanțe amfotere. În soluții acide este împiedicată disocierea grupărilor carboxil, astfel încât majoritatea proteinelor rămân încărcate pozitiv (ionii de hidrogen atașându-se grupării amino) și migrează spre catod. În soluțiile bazice protonul grupării - COOH este îndepărtat și cele mai multe proteine rămân încărcate negativ și migrează spre anod (Figura 7.1).



**Figura 7.1** Mișcarea ionilor într- un câmp electric în timpul electroforezei

Pentru a înțelege mecanismul electroforezei trebuie să se cunoască o serie de noțiuni legate de acesta.

Puterea ionică a sistemului tampon depinde de natura chimică a speciilor de ioni implicați.

Sarcina netă a proteinei este determinată de structura ei chimică, numărul grupărilor acide și bazice și de gradul său de disociere. Statusul de ionizare al unei proteine este determinat de constanta de disociere și de pH-ul mediului.

La pH izoelectric ( $p_i$ ) suma algebrică a sarcinilor pozitive și negative ale proteinei este nulă și în consecință ea nu poate migra. Cu cât diferența dintre  $p_i$  a proteinei și a tamponului este mai mare, viteza de migrare este mai mare.

Mobilitatea electroforetică este viteza de migrare a moleculelor sub influența câmpului electric. Identificarea proteinelor se face în funcție de mobilitatea lor electroforetică, care este direct proporțională cu potențialul aplicat, cu distanța dintre electrozi, cu durata electroforezei și invers proporțională cu puterea ionică a tamponului.

Există o serie de forțe care se opun forței de înaintare a proteinei, a căror sumă poartă numele de forță de rezistență. Una dintre cele mai importante este forța de fricțiune. În mediu de gel, aceasta este dependentă de mărimea particulei ce migrează, de mărimea porilor și de densitatea încărcăturii nete de suprafață a matricei de gel.

Soluția tampon este esențială în ceea ce privește transportul curentului și menținerea pH-ului în sistemul electroforetic. Tamponul are o mare influență asupra migrării proteinelor, pH-ul său influențând încărcătura proteinei și deci direcția și viteza migrării sale. Puterea ionică a tamponului influențează proporția curentului transportat de către proteină. La putere ionică mică, proteina va transporta o proporție relativ mare de curent și va avea o migrare relativ rapidă. La putere ionică mare, cea mai mare parte de curent va fi transportat de ionii de tampon și proteina va migra relativ lent. Deci se preferă o putere ionică scăzută, deoarece va crește viteza de migrare a proteinei și se generează o căldură mai mică. De fapt nu puterea ionică este factorul important în electroforeză, ci mobilitatea ionilor de tampon.

Ionii tamponului pot fi atrași electrostatic de ionii solviți și pot forma un nor de contraioni în jurul acestora. Acest nor reduce încărcătura ionilor de solviți și este atras electrostatic de electrodul opus, comparativ cu cel al moleculelor solvitului. Ionii de tampon pătrund continuu și părăsesc regiunea imediată din jurul ionilor de solviți, fenomen numit efect de relaxare.

**Endosmoză sau electroendosmoză.** Unele medii suport folosite în electroforeză conțin grupări ce sunt ionizabile la pH-ul mediului. Astfel, suporturile statice, mediile (de gel) și/sau echipamentul de suprafață al separării (plăci de sticlă, tuburi sau capilare) pot transporta grupări încărcate electric (grupări carboxilice în amidon și agaroză, grupări sulfonice în agaroză, oxid de siliciu în suprafețele de sticlă). Ele se ionizează sub influența tamponelor acide sau bazice, dobândesc în timpul electroforezei o încărcătură negativă netă și sunt atrase spre anod, dar fiind fixate în matriță, ele nu pot migra. Aceasta determină o compensare a contrafluxului de ioni de hidroniu  $H_3O^+$  care se deplasează spre catod. În geluri, acest efect se observă ca un flux de apă spre catod, care transportă cu el substanțele solubilizate. Fracțiunile rezultate sunt estompate, iar în aria anodală se produce uscarea gelului. Aceasta cauzează deplasarea spre catod a moleculelor neutre electric din probă, efect cunoscut sub numele de "endosmoză" sau electroendosmoză" în electroforeza pe gel și "flux electroosmotic" în electroforeza capilară.

**Temperatura.** Prin trecerea curentului electric printr-un conductor, temperatura sistemului electroforetic tinde să crească și aceasta poate cauza:

- creșterea adsorbției solviților și creșterea puterii ionice a soluției tampon datorită evaporării sale;
- scăderea vâscozității ce poate duce la creșterea difuziei și la reducerea puterii de rezoluție a fracțiunilor separate;
- evaporarea componentelor volatili, care poate duce la tulburarea omogenității câmpului electric.

De aceea este eficientă folosirea unui sistem de răcire cuplat cu un curent scăzut, pentru a preveni creșterea temperaturii în timpul migrării.

Suportul electroforetic trebuie să fie ieftin, stabil, netoxic, rezistent la umezeală și uscare, uniform poros și să facă legătura dintre mărimea proteinei și mobilitatea sa.

Suportul electroforetic poate fi: hârtia (care se folosește rar), acetatul de celuloză, amidonul, agaroza, poliacrilamida. Diametrul porilor trebuie să fie mai mare comparativ cu cel al proteinei, interacțiunea cu proteina să fie minimă, iar fenomenul de endosmoză să fie minim. Dacă mărimea porilor este egalabilă cu cea a proteinei, separarea se face prin fenomenul de sitare : moleculele mici au o viteză de migrare mai mare față de moleculele mari și se vor separa mai rapid (cazul poliacrilamidei).

Acetatul de celuloză este un derivat granulat mai fin decât celuloza, format prin esterificarea unei proporții de grupări hidroxil libere ale celulozei. Acest suport separă benzi proteinice nete, cu o rezoluție superioară hârtiei, reacționează puțin cu proteinele și prezintă o endosmoză redusă.

Gelul de amidon este nebiodegradabil, netoxic și are o structură microreticulară, datorită căreia permite fenomenul de sitare a gelului, care a revoluționat tehnica electroforetică, prin creșterea semnificativă a rezoluției și a sensibilității sale. Un dezavantaj al amidonului este variabilitatea sa, datorită faptului că este un produs natural.

Agaroza este un gel de agar ce conține două polizaharide rezultate din galactoză. Acest suport reprezintă o agarobioză cu urme de sulfat, care se gelifică în prealabil prin legături

de hidrogen. Agaroză are o structură macroreticulară care nu împiedică migrarea electroforetică a moleculelor sub 500 kDa și poate fi obținută într-o formă în care electroendosmoza să fie nulă.

Poliacrilamida este un polimer sintetic de înaltă reproductibilitate, la care se poate adapta mărimea porilor la mărimea proteinei ce se separă. Din această cauză, acest polimer este foarte utilizat.

### 7.1.2 ETAPELE ELECTROFOREZEI

- Aplicarea probei pe suport
- Migrarea sub voltajul și amperajul stabilit, care creează câmpul electric
- Fixarea fracțiunilor în gel pentru a preveni difuzia fracțiunilor se realizează cu o soluție de fixare formată din acid tricloracetic, acid acetic, solvenți organici. Electroforeza capilară nu necesită fixare
- Colorarea cu Amido Black 10B, Coomassie Brilliant Blue R 250 sau Violet
- Aur coloidal, Argint amoniacal, acid - Fast Green, acid periodic – Schiff (PAS), Xilen-G, după care urmează îndepărrarea surplusului de colorant
- Determinarea calitativă și cantitativă prin examinare vizuală, densitometrie optică în ultraviolet. Rezultatul evaluării este dependent de concentrația proteinelor, de temperatură, timp de colorare, caracteristicile colorantului folosit și afinitatea diferită pentru diverse fracțiuni proteice.

### 7.1.3 CLASIFICAREA METODELOR ELECTROFORETICE

Separarea electroforetică se bazează pe 3 variabile importante:

- încărcătura electrică netă;
- masă moleculară;
- pH izoelectric ( $p_i$ ).

În funcție de aceste variabile există trei variante principale de electroforeză:

**1. Electroforeză zonală** pe acetat de celuloză sau agaroză, prin care separarea are loc pe baza încărcăturii electrice nete și secundar în raport cu mărimea moleculară. Proteinele, transportând o încărcătură netă (datorită ionilor amino și carboxil) la un pH diferit de  $p_i$ , vor migra cu o viteză proporțională cu densitatea lor. În cazul suporturilor relativ inerte, separarea proteinelor se bazează pe densitatea încărcăturii lor, corespunzătoare pH-ului selectat. Deci în acest caz, pH-ul este constant și creează o densitate de încărcătură la suprafața moleculei, care conduce la o migrare cu o mobilitate constantă.

**2. Electroforeza în poliacrilamidă (PAGE).** Prepararea probei implică dizolvarea sa înaintea electroforezei într-un tampon, care conține în mod obișnuit un agent reducător (cum ar fi 2-mercaptoetanolul). Fixarea se efectuează prin denaturare sau se realizează, pentru a preveni difuzia fracțiunilor, atunci când rezoluția este redusă. Pentru a obține date cantitative cât mai fidele, se recomandă includerea unor probe de referință, care să migreze concomitent cu probele.

Adăugarea la tampon a sodiu-dodecilsulfatului (SDS) a condus la variante de electroforeză **SDS-PAGE** în care se elimină esențial diferențele dintre încărcăturile electrice și separarea se face exclusiv pe baza masei moleculare.

Sodiu dodecilsulfatul (SDS) este un detergent anionic care permite denaturarea proteinelor până la structura lor primară lineară, separarea făcându-se prin cernere. Cum diferențele intrinseci de sarcină între proteine sunt mascate de SDS, separarea proteinelor se datorează diferențelor lor de mărime și deci metoda se poate folosi și pentru determinarea masei moleculare.

**3. Electroforeza cu focalizare izoelectrică** permite separarea componentelor pe baza punctului izoelectric al fiecărei proteine, aceasta putându-se realiza prin crearea unui gradient de pH al mediului.

Proteinele sunt amfoliți cu o încărcătură netă dependentă de pH, pozitivă la pH-ul inferior punctului izoelectric și negativă la un pH superior. În această variantă de separare, proteinele se distribuie într-o soluție cu gradient de pH, se aplică un potențial electric de-a lungul gradientului, anodul fiind situat la capătul în care pH-ul este de valoare mică (Figura 7.2).

Moleculele din zona cu pH scăzut (încărcate pozitiv) vor migra spre catod. Mișcarea lor va traversa zonele de pH cu valori ridicate și ca o consecință vor pierde gradat sarcina lor pozitivă, iar viteza lor de migrare va scădea. Invers, moleculele din zona cu pH crescut (încărcate negativ) vor migra prin zona de descreștere a pH-ului spre anod. Când fiecare proteină va ajunge într-o poziție unde pH-ul va egala punctul său izoelectric, își va pierde sarcina și migrarea va fi nulă: moleculele se vor "focaliza" la punctul izoelectric propriu. Amestecul se va separa complet când fiecare component va ajunge la punctul său izoelectric, iar valorile punctelor izoelectrice se vor putea măsura. Rezultatul focalizării izoelectrice constă în concentrarea proteinelor în raport cu punctele lor izoelectrice și în posibilitatea separării compușilor cu diferențe foarte mici de încărcătură.

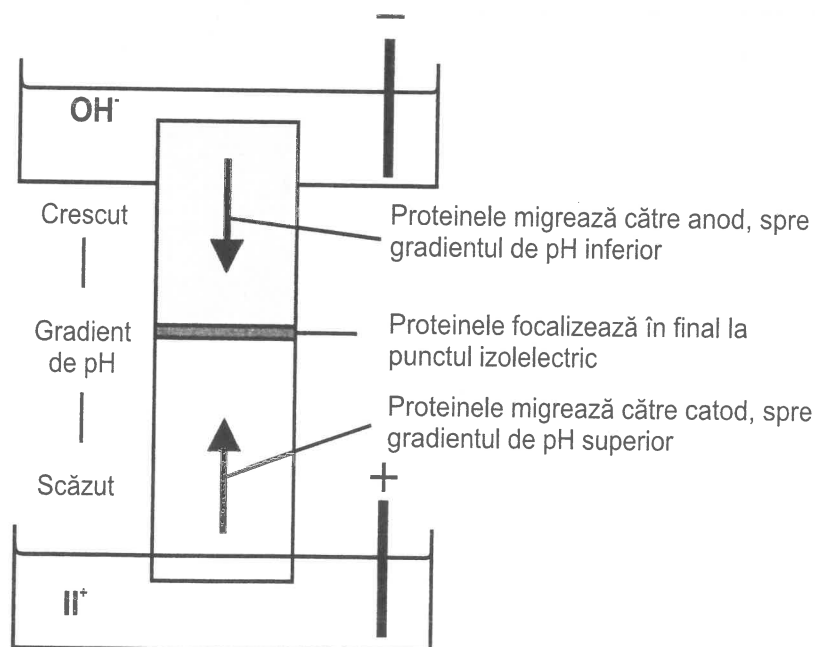


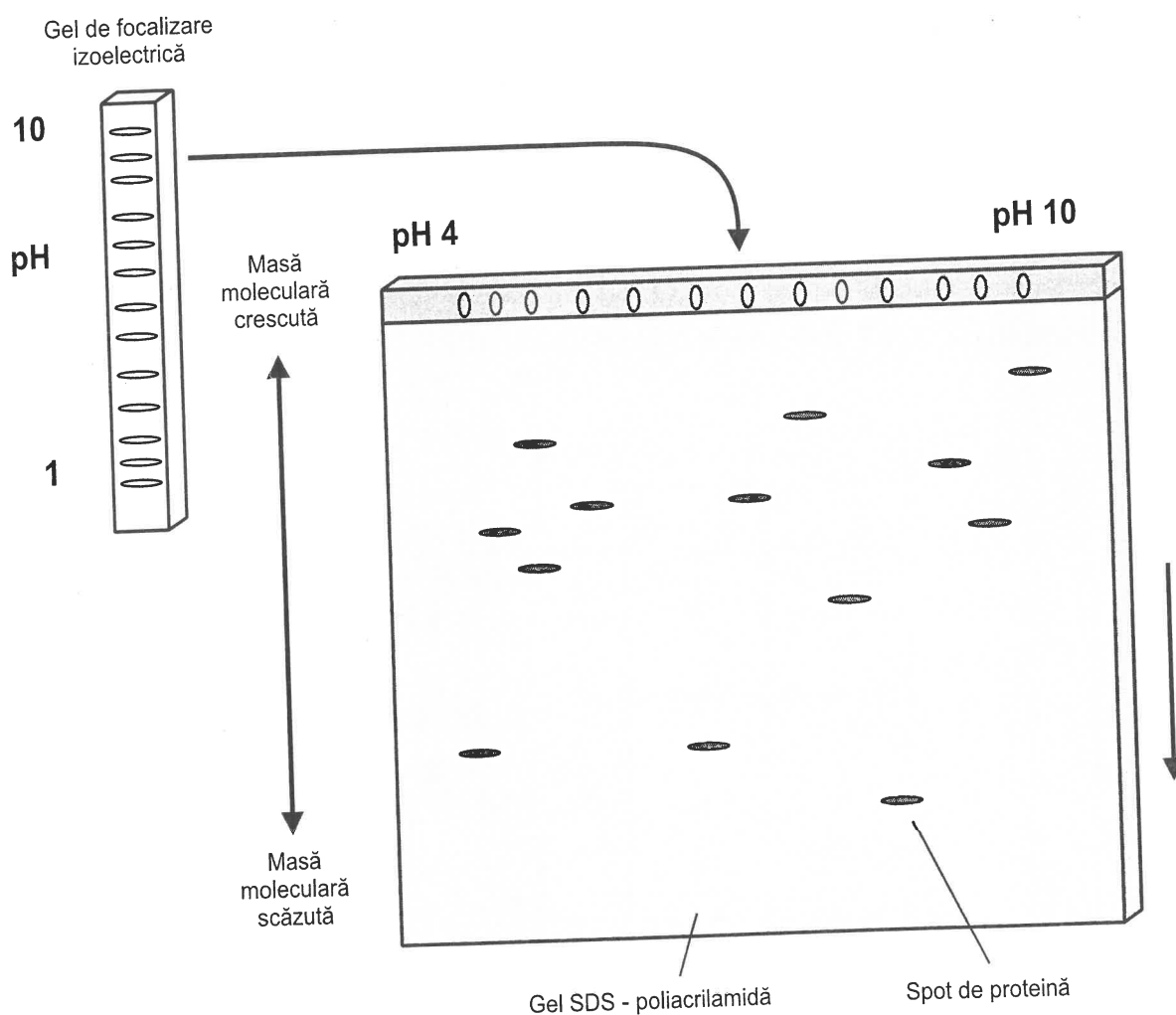
Figura 7.2 Schema migrării în electroforeza cu focalizare izoelectrică

Gradientul de pH se realizează cu amfoliți purtători, (molecule mici amfotere), cu o capacitate crescută de tamponare în jurul punctelor lor izoelectrice. La aplicarea voltajului, amfoliții cu punctul izoelectric scăzut și cu mai multe sarcini negative vor migra spre anod, iar ceilalți spre catod. Cei cu valori între extremele punctelor izoelectrice vor tampona mediul la un pH corespunzător, în așa fel încât să se creeze un gradient continuu de pH.

Electroforeza cu focalizare izoelectrică are un principiu de operare care anulează efectele difuziei, care în alte variante răspund de lărgirea benzilor. Orice proteină care va difuza în afara benzii focalizate intră într-o regiune cu un pH diferit, care îi va da o încărcătură, iar o forță electroforetică va tinde să o aducă înapoi în banda focalizată.

**Electroforeza bidimensională** (Figura 7.3) este o tehnică hibridă în care se cuplează două modalități de separare, al căror sens de migrare sunt perpendiculare una față de cealaltă. În prima dimensiune proteinele se separă în raport cu punctele lor izoelectrice folosind electroforeza cu focalizare izoelectrică, iar în cea de a doua în raport cu masele lor moleculare, folosind electroforeza în poliacrilamidă cu sodiu dodecilsulfat. După colorare, rezultatul apare sub forma unui număr de spoturi distribuite bidimensional.

Detectarea se efectuează prin colorare, radiomarcare și identificarea prin spectrometrie de masă și analiză computerizată. Mii de proteine se pot separa pe un singur gel, reprezen-



**Figura 7.3** Schema migrării în electroforeza bidimensională

tând o mare parte a proteinelor dintr-o probă. Comparând imaginile de pe gelurile diferitelor probe, se pot găsi și apoi identifica proteine care pot fi cruciale în procesele fundamentale ale vieții și în evoluția bolilor. Electroforeza bidimensională dă informații pe care separările pe coloană nu le pot oferi: masă moleculară,  $p_i$ , izoforme ale proteinei intacte.

**Electroforeza capilară** este o variantă de electroforeză introdusă recent – metodă care îmbină mecanismele de separare ale electroforezei, cu concepțiile de instrumentar și automatizare ale cromatografiei. În acest sens, această metodă este superioară prin următoarele:

- este automatizată, rapidă și versatilă;
- utilizează cantități minime de probă
- este cantitativă, detectând limitele cele mai joase din domeniul cercetării (celulă, moleculă).

Aparatura (Figura 7.4) constă din capilare din silicagel căptușite cu poliamidă (diametrul 25-75  $\mu\text{m}$ ) care pot transmite lumina UV. Capilarele au rezistență la voltaj crescut (10-30 kV) și la câmpuri electrice de intensitate ridicate (100 – 500  $\text{Vcm}^{-1}$ ). Temperatura trebuie menținută constantă în timpul migrării pentru a asigura precizie și reproductibilitate. Câmpul electric crescut reduce considerabil timpul de analiză, fără a compromite eficiența și corectitudinea separării.

Suprafețele de silicagel conțin grupări silanol încărcate negativ la un pH peste 3,5 care determină fenomenul de electroendosmoză. La pH scăzut, electroendosmoza este suprimată prin reducerea sarcinilor negative ale grupărilor silanol.

Capilarul umplut cu tampon care conduce curentul are capetele introduse în rezervoarele de tampon. Electrozii formați din material inert (Pt) sunt introduși în tampon pentru a completa circuitul electric. Capilarul trece intermediar printr-o instalație optică a unui detector, un dispozitiv de introducere a probei și o sursă de înalt voltaj.

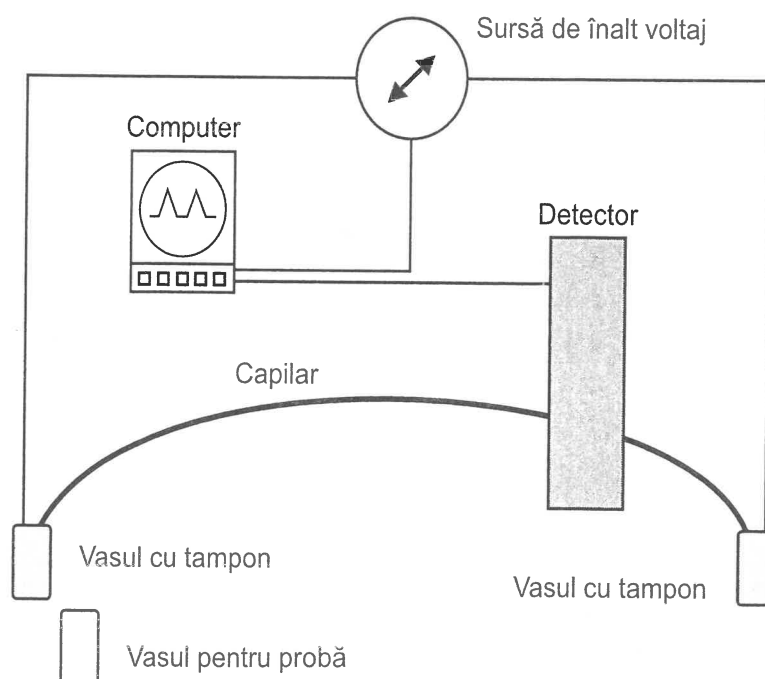


Figura 7.4 Schema unei instalații de electroforeză capilară

Se injectează proba la unul din capetele capilarului, se aplică voltajul, ionii probei se deplasează spre electrodul corespunzător trecând prin detector, care răspunde cu o înregistrare a componentilor separați în timp, respectiv cu o electroforegramă. Detectarea se efectuează prin absorbție în UV.

Electroforeza capilară poate fi zonală, în gel (când implică un efect de sitare moleculară), cu focalizare izoelectrică etc. Această metodă emite rezultatele unul câte unul, spre deosebire de celelalte variante electroforetice, dar acest impediment se compensează cu timpii scurți de separare.

#### 7.1.4 INTERPRETAREA ANOMALIILOR MAJORE OBSERVATE LA ELECTROFOREZA PROTEINELOR SERICE

Proteinele serice sunt compuse din albumine și globuline. Cele mai multe molecule de globuline sunt mult mai mari ca albumina, deși cantitatea totală de albumină în ser este în mod normal similară sau ușor mai mare decât nivelul globulinelor. Albumina este importantă în menținerea presiunii oncotice serice și acționează ca o proteină de transport pentru unele medicamente și multe alte substanțe. Globulinele au atribuții mult mai variate decât albuminele: transportă substanțe, formează sistemul de anticorpi, sistemul proteinelor de coagulare, al complementului și al proteinelor de fază acută (vezi Capitolul 6.4.6).

Electroforeza, care separă moleculele pe baza încărcăturii electrice a anumitor configurații atomice structurale, este capabilă să subdividă globulinele doar în fracțiuni, nu în proteine individuale. Nomenclatura proteinelor serice derivă din fracțiunile electroforetice a globulinelor serice, anume  $\alpha$  ( $\alpha_1$  și  $\alpha_2$ ),  $\beta$  ( $\beta_1$  și  $\beta_2$ ) și  $\gamma$ , corespunzător mobilității electroforetice (Figura 7.5).

Electroforeza rămâne testul de screening cel mai mult folosit pentru detectarea anomaliilor proteinelor serice.

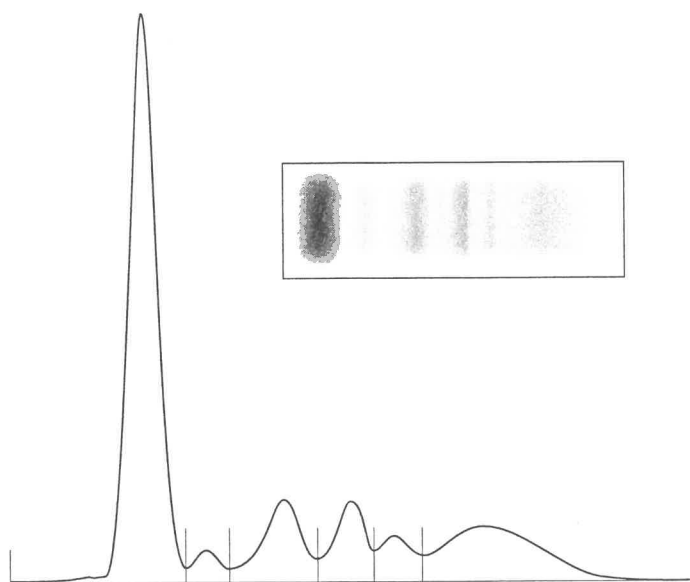


Figura 7.5 Electroforeza proteinelor serului uman normal

### 7.1.4.1 Modificări ale fracțiunii albuminice

Bisalbuminemia (prezența de bandare dublă) (Figura 7.6) permanentă sau tranzitorie.

Bisalbuminemia poate fi:

- Ereditară, când bandarea dublă este semnul unei variante genetice fără vreun efect patologic.
- Dobândită, fie prin fixarea pe albumină în cantitate mare a antibioticelor utilizate în tratarea insuficienței renale, fie în fistule pancreatice prin liza albuminei de către enzimele pancreatice.

Absența aproape completă a benzii: analbuminemie congenitală (Figura 7.7), când apar edeme discrete.

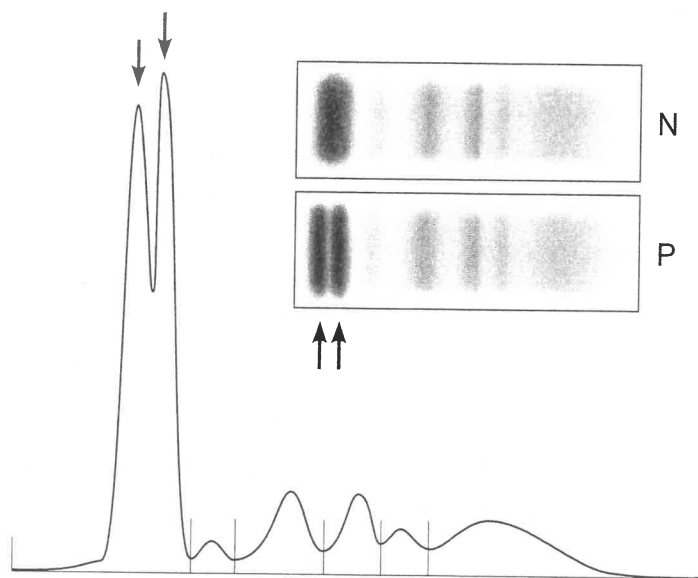


Figura 7.6 Bisalbuminemia

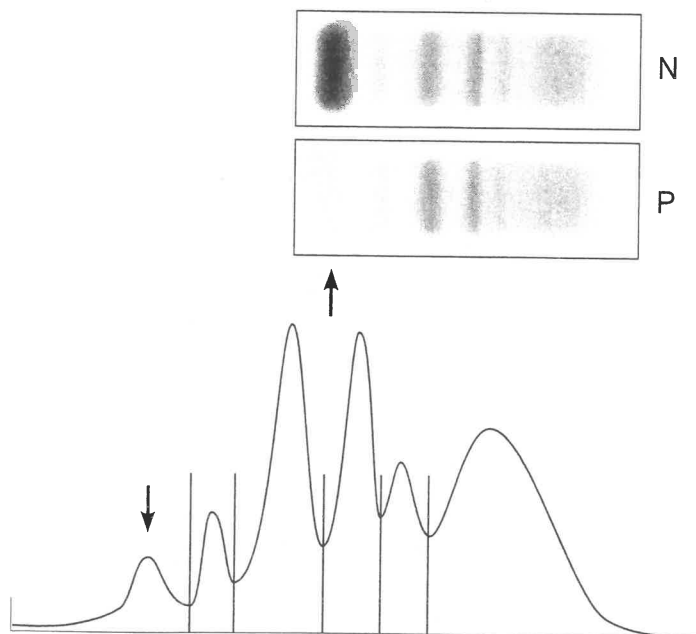


Figura 7.7 Analbuminemie congenitală

Hipoalbuminemie de origine hepatică în:

- deficiență nutrițională;
- descreșterea vitezei de sinteză: insuficiență hepatocelulară, inflamație;
- pierdere urinară, digestivă, cutanată;
- hipercatabolism: tulburări endocrine dobândite, sindroame inflamatorii acute.

Hiperalbuminemie fără importanță patologică care se poate observa în cazul hemoconcentrației sau în cazul perfuziilor cu albumină.

#### 7.1.4.2 Modificări ale zonei $\alpha_1$ globulinei

Descreșteri în:

- insuficiență hepatocelulară, malnutriție sau pierdere de proteine, de obicei cu descreștere de albumină,  $\alpha_2$  și  $\beta$  globuline;
- deficiență congenitală de  $\alpha_1$ -antitripsină (Figura 7.8).

Creșteri în tulburări inflamatorii asociate cu creșterea  $\alpha_2$  globulinei datorită localizării proteinelor de fază acută (orosomucoid și  $\alpha_1$  antitripsină) din zona  $\alpha_1$  și a haptoglobinei din zona  $\alpha_2$  globulinelor. Această patologie reflectată prin migrarea electroforetică poartă numele de "sindromul inflamator acut" (Figura. 7.9).

#### 7.1.4.3 Modificări ale zonei $\alpha_2$ globulinelor

Duble bandări în cazurile:

- Hemoliza serului (Figura 7.10)
- Prezența fenotipurilor de haptoglobină ce prezintă o mobilitate electroforetică diferită față de a haptoglobinei obișnuite. Aceste fenotipuri, însă nu indică o stare patologică.
- Prezența  $\beta$  lipoproteinei cu o mobilitate electroforetică  $\alpha_2$  anormală.
- Prezența unui component monoclonal (sau lanț ușor liber).

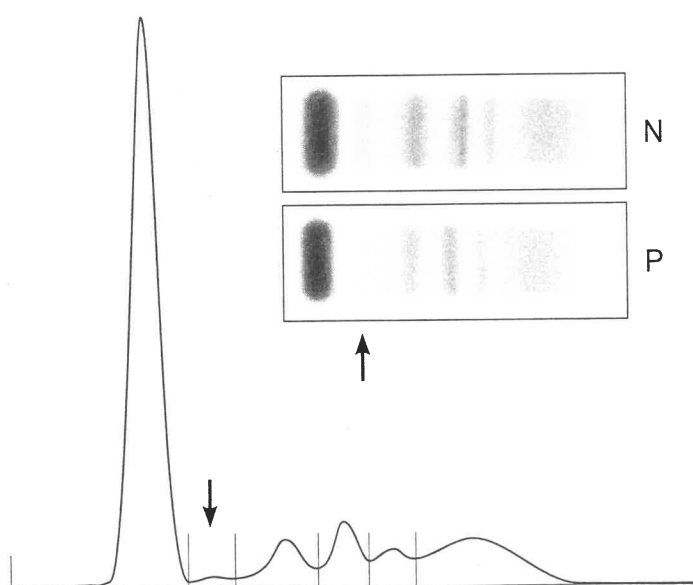


Figura 7.8 Deficiență congenitală de  $\alpha_1$  - antitripsină

Descreșteri apar în:

- Insuficiență hepatocelulară, malnutriție sau pierdere de proteine.
- Hemoliză intravasculară.

Creșteri în:

- Sindrom inflamator asociat cu hiper  $\alpha_1$ .
- Sindrom nefrotic (Figura 7.11) asociat cu creșterea  $\alpha_2$  și cu hipoalbuminemie (prin pierdere de urină), hiper  $\beta$  și hiper proteinurie.

#### 7.1.4.4 Modificări ale zonei $\beta$

Descreșteri:

- Induse de insuficiența hepatocelulară, malnutriție sau pierderea de proteine legate de o descreștere a transferinei care migrează în zona  $\beta_1$ .

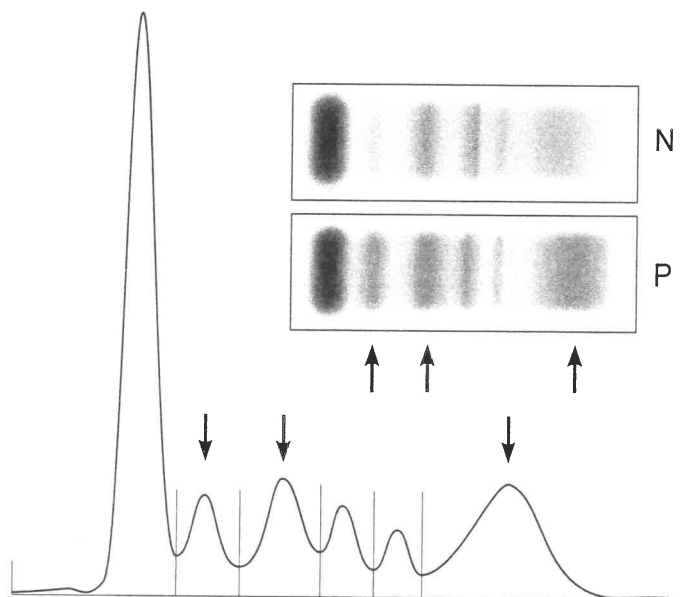


Figura 7.9 Sindromul inflamator acut

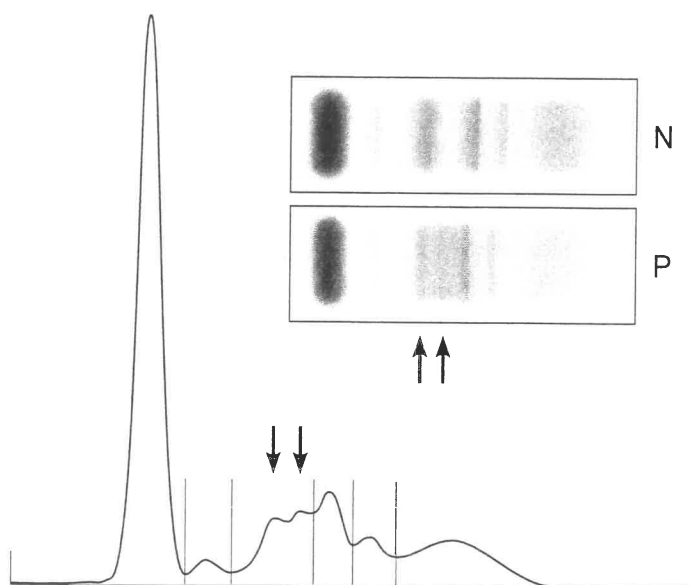


Figura 7.10 Dublă bandare a zonei  $\alpha_2$  prin hemoliză

- b. Hipocomplementemie indusă de consumul C3 asociată cu o descreștere a  $\beta_2$ ; dispariția fracțiunii  $\beta_2$  este legată de "vârsta" serului care nu a fost supus imediat electroforezei. Creșteri se pot întâlni:
- Hipertransferinemia (Figura 7.12) în anemie sau prin creșterea  $\beta$  lipoproteinelor. Plasma conține fibrinogen pe lângă proteinele serice obișnuite, fibrinogenul fiind o beta globulină. Se va evita electroforeza proteinelor din plasmă pentru a elimina potențiala confuzie cu gradientele monoclonale localizate în zona beta.
  - Hiper  $\beta_2$  prin hiper  $C_3$ : în sindromul inflamator sau hiper  $\beta_2$  datorită obstrucției intra- sau extrahepatice.

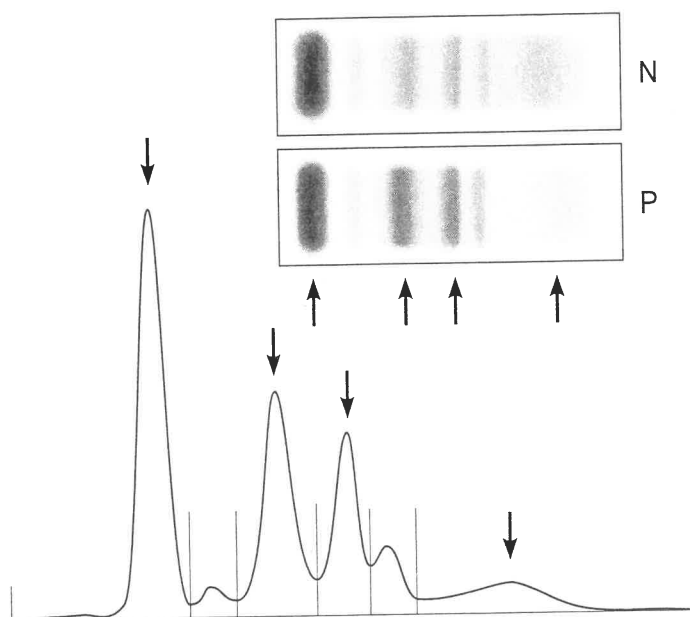


Figura 7.11 Sindrom nefrotic

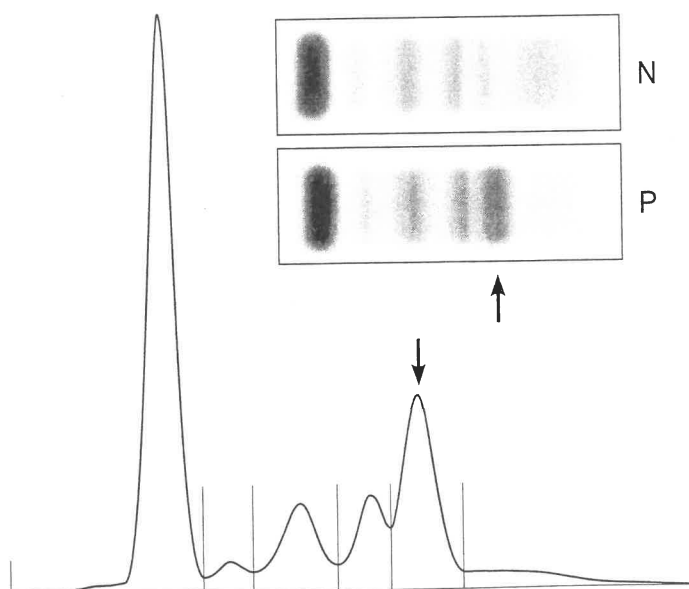


Figura 7.12 Hipertransferinemia în anemie - intensificarea zonei  $\beta$

- c.  $\beta$  crescut sau pod  $\beta - \gamma$  în ciroza alcoolică (Figura 7.13).
- d. Proteine monoclonale: IgA (Figura 7.14), IgG în mielom, IgM în boala Waldenström, sau lanțuri ușoare libere (Figura 7.15), în mielom Bence Jones (boala lanțurilor ușoare) sau amiloidoză.

#### 7.1.4.5 Modificări în zona $\gamma$

Hipo- $\gamma$  globulinemie (Figura 7.16) ce se întâlnește :

- a. La nou-născuți
- b. Imunodeficiență izolată sau totală primară (implicând toate cele trei clase de imunoglobuline) la copii sau la adulți.
- c. Secundară datorită corticosteroizilor, tratamentului cu imunosupresoare, chimioterapie sau radioterapie.

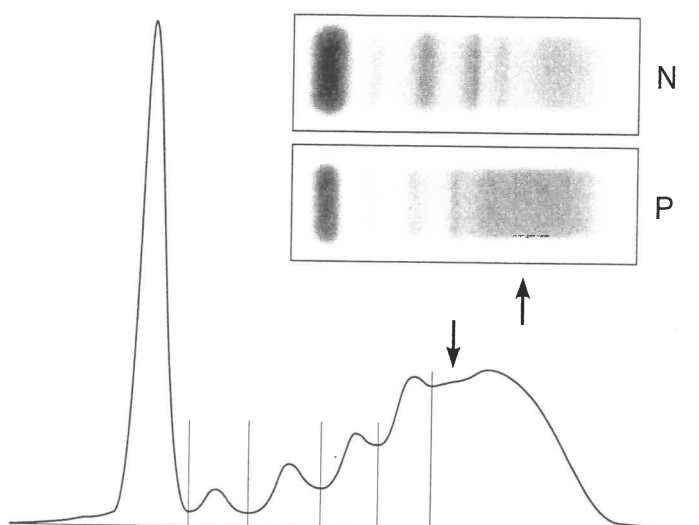


Figura 7.13 Pod  $\beta - \gamma$  în ciroza alcoolică

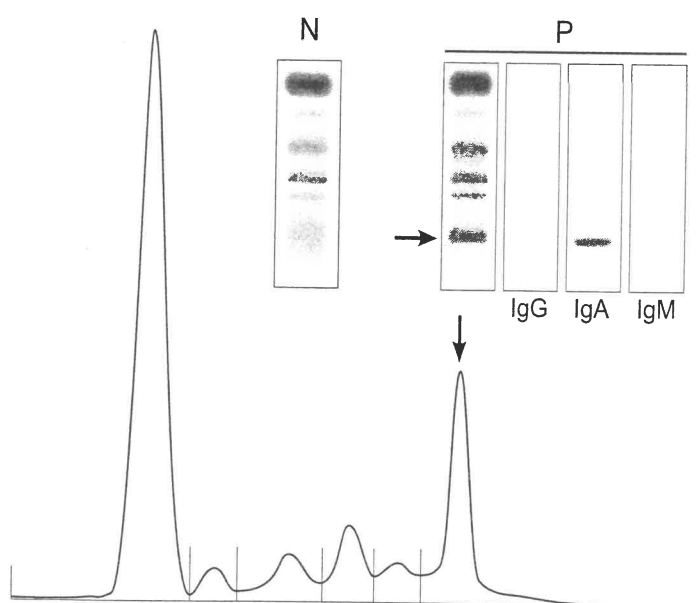


Figura 7.14 Proteina IgA monoclonală

d. Mielom multiplu - prezența proteinei Bence Jones în urină

Hiper- $\gamma$  globulinemie poate fi:

- Policlonală (Figura 7.17) în infecții hepatice, HIV sau boli autoimune
  - Monoclonală (bandare îngustă și omogenă) în mielom sau boală Waldenström, asocierea cu leucemie limfatică cronică, limfom sau gamopatie benignă la bătrâni. La o bandare îngustă monoclonală din zona  $\gamma$  trebuie eliminată posibilitatea prezenței de fibrinogen rămas, care dispare după tratarea cu trombină (ce transformă fibrinogenul solubil în fibrină insolubilă).
- d. Hiper- $\gamma$  globulinemie oligoclonală (Figura 7.18) (bandări înguste și omogene).

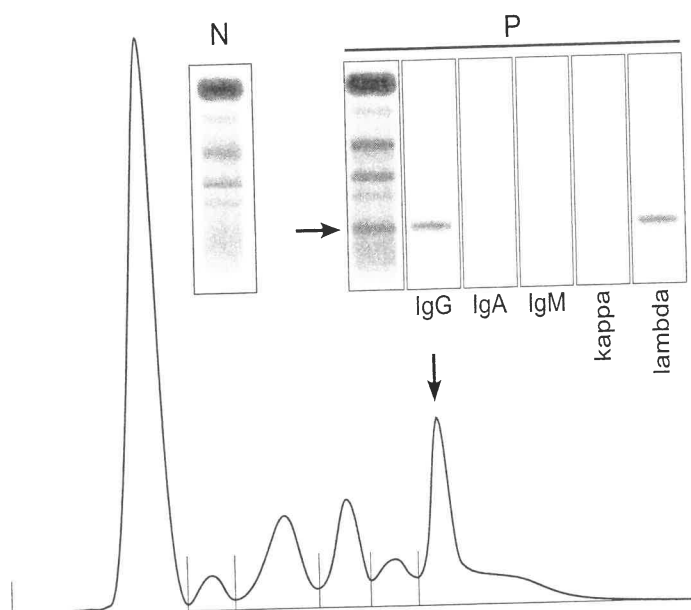


Figura 7.15 Boala lanțurilor ușoare

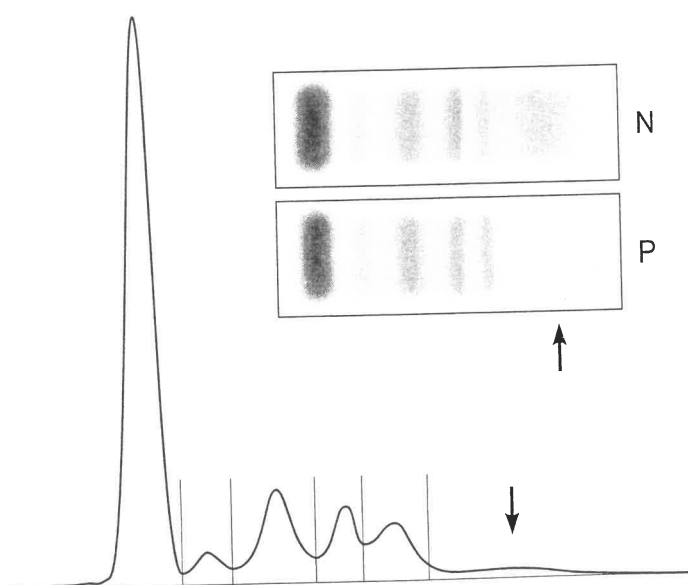


Figura 7.16 Hipo- $\gamma$  globulinemie

Aceste fracțiuni monoclonale, care de obicei sunt în concentrație redusă și tranzitorii pot corespunde:

- autoanticorpilor existenți în bolile autoimune ca artrite reumatoide, sindrom Sjögren, lupus eritematos, scleroză sistemică progresivă;
- anticorpilor activi față de proteinele virale: indivizi seropozitivi HIV, hepatite virale, meningite, infecții cu virus citomegalic;
- răspunsurilor autoimune la pacienți transplantați sub terapie imunosupresoare;
- răspunsurilor imune la subiecți sănătoși, fără nici o valoare.

Electroforeza proteinelor serice poate prezenta unele limite datorate tipului de electroforeză folosit, a pregătirii preanalitice incorecte a probei supuse separării sau a prezenței diverșilor componenți din amestecul de separat.

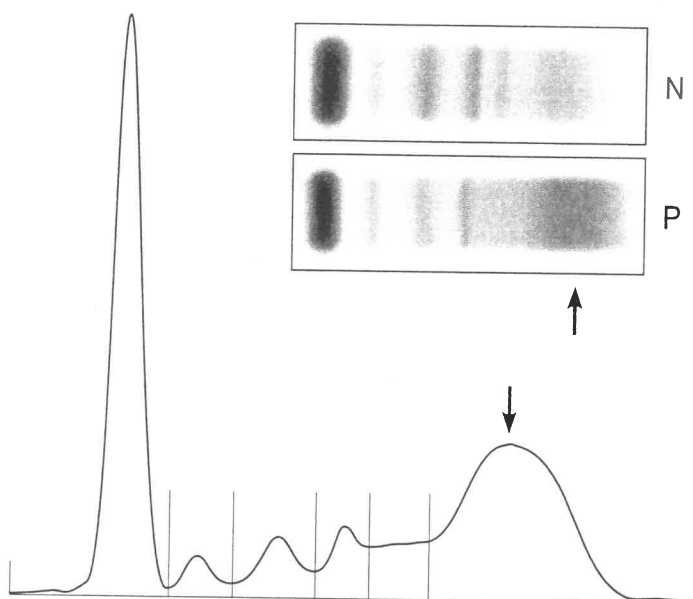


Figura 7.17 Hiper- $\gamma$  globulinemie

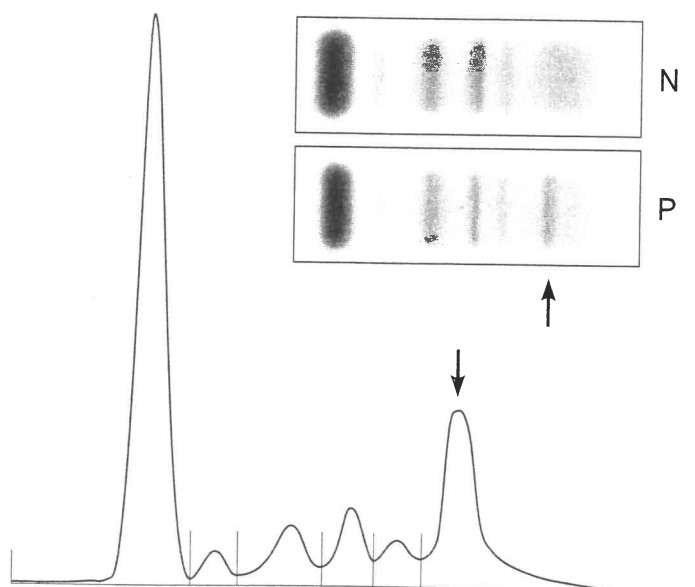


Figura 7.18 Hiper- $\gamma$  globulinemie oligoclonală

Componentul monoclonal poate fi omis în următoarele situații (rezultate fals negative):

- comigrarea cu o altă fracțiune proteică;
- includerea într-o crioglobulină sau în cheagul de fibrină și pierderea prin centrifugare
- polimerizarea în complexe mari (lanț greu  $\alpha$  în boala lanțurilor grele) și vizualizare sub forma unei pete difuze, diferite de o bandă îngustă bine delimitată.

Componentul monoclonal poate fi mimat cu o bandă care nu are nimic comun cu un component monoclonal în situațiile următoare (rezultate fals pozitive):

- prezența în concentrații crescute a proteinei C reactive situată la extrema catodică a zonei  $\gamma$ , atunci când se folosesc tamponi ce conțin  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- prezența în cazul unei coagulări incomplete sau anormale a fibrinogenului în zona anodală  $\gamma$ ;
- contaminarea bacteriană a probelor sau înghețarea și dezghețarea repetată, care pot conduce la apariția fragmentelor IgG Fc ce dau bandări în zona  $\gamma$ ;
- prezența complexelor imune ce se vizualizează prin una sau mai multe bandări (IgM monoclonal factor reumatoid complexat cu IgG policlonal – crioglobuline de tip II);
- prezența de proteine ne - imunoglobulinice (transferină, factorul 3 al complementului).

## 7.2 CROMATOGRAFIA

### 7.2.1 PRINCIPIU

Cromatografia este metoda prin care componenții chimici prezenți în amestecuri complexe sunt separați, identificați și determinați. Această metodă constituie cea mai importantă modalitate de separare a biomoleculelor. Clasic, cromatografia este tehnica prin care componenții unui amestec sunt separați pe baza vitezelor cu care sunt transportați sau deplasați spre o fază staționară (lichidă sau solidă) de către o fază mobilă (lichid sau gaz) (Figura 7.19).

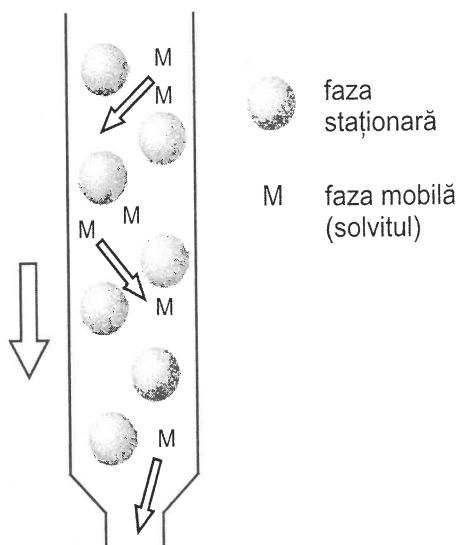


Figura 7.19 Evoluția unei cromatografii pe coloană

Presupunem că avem un amestec de doi componenți A și B incluși într-o soluție tampon.

Coloana este umplută cu o substanță insolubilă, la care se vor lega diferențiat și reversibil de componenții amestecului A și B. Inițial, coloana se echilibrează prin trecerea unui volum de tampon, iar amestecul de separat se aplică la partea superioară a coloanei sub forma unui strat îngust. Stratul de solviți va trece prin coloană și se vor spăla pe măsură ce se introduce tamponul de soluție. Acest proces se numește eluție și soluția culeasă la baza coloanei este eluatul. Așa cum se vede și din Figura 7.20, componentul B este mai strâns legat de matriță decât A. Astfel, când amestecul va parcurge coloana, moleculele componentului B vor fi mai întârziate față de moleculele componentului A. În timp, ele se vor separa sub formă de benzi și se vor elua la timpi diferiți (Figura 7.20).

### 7.2.2 ETAPELE CROMATOGRAFIEI

O separare cromatografică implică următoarele etape:

- Injectarea sau aplicarea analitului în faza mobilă, lichidul purtător sau pe suport.
- Separarea analitului în componenții săi, în măsura în care faza mobilă pătrunde în faza staționară, în funcție de diversele grade cu care componenții sunt atrași de faza staționară.
- Eluția componenților la diverși timpi, când componentul cel mai puțin legat de faza staționară se separă primul.
- Detectarea, în care componenții sunt analizați prin măsurarea unor proprietăți ale lor (de ex. indicele de refracție, absorbantă în UV etc).
- Finalizarea analizei cromatografice printr-o cromatogramă, care apare ca o reprezentare grafică, în care componenții separați se vizualizează sub formă de fracțiuni.

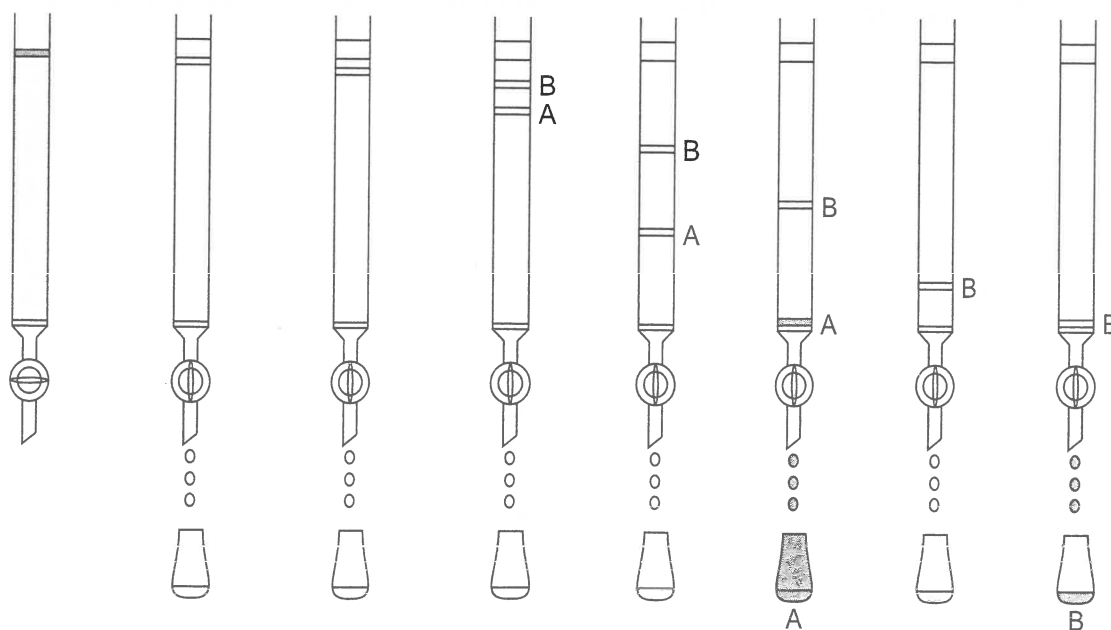


Figura 7.20 Schema separării cromatografice pe coloană

Mișcarea moleculelor este determinată de balanța dintre două forțe:

- forța de împingere a fazei mobile care transportă cu ea moleculele pentru care are afinitatea favorizată de solubilitate sau volatilitate;
- forța de frânare a fazei staționare care se opune și menține moleculele cu care interacționează.

Echilibrul între forțe este diferit pentru diversele molecule, aceasta conducând la mobilități diferite, deci la separarea componentelor.

### 7.2.3 CLASIFICAREA METODELOR CROMATOGRAFICE

În funcție de plasarea fazei staționare pe un suport, metodele cromatografice se clasifică în două mari categorii:

- Cromatografia pe coloană
- Cromatografia planară

#### 7.2.3.1 Lichid cromatografia / lichid cromatografia de înaltă performanță (HPLC)

La început, lichid cromatografia se efectua în coloane de sticlă cu diametre mari, la fel erau și diametrele particulelor fazei staționare (150 - 200  $\mu$ ). Timpul de eluție a fazei mobile ce conținea analitul era lent, iar timpii de separare deseori atingeau câteva ore. Introducându-se tehnologia modernă, diametrele particulelor fazei solide s-au redus la 10  $\mu$ , iar coloanele de sticlă au fost înlocuite cu cele de oțel. Viteza de curgere a fazei mobile s-a îmbunătățit, aplicându-se coloanei presiune înaltă, ceea ce a dus la creșterea semnificativă a performanței analizei. Această nouă formă a tehnologiei de separare a luat numele de cromatografie de înaltă performanță în lichid.

După natura proceselor care au loc în coloană, metoda de cromatografie lichidă de înaltă performanță se împarte în 5 categorii :

- 1. Cromatografia de adsorbție de înaltă performanță** în care analitul este adsorbit pe suprafața unei faze solide polare. Natura adsorbției implică interacția moleculelor polare cu faza staționară solidă polară.
- 2. Cromatografia de repartitie de înaltă performanță** în care analitul se distribuie (sau se repartizează) între faza mobilă și faza staționară, în măsura în care faza mobilă se deplasează prin coloană (Figura 7.21).

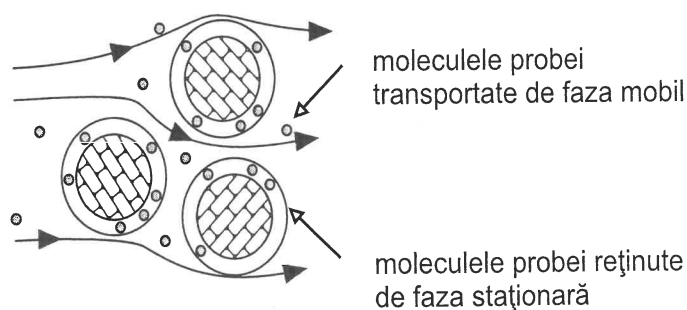


Figura 7.21 Mecanismul cromatografiei de repartitie

Faza staționară constă dintr-un film fin de lichid adsorbit sau legat chimic de suprafața particulelor solide fin divizate, care nu se îndepărtează prin încălzire sau reacție.

**3. Cromatografia de schimb ionic de înaltă performanță** în care faza staționară constă dintr-o rășină polimer, care are fixate pe suprafața sa grupări ionice și se denumește „rășină schimbătoare de ioni” (Figura 7.22). Aceasta poate fi rășină schimbătoare de anioni, care posedă grupări încărcate pozitiv, pentru a atrage ionii negativi, sau rășină schimbătoare de cationi, care posedă grupări încărcate negativ pentru a atrage ionii pozitivi. Analitul care conține un amestec de ioni se introduce în coloana umplută cu rășina schimbătoare de ioni care selectează ionii ce se vor atașa sau fixa pe ea, astfel separându-se de alte specii ce nu suferă acest proces. Ulterior, ionii atașați se pot disloca din coloană prin eluții repetate cu o soluție ce conține un ion care are o mai mare afinitate pentru grupările încărcate pe rășină decât ionii analitului. Astfel, ionii analitului sunt supuși schimbului ionic și se separă din coloană.

**4. Cromatografia de înaltă performanță prin excluderea mărimii particulelor** (Figura 7.23) în care faza staționară este o rășină polimer cu pori mici. Componentii din amestecul de separat trec prin coloană și particulele mici intră în porii fazei staționare, mobilitatea lor fiind diminuată. În același timp, însă, particulele mari, care nu pot pătrunde în acești pori pot ieși rapid din coloană și se eluează primele.

Separarea prin variația mărimii particulelor se clasifică în două categorii care se bazează pe natura fazei staționare și a fazei mobile:

- Cromatografia prin filtrare în gel care folosește umpluturi hidrofilice și faze mobile foarte apoase, pentru a separa specii polare.
- Cromatografia prin penetrație în gel care folosește umpluturi hidrofobice și faze mobile ca solvenții organici nepolari, pentru a separa specii nepolare.

**5. Cromatografia de afinitate** separă analiții pe baza unei interacții biospecifice reversibile între component (sau grup de componente) și un ligand specific cuplat cu o matrice cromatografică (Figura 7.24). Această tehnică prezintă o selectivitate crescută, deci și o rezoluție înaltă. Interacțiunile biologice între ligand și molecula țintă pot fi un rezultat al atracțiilor electrostatice sau hidrofobice, forțe Van der Waals și/sau fixare de hidrogen. Pentru a elua

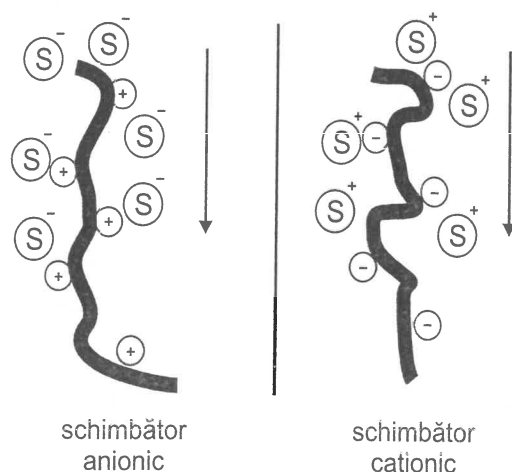
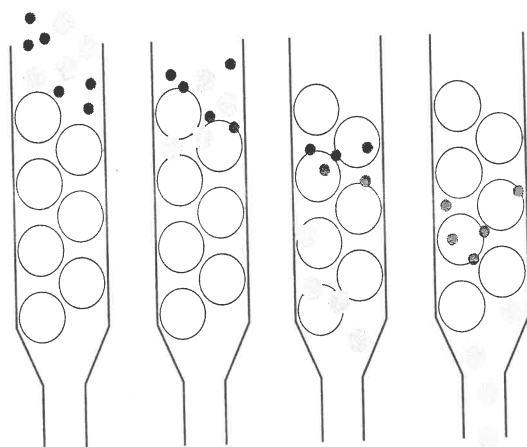
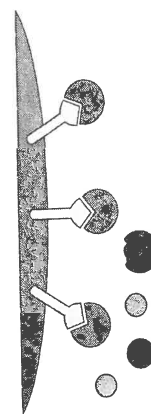


Figura 7.22 Mecanismul cromatografiei schimbătoare de ioni. S = solvit



**Figura 7.23 Mecanismul cromatografiei prin excluderea mărimii particulelor deplasate**



**Figura 7.24 Mecanismul cromatografiei de afinitate**

molecula țintă din mediul de afinitate se poate inversa interacția, fie prin folosirea unui ligand competitiv sau prin unul nespecific, modificând pH-ul, puterea ionică sau polaritatea. Faza staționară constă dintr-o matrice inertă chimic sau fizic, pe care ligandul propriu-zis se leagă reversibil de o moleculă țintă specifică sau de un grup de molecule țintă.

Ligandul cuplat trebuie să rețină afinitatea sa de legare specifică pentru molecula țintă și după spălarea materialului nelegat. Legătura dintre ligand și molecula țintă trebuie să fie reversibilă, pentru a permite celei din urmă să fie îndepărtată în forma activă.

Tehnica de cromatografie de afinitate începe cu echilibrarea mediului de afinitate în tamponul de legare. Se aplică proba care se leagă specific, dar reversibil de ligand, iar substanța nelegată se spală. Substanța țintă se recuperează prin schimbarea condițiilor care să favorizeze eluția. Eluția se face specific, cu un ligand competitiv sau nespecific, modificând pH-ul, puterea ionică sau polaritatea. Substanța țintă se colectează într-o formă concentrată, purificată. Final, mediu de afinitate se reechilibrează cu tamponul de legare.

### **Aparatura**

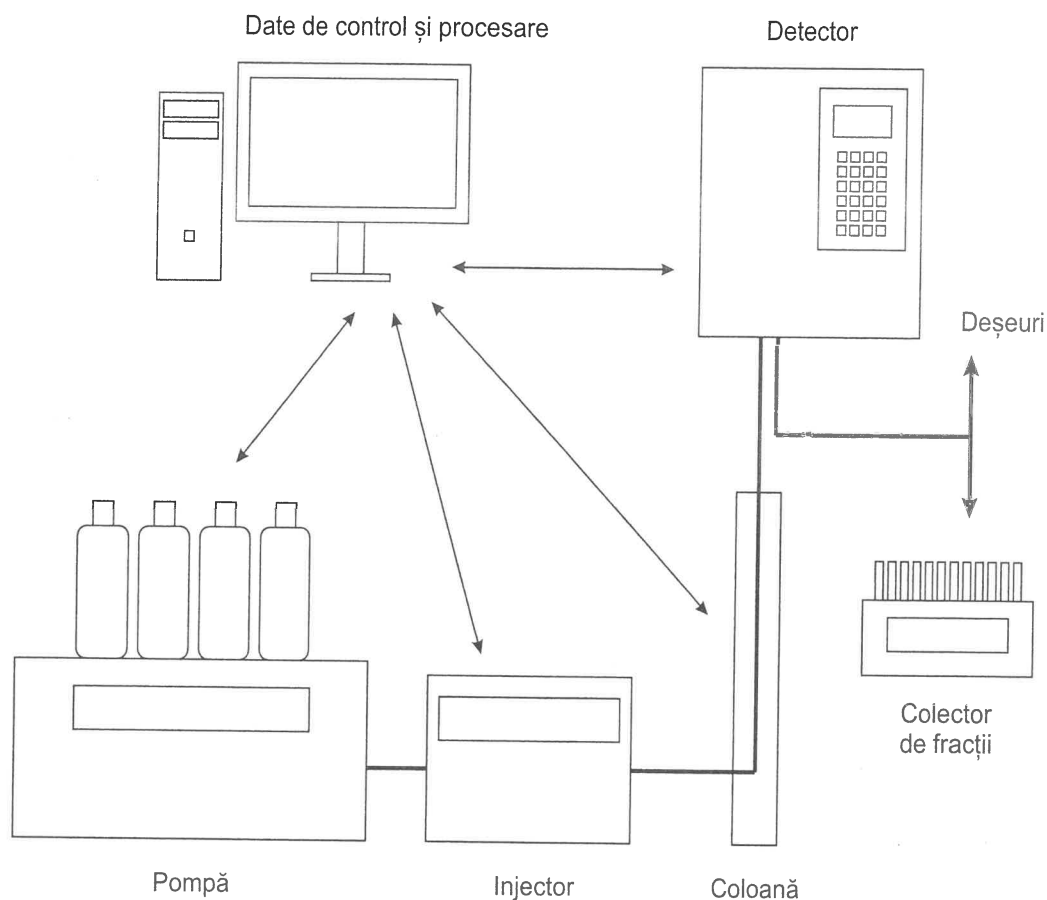
Sistemul de bază al cromatografiei lichide de înaltă performanță constă dintr-un rezervor de solvent (faza mobilă), pompă, degazator, instalație de injectare a probei, coloană și detector (Figura 7.25). Pompa împinge faza mobilă de la rezervor și prin injector o conduce în coloană.

La capătul coloanei este poziționat detectorul, care cel mai frecvent este de absorbție în UV.

### **7.2.3.2 Gaz cromatografia**

Folosește ca fază mobilă un gaz ( $\text{He}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{Ar}$ , etc.) care transportă amestecul de separat de-a lungul fazei staționare. Această tehnică se clasifică funcție de tipul fazei staționare, în două tipuri:

- Cromatografia gaz - solid în care faza staționară este solidă, cu o mare suprafață în care se adsorb componentii din amestec. Separarea componentilor se bazează pe diferențele puterii de adsorbție și difuzie a moleculelor gazoase ale analitului.

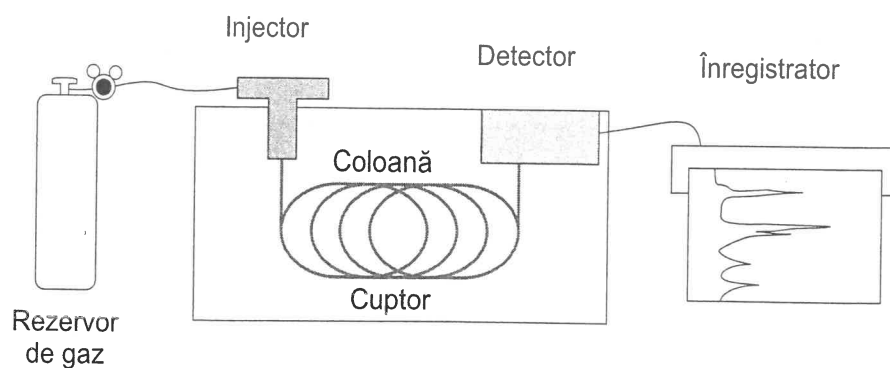


**Figura 7.25** Schema de bază a instalației de cromatografie pe coloană

- Cromatografia gaz – lichid în care faza staționară este un lichid ce este imobilizat prin adsorbție sau fixare chimică pe suprafața unui suport solid. Separarea componentelor din amestec are loc datorită raportului de distribuție (partiție) a acestora, între faza gazoasă și faza lichidă imobilizată.

### Aparatura

Aparatura folosită în gaz cromatografie diferă de cea folosită pentru cromatografia lichidă prin faptul că instalația de injectare, coloana și detectorul sunt încălzite la o temperatură pre-specificată. Faza mobilă fiind un gaz, componentii din analit trebuie să fie vaporizați. Componentele de bază a unui gaz cromatograf includ (Figura 7.26): un cilindru de gaz purtă-



**Figura 7.26** Schema unei instalații de gaz cromatografie

tor cu regulator, un controlor de flux pentru gaz, instalația de injectare pentru introducerea probei, coloana, detectorul și înregistratorul.

Detectorii folosiți în gaz cromatografie generează semnalul electronic, când un gaz, altul decât gazul purtător, eluează componentii din coloană. Astfel, există mai multe tipuri de detectori:

- Detectorul cu conductibilitate termică, în care gazul eluent are o conductibilitate termică diferită de a gazului purtător.
- Detectorul cu ionizare în flacără, potrivit căruia efluentul coloanei trece printr-o flacără de hidrogen și componentii inflamabili sunt arși. O parte din molecule sunt fragmentate în specii încărcate pozitiv și negativ. În timp ce ionii pozitivi sunt conduși în colector, ionii negativi sunt atrași către capătul arzător încărcat pozitiv, acesta generând un circuit electric și semnalul este amplificat. Acest detector este foarte sensibil, dar distruge proba prin ardere.
- Detectorul cu captură de electroni, folosește emisiile  $\beta$  ale unei surse radioactive, pentru ionizarea moleculelor gazului purtător, generând astfel electroni, care dau naștere unui curent electric.
- Detectorul cu azot / fosfor, care are o sare de metal alcalin poziționată peste flacără și este analog celui cu conductibilitate termică.
- Detectorul flamfotometric care conține încorporat un flamfotometru. Compușii cu sulf sau fosfor ard în flacăra de hidrogen și produc specii care emit lumină.
- Detectorul cu conductibilitate electrolitică, care convertește componentii gazoși eluați în ioni, în soluție lichidă și apoi măsoară conductibilitatea electrolitică a soluției, într-o celulă de conductibilitate. Conversia la ioni are loc prin oxidare chimică sau prin reducere cu un "gaz reacție".

În cromatografia pe coloană, ca și în gaz cromatografie se folosește uneori derivatizarea în pre-coloană, proces ce modifică chimic moleculele testate înainte de separare. Această operație are ca scop detectarea mai ușoară a componentilor separați și creșterea sensibilității de detectare. Derivații cei mai frecvenți se obțin prin introducerea în molecula test a unei grupări care să confere anumite proprietăți care să îmbunătățească detectarea.

Metodele de derivatizare se folosesc dacă sensibilitatea sau selectivitatea unei analize sunt nesatisfăcătoare sau inadecvate. Ele sunt utilizate pentru:

- îmbunătățirea detecției și/sau rezoluției
- stabilirea identității analitului
- îmbunătățirea selectivității analiților într-o matrice complexă
- îmbunătățirea comportării cromatografice
- creșterea stabilității și/ sau solubilității.

De exemplu, aminele biogene separate prin HPLC suferă o derivatizare cu O-ftalaldehidă și mercaptoetanol.

### 7.2.3.3 Cromatografia pe hârtie

Are ca fază staționară hârtia, un foarte uniform absorbant și se include în mecanismul de separare prin partiție. Faza staționară este suspendată într-un container închis, ce conține

faza mobilă care este constituită din următorul amestec: un component polar, unul ne-polar și rar un al treilea, pentru menținerea miscibilității și a ajustării de pH (Figura 7.27).

Închiderea containerului asigură saturarea mediului în care se face migrarea, pentru a se împiedica evaporarea amestecului pe măsură ce acesta avansează pe hârtie. Componentii amestecului se deplasează cu viteze diferite, separându-se în acest fel și final se pun în evidență prin colorare.

Cromatografia monodimensională pe hârtie (Figura 7.28) implică folosirea unui singur amestec de solvenți, care să deplaseze proba într-o singură direcție.

Cromatografia bidimensională (Figura 7.29) se aplică la compușii care pe cromatografia monodimensională sunt foarte apropiați și nu se pot separa. În acest caz se folosesc două migrări, perpendiculare ca sens, cu două amestecuri diferite de solvenți. Separarea are loc pe baza proprietăților diferite de solubilizare a celor două amestecuri de solvenți, când compușii ce nu se puteau separa prin cromatografie monodimensională, în acest caz se separă, rezoluția separării devenind superioară.

#### 7.2.3.4 Cromatografia pe strat subțire

Ca și cromatografia pe hârtie, se încadrează în metodologia de separare prin partiție și se realizează pe un strat subțire de silicagel sau alumină (fază staționară) repartizat uniform, care acoperă o placă de sticlă, metal sau plastic rigid. Faza mobilă constă dintr-un amestec de solvenți, care antrenează amestecul de separat, ai cărei componenți se deplasează cu viteze diferite și în final se separă. Procesul de separare este analog cromatografiei pe hârtie. Cromatografia pe strat subțire poate fi și bidimensională.

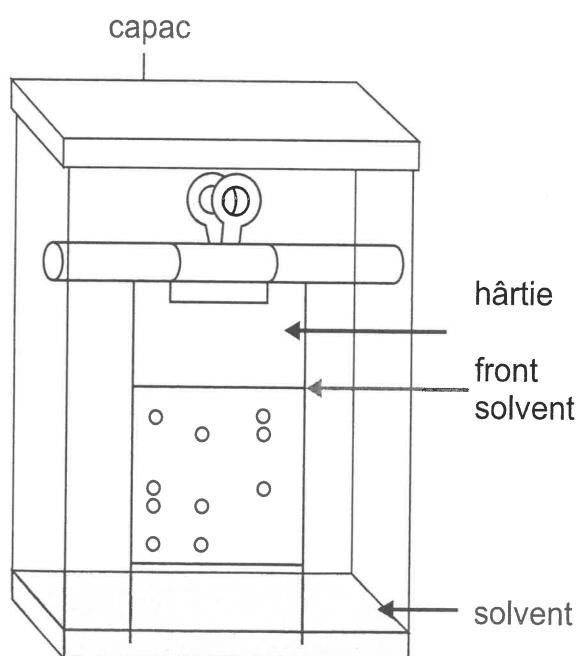


Figura 7.27 Un experiment de cromatografie pe hârtie

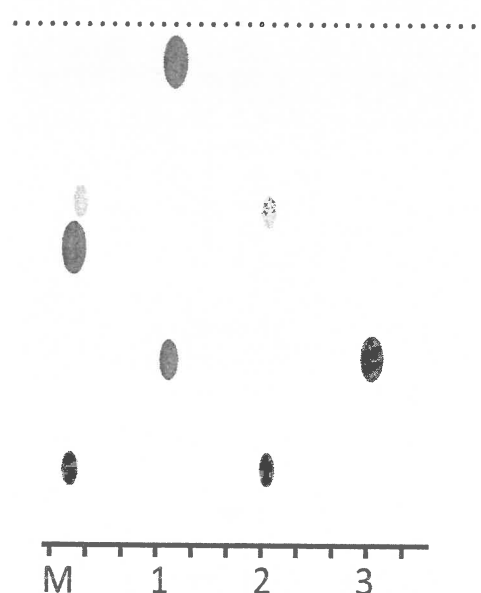
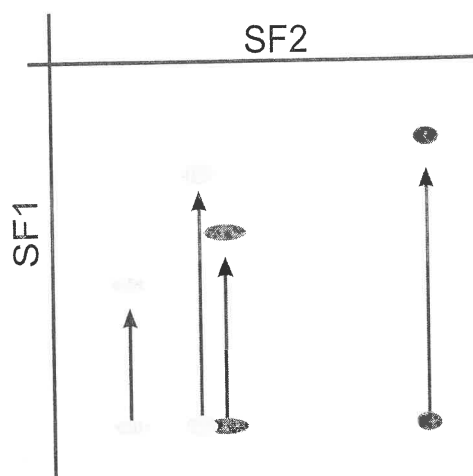


Figura 7.28 Cromatogramă monodimensională pe hârtie



**Figura 7.29** Cromatogramă bidimensională. SF1 = frontul de solvent pentru prima migrare; SF2 = frontul de solvent pentru a doua migrare.

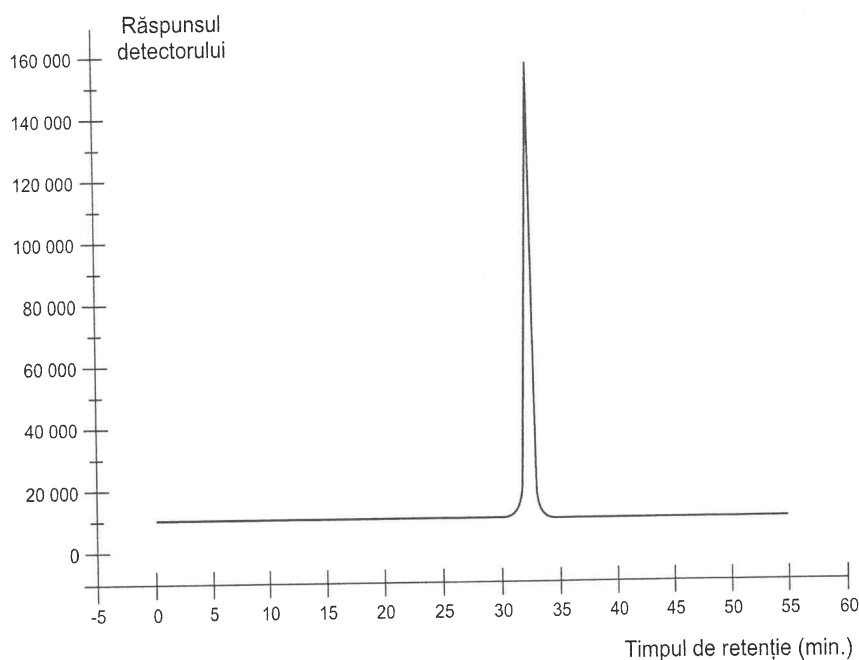
#### 7.2.4 Evaluarea rezultatelor separării cromatografice - Analiza calitativă

Identificarea componentelor separați prin cromatografia pe coloană (lichidă și gazoasă), se efectuează după timpul corespunzător de retenție, comparativ cu cel al standardelor ce migrează în condiții identice cu probele (Figura 7.30).

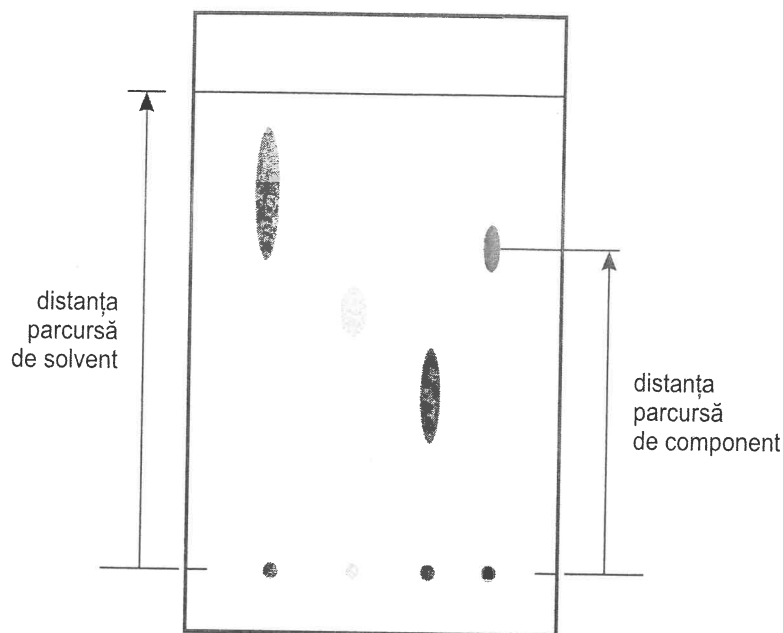
În același scop, se mai poate utiliza pentru componentele fluxului ce ies din coloană și spectrometria de masă.

În cazul cromatografiei pe hârtie și pe strat subțire, componentii se evaluează prin distanța parcursă de compus, raportată la cea parcursă de solvent, valoare denumită

RF – mărime care caracterizează fiecare component (Figura 7.31).



**Figura 7.30** Evaluarea componentului separat prin cromatografie pe coloană



**Figura 7.31** Evaluarea componentelor separați prin cromatografie pe hârtie sau strat subțire

### 7.2.5 EVALUAREA REZULTATELOR SEPARĂRII CROMATOGRAFICE - ANALIZA CANTITATIVĂ

Evaluarea cantitativă a fiecărui component separat prin cromatografie pe coloană (lichidă sau gazoasă) se efectuează prin reprezentarea grafică a volumului de eluat sau a timpului de eluție în raport cu absorbanta, care la rândul lor sunt direct proporționali cu concentrația corespunzătoare. Calibrarea se face cu standarde de masă cunoscută. Trebuie menționat că standardul intern este similar și nu identic cu analitul ce se separă pe cromatogramă. Uneori se folosește în locul volumului de eluat sau a timpului de eluție, înălțimea vârfului – mai puțin corect teoretic – care se acceptă în situația în care calibrarea cu standarde are loc în condiții identice.

Instalațiile moderne de cromatografie pe coloană permit integrarea electronică sau computerizată a semnalului.

În cazul cromatografiei pe hârtie sau pe strat subțire, se extrage spotul cu un solvent și se analizează spectrofotometric. O altă variantă prevede scanarea densitometrică a cromatogramei și apoi se procedează ca și în cazul cromatografiei pe coloană.

## 7.3 METODE IMUNOLOGICE

Reacțiile antigen-anticorp constituie baza unor metode foarte utilizate de analize calitative și semi-cantitative.

Anticorpii fac parte din familia imuno-globulinelor a căror denumire a derivat din observația că în timpul electroforezei plasmei sanguine, proteinele asociate cu activitatea anticorpică migrează cu fracțiunea gama a globulinelor.

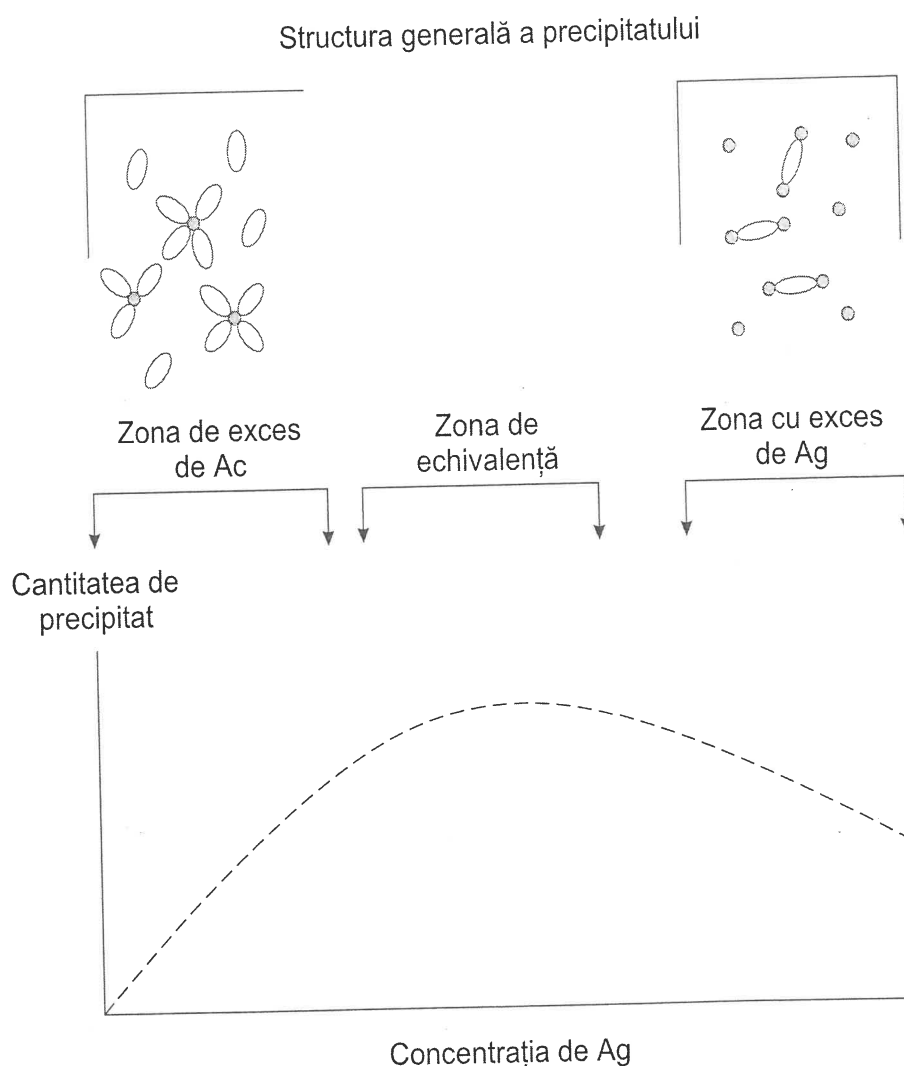
### 7.3.1 REACȚIA ANTIGEN-ANTICORP

Un anticorp (Ac) se combină specific cu antigenul (Ag) corespunzător (Figura 7.32), similar cu legătura dintre o enzimă și substratul său și implică interacții hidrofobe și electrostatice. Legătura dintre Ac și Ag nu implică o reacție chimică ulterioară și stabilitatea sa depinde de forma complementară a Ag-lui și de poziția de legare a Ac-lui. Forțele ce țin Ag și Ac împreună sunt relativ slabe, în consecință aceste combinații sunt reversibile și complexul se va disocia în funcție de puterea legăturii.



Antiserurile pot fi policlonale deoarece conțin anticorpi produși de diferite limfocite. Această categorie de anticorpi reduc specificitatea metodelor imunochimice. În schimb, anticorpul monoclonal este produs de o clonă de plasmocite, toate derivate de la un singur limfocit.

Combinarea Ag cu Ac (Figura 7.33) duce la formarea unei rețele de complexe imune, care sedimentează și se poate evalua calitativ sau cantitativ.



**Figura 7.32** Cantitatea de precipitat format în reacțiile antigen-anticorp, în funcție de concentrația relativă a reactanților

Dacă Ag este inițial solubil, procesul este cunoscut ca precipitare, iar dacă Ag este celular sau special, procesul se numește aglutinare.

Precipitarea maximă apare când Ag și Ac sunt în cantități echivalente (Figura 7.32 și Figura 7.33). În zona de echivalență cantitatea de precipitat este maximă posibilă, deoarece agregatele sunt mari și insolubile.

### 7.3.2 IMUNOPRECIPITAREA ÎN GEL

Gelurile stabilizează precipitatul și dau posibilitatea măsurării sale. Dacă o concentrație crescută de antigen difuzează într-un gel, care conține o concentrație uniformă de anticorp, la un anumit punct al gradientului de concentrație al antigenului, vor exista concentrații optime ale ambilor reactanți și se va forma un precipitat. Dimensiunile gradientului depind de concentrația inițială a antigenului. În consecință, distanța între precipitat și locul de pornire al antigenului va fi proporțională cu concentrația inițială.

**Imunodifuzia radială simplă** (Figura 7.35) – metodă elaborată de **Mancini** în 1965 se bazează pe principiul introducerii unui volum măsurat de Ag într-un godeu tăiat în gel de agar tamponat, care conține Ac. Ag difuzează radial până se atinge raportul optim Ag/Ac, când se formează un inel de precipitare. Între concentrația proteinei și pătratul diametrului zonei de precipitare există o relație lineară. Limita de sensibilitate este dependentă de abilitatea detectării și a măsurării inelelor foarte mici.

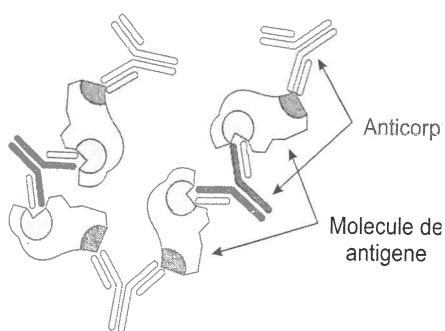


Figura 7.33 Imunoprecipitarea la zona de echivalență

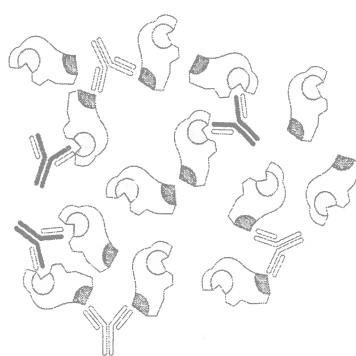


Figura 7.34 a. Formarea de complexe solubile în prezența unui exces de antigen

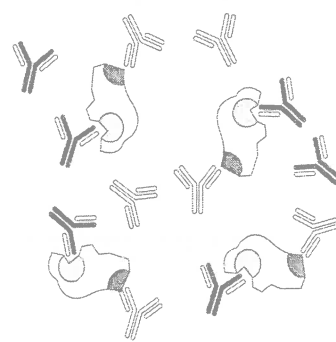


Figura 7.34 b. Formarea de complexe solubile în prezența unui exces de anticorp

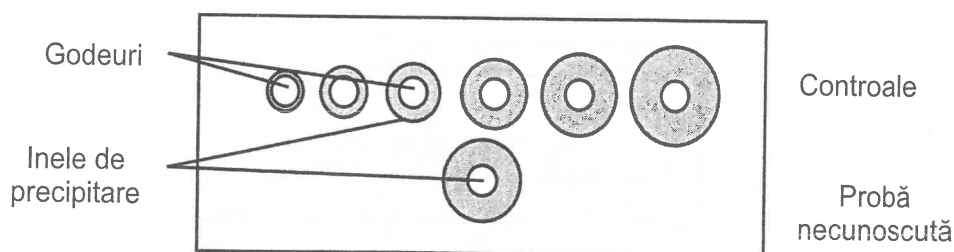


Figura 7.35 Imunodifuzia radială Mancini

Unul din impedimentele acestei metode este durata analizei. Metoda este de asemenea subiectivă (citirea diametrelor se efectuează cu ochiul liber) și este dependentă de viteza de difuzie. În cazul componentilor monoclonali polimerizați sau complexați, proteina anormală poate avea o viteză de difuzie considerabil diferită de cea a Ig normale de aceeași clasă, din aceeași probă. Rezultatul obținut constă în formarea de inele de difuzie multiple, care fac analiza cantitativă dificilă, dacă nu imposibilă. În acest fel pot rezulta subestimări (component monoclonal cu masă moleculară mai mare) sau supraestimări (component monoclonal cu masă moleculară mai mică). Excesul de Ag cauzat de concentrații extreme ale componentului monoclonal poate de asemenea afecta concentrația Ac-lui în ariile adiacente ale plăcii, producând complexe complet solubile ce nu se vizualizează. Situația se extinde în ariile adiacente unde probele produc inele aberante, ceea ce duce la inacuratețea rezultatelor.

**Metoda Laurell** (Figura 7.36), introdusă în 1966, încearcă să înlăture durata mare a analizei, folosind electroforeza pentru a produce gradientul de concentrație, față de difuzie. Anticorpul este incorporat în gel, electroforeza are loc la pH 8,6, condiție în care anticorpul nu migrează semnificativ, dar proteinele, da. Prin electroforeză, zona de echivalență se atinge mult mai rapid decât prin difuzie și liniile de precipitare apar sub formă de "rachete". Pentru cuantificarea probelor necunoscute se construiește o curbă de calibrare reprezentând înălțimea "rachetelor" în raport cu concentrația de antigen.

**Dubla difuzie Ouchterlony** (Figura 7.37) implică faptul că și antigenul și anticorpul sunt plasați în godeuri și difuzează unul către celălalt. Precipitarea apare tot la punctul de echivalență, dar în acest caz precipitatul este sub formă de linie sau arc.

**Imunofixarea.** Pe suprafața gelului pe care se găsesc fracțiunile proteice separate electroforetic se aplică antiserurile monospecifice corespunzătoare imuno-globulinelor și lanțurilor ușoare  $\kappa$  și  $\lambda$ . Anticorpul difuzează în gel și, în final, se formează imunoprecipitatul. Antigenii și anticorpul rămași necomplexați sunt spălați și îndepărtați, iar gelul se colorează. În final se obțin benzi bine delimitate (Figura 7.38).

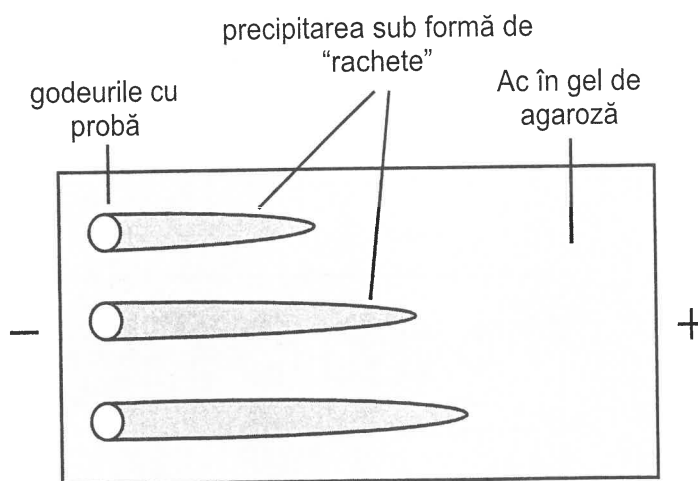


Figura 7.36 Electroforeză Laurell

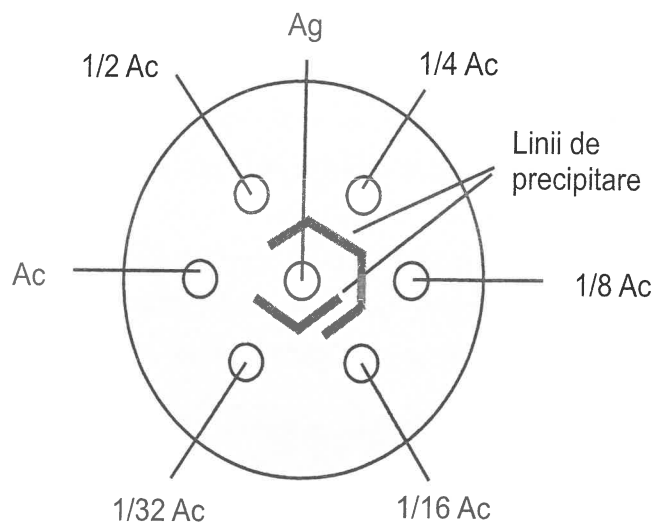


Figura 7.37 Dublă difuzie Ouchterlony

Avantajele metodei:

- puterea de rezoluție este crescută, difuzia fiind minimalizată ;
- mobilitățile fracțiunilor se compară cu cele obținute pe modelul electroforetic prezent de asemenea pe gelul de imunofixare, detectarea și interpretarea compuşilor fiind ușoară ;
- metoda este rapidă, iar sensibilitatea este de 10 ori mai mare decât a imunoelectroforezei care nu se mai folosește.

Dezavantajele metodei:

- necesită Ac monospecific de titru înalt ;
- excesul de Ag duce la apariția de găuri în interiorul benzii, ceea ce face necesară repetarea analizei cu Ag diluat ;
- necesită fixarea individuală a parametrilor de procesare.

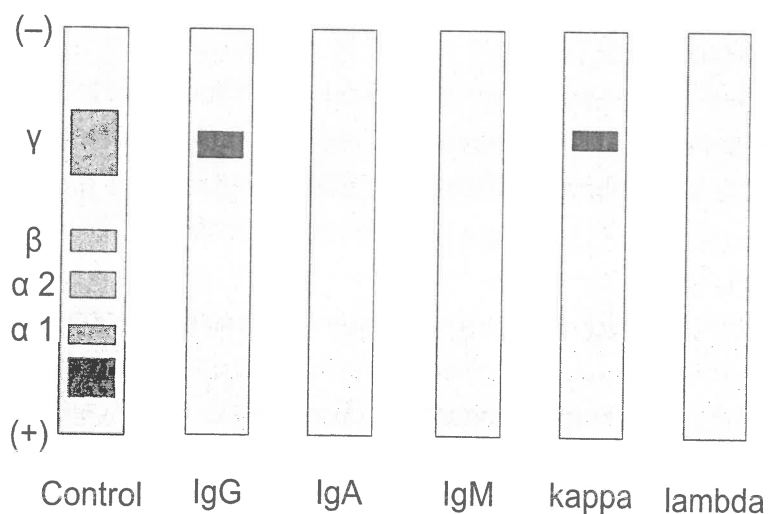


Figura 7.38 Imunofixare

**Immunoblotting** este o metodă prin care anticorpii se pot utiliza pentru a determina prezența sau identitatea antigenelor solubile. Antigenele solubile sunt aplicate pe o membrană de nitroceluloză, pe care se aplică și anticorpii. Membrana se spală pentru a îndepărta anticorpii nelegați și prezența sau absența antigenului se determină prin diferite mijloace. În primă fază, se separă antigenele solubile prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, cu sau fără sodium dodecil sulfat, apoi acestea sunt transferate de pe gel pe o membrană de nitroceluloză. Ulterior, anticorpii se folosesc să probeze prezența antigenelor. Moleculele marcate se vizualizează prin tehnici folosite în imunohistochimie sau prin autoradiografie.

### 7.3.3 IMUNOPRECIPITAREA ÎN SOLUȚIE

Metodele turbidimetrice și nefelometrice sunt metode cantitative prin care se poate măsura interacțiunea luminii cu particulele din suspensii. Când o rază luminoasă trece printr-un amestec ce conține particule în suspensie, intensitatea ei scade datorită fenomenelor de absorbție și reflexie pe suprafața particulelor. Cele două metode utilizează sisteme optice de detectare ce măsoară concentrațiile particulelor foarte mici suspendate într-un lichid. Reacția imunochimică are loc în cuva de reacție și este identică în ambele cazuri, diferă doar principiul de detectare.

**Turbidimetria** măsoară intensitatea luminii transmise înainte (intensitatea fasciculului luminos care nu își schimbă drumul optic). Formarea complexului Ag-Ac în urma reacției Ag cu Ac determină apariția unui sistem dispers (turbidiscenț). Deoarece în condiții normale – adică în soluții diluate – lumina transmisă reprezintă o parte substanțială a luminii incidente, o amplificare de mică intensitate este suficientă. Turbidimetrele se aseamănă cu spectrofotometrele și folosesc lungimi de undă în domeniu 320 – 380 nm sau 500 – 650 nm. Timpul între prepararea probelor și efectuarea măsurătorilor poate fi o sursă de eroare, deoarece complexe imune formate se pot depune.

**Nefelometria** măsoară intensitatea luminii refractate sub diferite unghiuri, fiind mult mai exactă decât turbidimetria. Diferența față de turbidimetrie este că sursa de lumină este un LASER și detectorul care măsoară împrăștierea luminii este la un unghi drept față de lumina incidentă. Împrăștierea luminii de către particule are loc în funcție de dimensiunea și numărul particulelor.

Nefelometria măsoară cantitatea de antigen în zona excesului de anticorp unde împrăștierea luminii este optimă și este direct proporțională cu concentrația antigenului din proba de testat. Testul include o măsurătoare a anticorpului liber (pentru a preveni o reacție în exces de antigen). Dacă antigenul este în exces, complexe imune sunt mai mici, devin mai solubile și cauzează erori.

Adăugarea de antiser în cuva de reacție declanșează reacția antigen-anticorp. Formarea complexelor imune este semnalată prin creșterea intensității luminii dispersate. Semnalul crește rapid când se formează rețeaua de complexe imune, apoi atinge un platou și scade când precipitatul se redizolvă în soluție. Rata de creștere a semnalului pentru lumina împrăștiată și înălțimea platoului sunt direct proporționale cu concentrația antigenului și diluția antiserului. Există două modalități de măsurare a concentrației de antigen:

- măsurarea formării complexelor la punctul de echilibru (metoda „în platou” sau cu punct final)
- măsurarea formării complexelor în cinetică, necesită monitorizarea continuă a reacției, începând din momentul adăugării antiserului și continuând cu verificare excesului de antigen.

Efectuarea în prealabil a electroforezei serului este o determinare care trebuie să constituie baza orientativă pe care se sprijină evaluarea turbidimetrică sau nefelometrică.

Determinarea cantitativă a imunoglobulinelor în scop clinic trebuie să asigure cea mai sensibilă prin care să se poată identifica valori mici din serul copiilor de toate vârstele, precum și a deficitelor de imunoglobuline. O altă problemă o reprezintă cuantificarea cât mai exactă a paraproteinelor. Având o structură atipică, acestea pot produce erori atât în tehnica de imunodifuzie radială, cât și în nefelometrie. Din cauza structurii alterate a paraproteinelor, anumiți epitopi nu pot fi recunoscuți de către antiserurile poli- sau monoclonale, ceea ce va duce la erori în determinare.

#### 7.3.4 TEHNICI IMUNE PRIN MARCARE CU RADIOIZOTOPI SAU ENZIME

Ca tehnică analitică, a fost introdusă în 1960 de către **Rosalind Yalow** și **Solomon Berson** și are ca principiu evidențierea cantității de complexe imune apărute prin producerea unui semnal chimic sau fizic măsurabil, ca răspuns la interacțiunea specifică Ag-Ac.

**Tehnicile imune cu legare competitivă** constau în competiția între antigenul test și un antigen marcat pentru poziții de legare pe o cantitate fixată de anticorp. Dat fiind că antigenul marcat este fixat de anticorp, când antigenul test nemarcat nu este prezent, atunci antigenul marcat are acces liber spre pozițiile de legare și starea de echilibru ulterioară va reprezenta cantitatea maximă de antigen marcat care poate fi legat. Când antigenii test nemarcați sunt prezenți, va exista o competiție între antigenii marcați și nemarcați pentru utilizarea pozițiilor de legătură și la echilibru, cantitatea de antigeni marcați legați se va reduce cu o cantitate proporțională cu cantitatea de antigeni nemarcați din sistem. Concentrația de antigen din probe necunoscute se determină prin compararea proporției antigenilor marcați cu proporția legată, folosindu-se o serie de standarde de antigen de concentrație cunoscută.

**Tehnicile imune necompetitive sau imunometrice** se caracterizează prin faptul că anticorpul este prezent în exces și de asemenea marcat. În acest caz nu este necesar un echilibru, deoarece toți antigenii test pot fi sechestrați de excesul de anticorpi. Cantitatea de anticorp marcat legat este direct proporțională cu cantitatea de antigen prezentă în proba de analizat.

#### Componenții sistemelor imune

**Anticorpul** se folosește în ambele forme, monoclonal și policlonal. Esențial este să se determine concentrația optimă cerută.

**Substanța marcatoare** trebuie să producă un semnal înalt eficient (adică să poată fi detectat la concentrație scăzută) în timp ce este încorporat în antigen sau anticorp, neavând efect asupra imunoreactivității lor.

### 7.3.4.1 RIA (Radioimmunoassay)

RIA este una dintre cele mai sensibile tehnici de detecție a antigenelor sau anticorpilor.

Principiul RIA implică legarea competitivă a unui antigen marcat radioactiv și a unui antigen nemarcat, la un anticorp de mare afinitate. Antigenul marcat este amestecat cu anticorpul la o concentrație care saturează situsurile de legare ale anticorpului. Apoi este adăugat antigenul nemarcat, de concentrație necunoscută. Cele două tipuri de antigen intră în competiție pentru situsurile de legare ale anticorpului, deoarece anticorpul nu face distincție între antigenul marcat și cel nemarcat. Este măsurată scăderea cantității de antigen marcat legat de anticorp, în prezența antigenului nemarcat din probă, pentru a determina cantitatea de antigen prezent în probă.

Pentru marcarea antigenului sunt utilizați izotopi radioactivi, de ex.  $^{125}\text{I}$  sau tritiu ( $^3\text{H}$ ). Raportul între cantitatea de anticorp și antigen marcat utilizați în reacție este ales astfel încât numărul de epitopi de pe antigenul marcat depășește numărul de situsuri de legare de pe anticorp. Prin urmare, antigenul nemarcat adăugat ulterior intră în competiție cu antigenul marcat, pentru legarea de numărul limitat de anticorpi disponibili. O cantitate mică de antigen nemarcat prezent în probă va determina o scădere a cantității de antigen marcat care rămâne legat de anticorpi, iar această scădere va fi proporțională cu cantitatea de antigen nemarcat adăugată.

Pentru determinarea cu acuratețe a antigenului nemarcat din probă, este necesară realizarea în prealabil a unei curbe standard prin utilizarea unor probe care conțin antigen nemarcat în concentrații cunoscute.

Pentru a putea determina cantitatea de antigen marcat rămas legat de anticorp, complexul Ag-Ac trebuie separat de Ag liber și apoi se măsoară radioactivitatea complexului antigen-anticorp. Pentru separare se folosesc diverse mijloace, de ex. anticorpi secundari, proteina A stafilococică (are afinitate pentru IgG) sau utilizarea unei variante RIA în fază solidă, în care anticorpul este legat de particule de sepharoză sau de pereții unei plăcuțe de polistiren.

Adaptarea acestei tehnici la formatul în microplăci și disponibilitatea pe scară largă a sistemelor de cuantificare a radiației, au permis utilizarea tehnicii RIA pentru detecția și cuantificarea unui mare număr de tipuri de antigene. De exemplu, datorită simplității tehnicii, RIA a fost utilizată cu mare amploare pentru detecția antigenului HBs în screening-ul infecției cu virusul hepatitic de tip B la donatorii de sânge.

### 7.3.4.2 Testele imunoenzimatic (ELISA)

Testele imune implică utilizarea anticorpilor ca parte componentă a reacției. Testele imuno-enzimatic utilizează enzime atașate la unul din reactanții din testul imun pentru a permite cuantificarea printr-o reacție de culoare după adăugarea unui substrat sau cromogen corespunzător. Testele ELISA implică adăugarea reactivilor în etape succesive la moleculele legate de o fază solidă, incubări și separarea reactivilor legați de cei liberi prin etape de spălare.

În general, sistemele de teste ELISA existente pot fi împărțite în 3 tipuri: ELISA directă, indirectă și în sandwich.

Toate cele 3 sisteme pot fi utilizate pentru elaborarea de teste ELISA competitive sau de inhibiție.

### 1. Etape ELISA directă:

Antigenul este atașat fazei solide prin adsorbție pasivă, într-o primă etapă de incubare. Apoi, antigenul nelegat este îndepărtat prin spălare.

Într-o etapă următoare, la faza solidă acoperită de antigen, se adaugă anticorpi specifici pentru antigenele cuplate cu enzimă (conjugatul). Conjugatul se leagă de antigenul de pe suprafața fazei solide. După incubare, conjugatul nelegat este spălat și o soluție de substrat cromogen pentru enzimă este adăugat în mediul de reacție. Enzima din componența conjugatului catalizează o reacție prin care se eliberează un compus colorat. Reacția de culoare este oprită după un anumit interval de timp și intensitatea culorii este cuantificată prin spectrofotometrie.

### 2. ELISA indirectă

Sistemul indirect este similar celui direct prin faptul că antigenul este direct legat la faza solidă, iar în etapa a doua se folosesc anticorpi de detecție (anticorpi primari) specifici pentru antigen.

Totuși, acești anticorpi, spre deosebire de metoda directă, nu sunt cuplați cu enzima și vor fi la rândul lor detectați de un al doilea set de anticorpi legați de o enzimă (anticorpi secundari). Anticorpul secundar recunoște imunoglobulinele produse de specia animalului utilizat pentru obținerea anticorpului primar și se numesc conjugați anti-specie. Astfel, dacă anticorpul de detecție (anticorpi primari) este produs de șoarece, anticorpul cuplat cu enzima (anticorpi secundari) vor fi anticorpi antiimunoglobulină de șoarece, produși de o altă specie, de ex., de iepure.

Conjugatul antispecie poate fi de tip anti Ig M, Ig G1, Ig G2 etc.

Sistemul (tehnica) indirectă oferă avantajul că un număr mare de antiseruri poate fi detectat utilizând un singur conjugat antispecie. Acest sistem a fost utilizat pe scară largă în diagnostic, mai ales în screening-ul unui număr mare de probe. Acest sistem are însă dezavantajul că serurile individuale prezintă capacități variabile de legare nespecifică, ceea ce lărgeste dispersia (variabilitatea) rezultatelor testului.

### 3. ELISA sandwich

Acest sistem poate fi împărțit în două tipuri: ELISA sandwich directă și indirectă.

*ELISA sandwich directă* implică atașarea pasivă a anticorpilor la faza solidă. Acești anticorpi (anticorpi de captură) vor lega antigenul prezent în probă. După incubare și spălare, va rămâne atașat de faza solidă un complex antigen – anticorp. Antigenul cuplat va fi apoi detectat prin adăugarea unor anticorpi specifici cuplați cu enzima. Astfel, un conjugat direct este folosit pentru detecția antigenului. Acest al doilea anticorp poate fi același cu cel utilizat pentru captură sau poate fi diferit. După incubare și spălare, se adaugă un substrat cromogen care va fi transformat de către enzimă într-un compus colorat dozabil prin spectrofotometrie.

Deoarece este utilizat un singur anticorp cuplat cu enzima, sistemul este limitat la specificitatea și proprietățile acelui set de anticorpi. Sistemul este de asemenea limitat prin faptul

că antigenul de detectat trebuie să aibă cel puțin doi epitopi, deoarece la aceștia trebuie să se lege atât anticorpul de captură, cât și cei de detecție. Aceasta poate limita utilizarea testului la complexe antigenice relativ mari.

Primele etape ale *ELISA sandwich indirecte* sunt similare cu cele ale tehnicii directe: anticorpul de captură sunt atașați fazei solide, iar la aceștia se adaugă proba care conține antigenul de detectat. În etapa următoare, antigenul este detectat cu un anticorp de detecție care nu este, în acest caz, cuplat cu o enzimă. În tehnica indirectă, anticorpul de detecție sunt detectați, la rândul lor cu ajutorul unui conjugat antispecie. În final, în prezența substratului cromogen, enzima din componența conjugatului antispecie va dezvolta o reacție de culoare, a cărei intensitate va fi măsurată prin spectrofotometrie.

### Bibliografie selectivă

1. Ardo Y., Kristiansen K.R., „Chromatographic methods”, Elsevier Science Ltd., 2002.
2. Bozer R., „Modern Experimental Biochemistry”, 3rd Ed, Benjamin / Cummings, Addison Wesley Longman, 2000.
3. Day E.D., „Advanced Immunochemistry”, 2nd ed., Wiley-Liss, 1990.
4. De Michael Bishop L., Edward P. Fody, Larry E. Schoeff, „Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations”, Lippincott Williams & Wilkins, 2004
5. Dennison C., „A guide of protein isolation”, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2002
6. Holme D.J, Peck H., Analitical Biochemistry, 3rd Ed, Pretince Hall, Pearson Education Limited, Addison Wesley Longman Limited, 1998.
7. Holtzhauer M., „Basic methods for the Biochemical Laboratory”, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006.
8. Le Carrer D., „Serum protein electrophoresis immunofixation”, Laboratoires Sebia, Hatier, 1994.
9. Mayer G., Immunology – Cap. 4, „Immunoglobulins – structure and functions”, University of South Carolina, 2005, <http://www.med.sc.edu:85/mayer/IgStruct2000.htm>.
10. O’Mahony J.A., Ardo Y., McSweeney P.L., „Electrophoresis”, Analysis, 2002, 67-74.
11. Ritchie R.F., Navolotskaia O., „Serum proteins in clinical medicine”, 1st ed., vol.I Laboratory Section, 1996.
12. Westermeier D.R., Gronau S., „Electrophoresis in practice”, 4th Ed, Wilez-VCH Verlag Gmb H & Co, KgaA, Weinheim, 2005.

# 8

## Investigarea biochimică și citologică a lichidului cefalorahidian

Ariadna Rădulescu, Ileana Funduc,  
Minodora Dobreanu

### 8.1 INTRODUCERE

Sistemul nervos central (encefalul și măduva spinării) este acoperit de trei membrane: dura mater, arahnoida și pia mater, cele două din urmă le găsim și cu numele de leptomeninge sau meninge moi. Spațiul, între arahnoidă și pia mater (numit spațiu subarahnoidian) compartimentat de travee conjunctive acoperite cu celule mezoteliale, este ocupat de lichidul cefalorahidian (LCR), precum și de formațiuni complexe glomerular-vasculare, numite plexuri coroide, care secretă lichidul cefalorahidian, acesta reflectând starea de sănătate și activitatea țesutului nervos. Rolul LCR este de a face legătura între creier și fluxul sanguin. Cele patru cavități ale encefalului (ventriculii I, II, III și IV) comunică între ele și se continuă cu canalul endolimfatic din măduva spinării și acestea sunt căptușite de un strat de celule cubice ciliate - celulele endolimfocitare.

### 8.2 FORMAREA LICHIDULUI CEFALORAHIDIAN

Lichidul cefalorahidian provine din filtrarea plasmelor prin pereții capilari (aproximativ 30%), cât și prin secreție activă (cea mai mare parte a LCR). Acest lichid este secretat activ de plexurile coroide din spațiul subarahnoidian, de celulele endolimfocitare din canalul măduvei spinării, dar cea mai mare parte din lichidul cefalorahidian provine din ventriculii laterali I și II. Plexurile coroide sunt filtre foarte selective, menținând constantă compoziția chimică a lichidului, indiferent de variațiile din plasma sanguină, de asemenea sunt și o excelentă barieră pentru majoritatea substanțelor toxice, în felul acesta asigurându-se buna funcționare a creierului.

Volumul de lichid cefalorahidian este constant; la copii este de 10 până la 60 ml, iar la adulți între 100 și 150 ml. Are o presiune de 10-15 mm Hg și se reînnoiește cu o rată de 0,35ml / minut, deci într-o zi se poate reface de trei – patru ori cantitatea totală de lichid. Lichidul cefalorahidian are rol important în protejarea sistemului nervos central, precum și în schimburile metabolice de la acest nivel. El circulă în spațiile sistemului nervos central plecând din ventriculul IV, trece prin orificiile din tavanul acestuia, coboară pe fața posterioară a măduvei spinării și urcă pe fața anterioară a acesteia, ajunge în spațiul subarahnoidian din meningele cerebrale, încărcat fiind cu substanțe de catabolism și se resoarbe la nivelul capilarelor sanguine din vilozitățile arahnoidiene.

În diverse situații clinice se impune examinarea lichidului cefalorahidian pentru diagnosticarea unor afecțiuni ce vizează spațiul subarahnoidian, de exemplu: leptomeningită, hemoragie subarahnoidiană sau carcinomatoză meningeală, ba mai mult, pentru că lichidul ajunge în contact cu întreaga suprafață a creierului și măduvei spinării, dar și cu cavitățile lor, ne oferă, în mod indirect informații despre afecțiuni localizate în parenchimul sistemului nervos central.

### 8.3 RECOLTAREA

O mostră de LCR se obține prin puncție lombară între vertebrele L3 – L 4, sau L 4 – L 5, sau în cazuri speciale de inflamație sau malformație osoasă, se recoltează din cisterna magna de la baza creierului, sau direct din ventriculii laterali în timpul unei proceduri chirurgicale. De obicei se recoltează 1-2 ml, de preferat ar fi să se recolteze minim 3 ml și ideal ar fi 10 ml (în trei recipiente separate, sterile), pentru a asigura determinarea completă a caracteristicilor biochimice, citologice și bacteriologice.

Lichidul recoltat se aduce în laborator și se prelucrează imediat, de preferat în 30 minute, maximum 2 ore de la recoltare, dacă nu este posibil, se păstrează la frigider la 4° C, iar dacă depășește 48 ore se adaugă o cantitate egală de alcool etilic 50%.

### 8.4 CARACTERELE FIZICO-CHIMICE

Lichidul cefalorahidian, în mod normal, este limpede, incolor și de aceea i se mai spune și „apa de stâncă” sau „cristal de stâncă”, cu compoziție chimică asemănătoare cu a serului sanguin (mai puțin proteinele), dar nu identică. Își pierde transparența dacă are celularitate bogată (peste 200 leucocite/mm<sup>3</sup>), în prezența bacteriilor sau în caz de hemoragie cerebrală (peste 400 hematii/mm<sup>3</sup>, cu hemoglobină liberă sau produși de degradare ai acesteia). Aspectul xantocrom poate indica o hemoragie mai puțin recentă, fiind rezultatul unui proces de degradare a hemoglobinei. În patologii însoțite de icter pronunțat cu bilirubina liberă crescută, LCR devine icteric. Prezența de fibrină sau coagul are semnificație patologică (în meningita tbc sau sifilis), pecum și în cazul în care se lezează accidental un vas de sânge în timpul recoltării (situație destul de frecventă – 10-20% din puncții). Această situație poate fi diferențiată prin centrifugarea LCR, proces în urma căruia hematiile (prezente accidental în LCR, ca urmare a unor lezări vasculare în timpul puncției) sedimentează.

Examenul biochimic al LCR, poate fi calitativ sau cantitativ și presupune determinarea glucozei, a clorului, lactatului și proteinelor.

#### 8.4.1 GLICORAHIA

Deși reprezintă aproximativ 5% din greutatea organismului, creierul consumă 20% din glucoza circulantă (depozitele de glicogen neuronale fiind nesemnificative).

Se determină folosind aceeași metodă ca și în cazul determinării glicemiei (HK/G-6-P DH). Glicorahia fiziologică este aproximativ 60-75% din valoarea glicemiei (50-70 mg / dL). Valori

scăzute (sub 60% din valoarea glicemiei) apar în meningite bacteriene (nu și în cele virale, în care glicorahia este relativ normală), tbc, criptococice, amibiene, hemoragie subarahnoidiană, tumori primare sau secundare. Monitorizarea în cinetică este valoroasă – normalizarea glicorahiei se realizează foarte prompt odată cu succesul terapeutic. Valori crescute se întâlnesc în: diabet zaharat, sczeleza în plăci, epilepsie, encefalite, neurolues, precum și în toate situațiile însoțite de creșteri ale glicemiei. Transferul glucozei din sânge în LCR se face prin intermediul unor transportori specifici, care se saturează la valori ale glicemiei care depășesc 300-400 mg/dL, astfel încât în aceste situații, se poate ca raportul glicorahie/glicemie să fie mai mic de 0,6 fără o cauză infecțioasă. Administrarea de insulină nu conduce la o normalizare a glicorahiei la fel de promptă ca în cazul glicemiei; sunt necesare mai mult de 4 ore pentru a se obține acest efect, astfel încât la diabeticii în coma hiperosmolară se poate întâlni situația paradoxală în care glicorahia este superioară glicemiei.

#### 8.4.2 CLORORAHIA

Spre deosebire de concentrația altor ioni aflați în formă liberă în LCR, care coincide cu cea din ser, concentrația ionilor de clor este cu aproximativ 20% superioară în LCR față de cea din ser (120-130 mM/L). Determinarea se face folosind metode similare cu acelea pentru ser (cel mai frecvent - metoda ionometrică, ISE). Valori scăzute ale clororahiei se întâlnesc în meningite purulente, herpetice și tbc (în această formă de meningită se întâlnesc cele mai scăzute valori ale clororahiei). Valori crescute apar în glomerulonefrite cronice, tumori și abcese cerebrale.

#### 8.4.3 LACTATUL

Concentrația lactatului în LCR este de obicei sub 2,5 mM/L. Creșteri peste acest prag se întâlnesc în afecțiuni însoțite de hipoxie cerebrală (de exemplu accidentul vascular ischemic) și în meningitele bacteriene, când se asociază cu scăderea glicorahiei.

#### 8.4.4 PROTEINORAHIA CANTITATIVĂ ȘI CALITATIVĂ

Majoritatea proteinelor LCR provin din ser (aproximativ 80%), traversând prin difuziune pasivă bariera hemato-encefalică. Restul sunt sintetizate local. Concentrația plasmatică a proteinelor, permeabilitatea barierei hemato-encefalice și sinteza locală de imunoglobuline, sunt factorii care determină concentrația și compoziția proteinelor în LCR. Există diferențe între plasma sanguină și LCR privind compoziția și concentrația proteinelor: preAlbumina și albumina sunt mai bine exprimate, în timp ce imunoglobulinele se găsesc în proporție mai mică în LCR. Fracțiunile proteice cele mai bine exprimate provin din plasmă, dar concentrația proteinelor totale din LCR este mult mai mică decât a plasmei sanguine (aproximativ 0,5% din aceasta – maximum 0,45 g/L). Concentrația proteinelor normale din LCR la adulți este de 150-450 mg/L, mai mare în regiunea lombară decât în cea toracică sau cervicală. La nou-născuți concentrația proteinelor este mare, descrește pe parcursul primului an și se menține la nivele joase în copilărie. La adulți, concentrația proteinelor LCR crește cu vârsta.

Spre deosebire de concentrația proteinelor totale, concentrația albuminei este considerată un indicator mai bun al permeabilității barierei hemato-encefalice, deoarece aceasta este o specie proteică omogenă, ușor de determinat, nu este sintetizată de sistemul nervos și e mai puțin influențată de vârstă. Raportul  $Q_{Alb} = [Alb]_{LCR \text{ mg/l}} / [Alb]_{ser \text{ mg/l}}$  este utilizat pentru a determina perturbările permeabilității BHE.

În mod fiziologic raportul este aproximativ  $5 \times 10^{-3}$ . Valori până la  $10 \times 10^{-3}$  pot fi întâlnite în scleroza multiplă, encefalita cronică din infecția HIV, polineuropatia alcoolică, herpes zoster.

Valori între  $10$ - $20 \times 10^{-3}$  pot fi întâlnite în meningite virale, meningoencefalopatii cu germeni oportuniști, polineuropatia diabetică, infarct cerebral, atrofia cerebrală.

Valori mai mari de  $20 \times 10^{-3}$  pot apare în sindromul Guillain-Barré, encefalitele cu virus herpes simplex, bacteriene, în special cu bacil Koch.

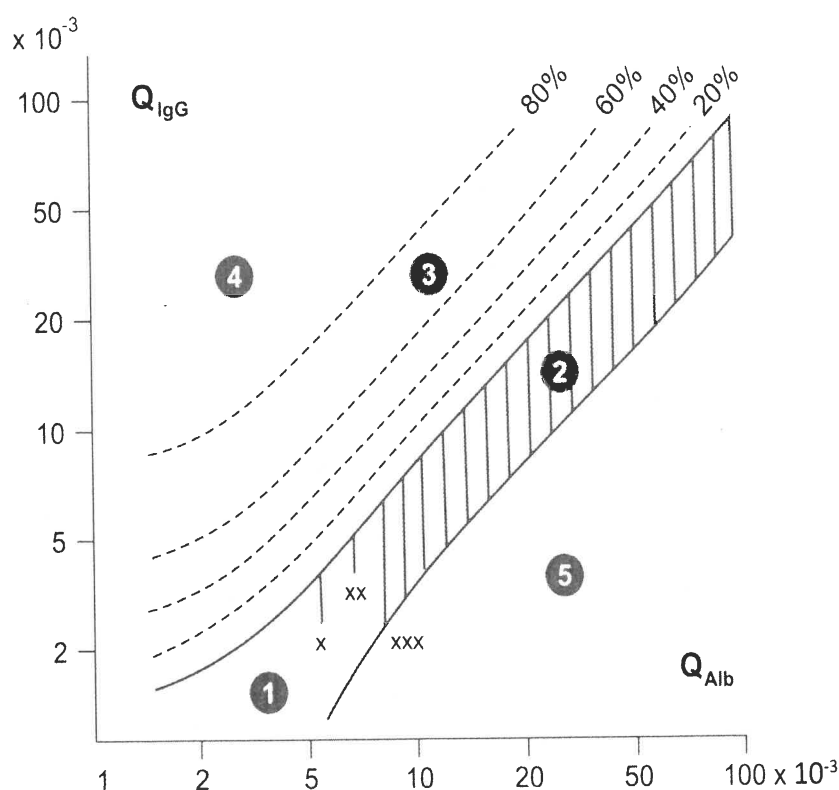
Un alt indice util în diagnostic este indicele Delpech – Lichtblau:

$Q_{IgG} / Q_{Alb} = [IgG]_{LCR} / [IgG]_{ser} \times [Alb]_{ser} / [Alb]_{LCR}$ , în mod normal fiind  $< 0,7$ . Creșterea acestui indice indică producție de IgG intratecal.

Tulburări ale permeabilității BHE pot fi evidențiate cu ajutorul diagramelor Reiber și Felgenhauer (Figura 8.1). Diagrama redă într-un sistem de coordonate  $Q_{IgG}$  față de  $Q_{Alb}$ , unde:

$$Q_{IgG} = [IgG]_{LCR} / [IgG]_{ser}$$

$$Q_{Alb} = [Alb]_{LCR} / [Alb]_{ser}$$



**Figura 8.1** Diagrama Reiber – Felgenhauer pentru diferențierea transferului proteic fiziologic prin BHE, de răspunsul umoral local (1 – domeniul de referință: x – grupa de vârstă  $< 15$  ani; xx pentru  $15 - 40$  ani; xxx pentru  $41-60$  ani; 2 – perturbări ale transferului prin BHE, fără sinteză locală de IgG; 3 - perturbări ale transferului prin BHE, cu sinteză adițională de IgG; 4 – sinteză locală de IgG, fără perturbări ale transferului prin BHE; 5 – fără semnificație clinică).

Valori sub domeniul de referință denotă un transfer pasiv prin BHE, în timp ce valori superioare intervalului fiziologic indică sinteză locală, intratecală (la nivelul SNC) de imunoglobuline. Diagrama nu poate fi utilizată dacă LCR conține mai mult de  $10^6$  hematii/L.

Raportul concentrațiilor imunoglobulinelor (Ig G, A, M) și albuminei între LCR și ser, sunt utilizate pentru diferențierea transportului pasiv de răspunsul imun umoral al SNC.

Într-o manieră simplificată (relativ ușor de determinat în practică), se folosește indexul proteic, obținut din raportul concentrațiilor proteinelor totale și al albuminei, în ser și LCR:

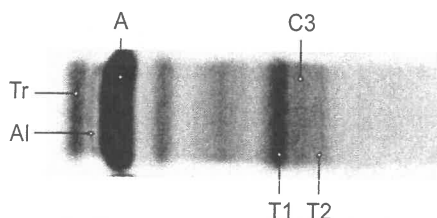
$$IP = \frac{[PT]_{LCR}}{[PT]_{ser}} \times \frac{[Alb]_{ser}}{[Alb]_{LCR}}$$

Creșteri ale acestui indice peste 0,6 denotă de obicei creșteri ale sintezei de imunoglobuline intratecal.

#### 8.4.4.1 Separarea electroforetică a proteinelor LCR

Pentru aprecierea producerii intratecale de imunoglobuline, se consideră actualmente că determinarea fracțiunilor electroforetice este mult mai valoroasă decât indicii proteici cantitativi. Corectitudinea indicilor depinde de acuratețea și precizia determinării concentrației tuturor proteinelor din formula lor, modificările semnificative survenind doar la creșteri substanțiale ale concentrației IgG în LCR.

Electroforeza LCR diferă de cea serică, atât din punctul de vedere al materialelor și soluțiilor folosite (se utilizează geluri cu rezoluție înaltă și coloranți cu sensibilitate superioară la concentrații mici de proteine), cât și a fracțiunilor obținute și a raportului dintre acestea (figurile 8.2, 8.3 și tabelul 8.1).



**Figura 8.2 Electroforeza lichidului cefalo-rahidian concentrat de 80-100 ori**

Tr - transtiretina (prealbumina), Al -  $\alpha_1$  lipoproteina, A - albumina, T1 - transferina din zona  $\beta_1$ , C3 - complement, T2 - transferina desializată din zona  $\beta_2$

Valorile fiziologice ale concentrațiilor fracțiunilor proteice din LCR (redate în tabelul 8.1) sunt distribuite în patru zone de mobilitate electroforetică.

##### 1. Zona albuminică:

- Transtiretina (Prealbumina) - în LCR are o concentrație crescută.
- Albumina este o fracțiune majoră analoagă cu cea din ser, dar care migrează ceva mai rapid.

##### 2. Zona $\alpha$ globulinică conține:

- $\alpha_1$  Lipoproteina poate să se suprapună peste albumină și să fie mascată de aceasta sau să migreze anodic față de albumină.
- $\alpha_1$  Antitripsina este ușor mai difuză decât în ser, datorită desializării acestui inhibitor proteazic.

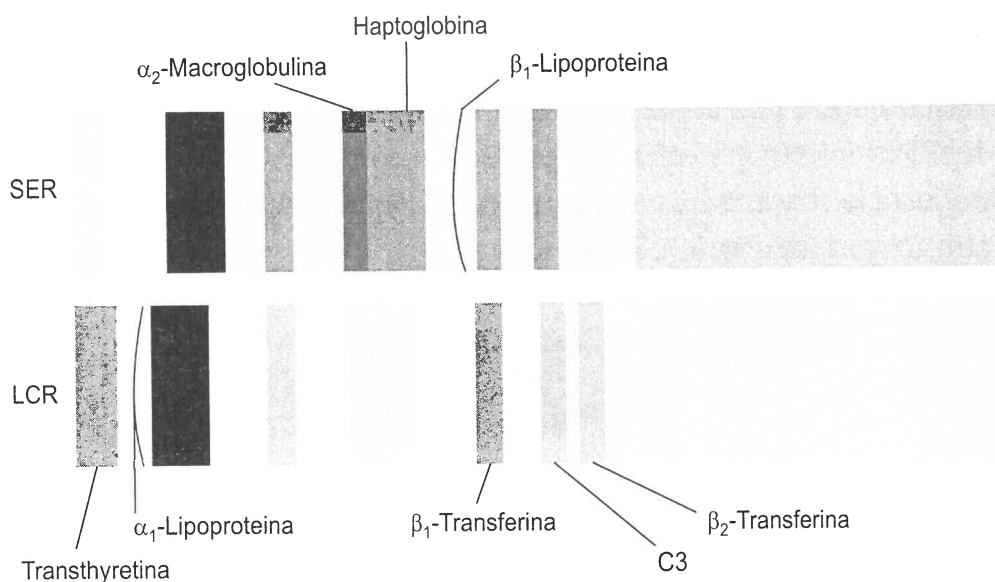
- Zona  $\alpha_2$  globulinică este slab colorată față de ser, deoarece  $\alpha_2$  macroglobulina și haptoglobina nu trec ușor în LCR (fiind proteine de talie mare). Dacă această zonă este intens colorată înseamnă că există o lezare serioasă a barierei hematoencefalice.

### 3. Zona $\beta$ globulinică cuprinde:

- Transferina așezată spre anod (zona  $\beta_1$ ), analoagă cu cea serică.
- Transferina desializată sau fără acid sialic (proteina  $\tau$  sau proteina cu deficiență de carbohidrați) rezultată prin pierderea rezidurilor terminale de acid sialic din lanțul lateral glucidic și plasată în zona  $\beta_2$ .
- C3 – o fracțiune discretă, așezată între cele două fracțiuni transferinice.

### 4. Zona $\gamma$ globulinică – în LCR-ul normal conține proteine puține chiar după concentrare.

- IgG prezintă o mai mică heterogenitate față de IgG seric.
- „Proteina  $\gamma$  în urme” neimunoglobulinică (Cystatina C), care se poate vizualiza în funcție de metoda de concentrare.



**Figura 8.3** Compararea schematică a fracțiunilor rezultate la electroforeza serului față de lichidul cefalo-rahidian concentrat

**Tabel 8.1** Intervalele fiziologice de concentrație ale principalelor fracțiuni proteice și proporția acestora în LCR

Fracțiunea	Unitate de măsură	
	mg/L	%
Pre Albumină	3 - 27	2-7
Albumină	82 - 330	56-76
Globuline	$\alpha_1$	3 - 30
	$\alpha_2$	6 - 36
	$\beta$	15 - 76
	$\gamma$	3 - 45

#### 8.4.4.2 Sinteza de imunoglobuline intratecal – benzile oligoclonale

Fracțiunile oligoclonale care se pot vedea pe electroforeza unui ser sau a LCR sunt produsul activității inflamatorii a sistemului imun. Sinteza intratecală de imunoglobuline se produce dacă limfocite B din sânge, migrează în țesutul nervos, unde sub acțiunea unor citokine inflamatorii locale, proliferază clonal și se transformă în plasmocite. Având în vedere numărul mult mai redus de clone rezultate la nivelul sistemului nervos, comparativ cu periferia, imunoglobulinele produse de acestea local se prezintă ca și “benzi” oligoclonale.

Actualmente indexul proteic cantitativ este surclasat de determinarea calitativă a benzilor oligoclonale, prin tehnici electroforetice de înaltă rezoluție și sensibilitate (de exemplu, focusarea izoelectrică - IEF), care evidențiază chiar creșteri ușoare (2-3%) ale concentrației IgG în LCR.

Traseul electroforetic al LCR normal este similar cu acela al serului diluat corespunzător – fără nici o bandare (vezi figura 8.4 tipul I). IgG „normale”, provenite din ser prin traversarea BHE, au un aspect omogen/difuz în zona gamma a traseului electroforetic.

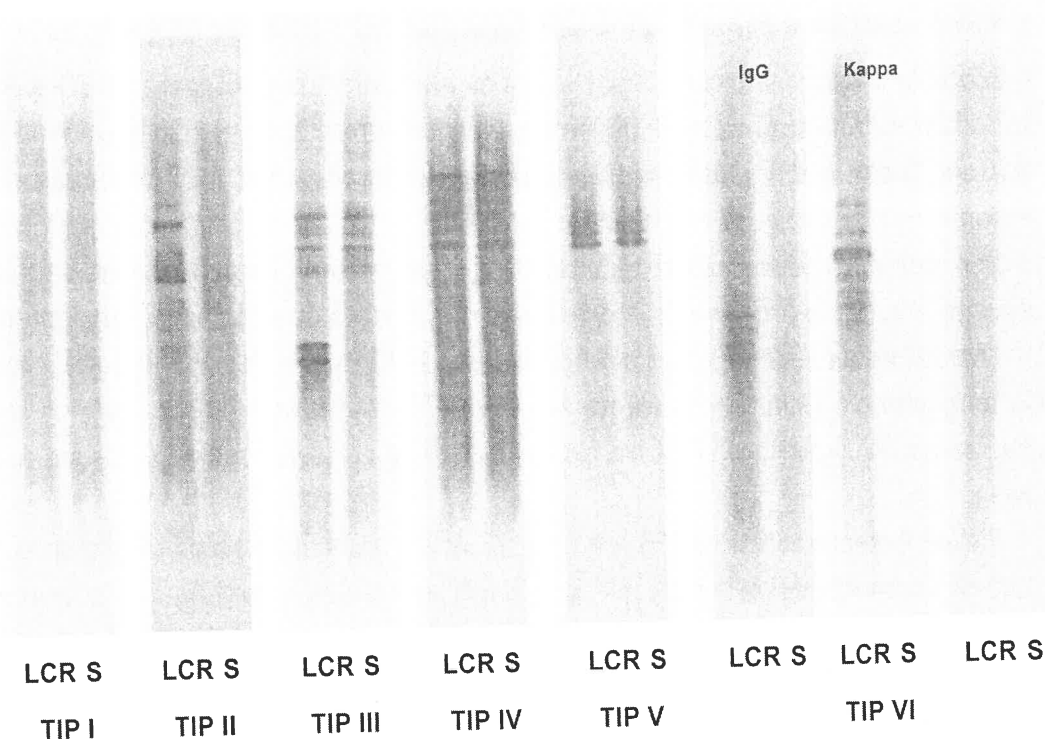
Efectuarea concomitentă a electroforezei proteinelor din ser și LCR la același pacient, prin comparare permite stabilirea etiologiei locale sau sistemice a creșterii imunoglobulinelor, precum și tipul oligo- sau monoclonal al imunoglobulinelor.

În patologii demielinizante, diagnosticul clinic (mai ales în formele incipiente) este adeseori dificil, însă până la 98% dintre pacienți prezintă benzi oligoclonale la separarea electroforetică a proteinelor din LCR (vezi figura 8.4 tipul II), care nu au corespondent în traseul electroforetic al proteinelor din ser. Standardul “de aur” pentru evidențierea benzilor oligoclonale IgG este focusarea izoelectrică, cuplată cu immunoblot. Benzile oligoclonale nu sunt specifice însă doar în scleroza multiplă, putând apare și în boli autoimune, proliferări maligne sau în diverse infecții la nivelul sistemului nervos (mai ales dacă creșterea proteinorahiei este semnificativă – peste 1 g/L).

Examenul clinic, RMN, în combinație cu evidențierea benzilor oligoclonale în LCR, sunt elemente decisive pentru diagnosticul sclerozei multiple. Determinări adiționale utile sunt potențialele evocate (semnale electrice generate ca răspuns la stimuli senzoriali) – studiate cel mai frecvent la nivelul nervului optic.

Pentru detectarea IgG oligoclonale s-au descris 6 tipuri de trasee, care presupun analiza pereche a LCR cu ser (figura 8.4):

1. **Tipul I** – fără benzi oligoclonale în LCR și/sau ser
2. **Tipul II** - bandări oligoclonale în LCR indicând sinteză locală de IgG, absente în ser - tipic pentru patologia demielinizantă (scleroză multiplă)
3. **Tipul III** - bandări oligoclonale în LCR și ser, cu benzi adiționale în LCR; cele comune în LCR și ser implică un răspuns inflamator sistemic, iar cele ce se găsesc în plus în LCR sugerează că există un răspuns adițional doar al sistemului nervos central (scleroză multiplă, lupus, sarcoidoză etc.)
4. **Tipul IV** (modelul în “ogindă”) - bandări oligoclonale identice în LCR și ser; se datorează transferului pasiv al IgG oligoclonale din ser în LCR, într-un răspuns inflamator sistemic (de ex. în sindrom Guillain-Barré).



**Figura 8.4** Modele standard de trasee de separare ale proteinelor din LCR și ser prin focalizare izoelectrică pe gel de agaroză, cuplat cu imunoblot.

Benzile oligoclonale prezente se datorează imunoglobinei G. LCR = lichid cefalorahidian; S = ser.

5. **Tipul V** - bandări monoclonale similare în LCR și ser, datorate unor proliferații maligne plasmocitare exterioare sistemului nervos (mielom multiplu, gamopatie monoclonală de semnificație nedeterminată).
6. **Tipul VI** – bandare monoclonală IgG prezentă doar în LCR, evidențiată cu anticorpi specifici de lanțuri grele gama și lanțuri ușoare de tip  $\kappa$  (o clonă dominantă sau prematură în evoluția unui răspuns local oligoclonal). Rar se datorează unui limfom local cu celulă B.

Pentru un diagnostic neurologic, de mare interes sunt tipurile I, II și III. Tipurile III și IV prezintă doar informații adiționale, deoarece bandările sunt specifice pentru un spectru larg de boli sistemice (polineuropatii, tumori, inflamații). Tipurile V și VI sunt mai puțin frecvente.

#### 8.4.4.3 Proteine specifice țesutului nervos

**Proteina acidă fibrilară glială (GFAP)** este o componentă a citoscheletului astrocitelor, eliberată din acestea în caz de liză sau reactivitate funcțională crescută.

**Familia de proteine S100** este exprimată în mod diferențiat de toate celulele din organismul nostru, funcția lor fiind dependentă de prezența ionului de calciu. La nivelul creierului celulele microgliale produc homodimerul S100 $\beta\beta$ , concentrația crescută a acestuia în LCR fiind asociată cu glioza. Monomerul S100 $\beta$  acționează ca o citokină, fiind eliberată din celulele microgliale în inflamații. În concentrații crescute poate induce apoptoza neuronală.

**Familia proteinelor 14-3-3** este alcătuită dintr-un grup de proteine citosolice (14-3-3 $\gamma$  fiind cea mai importantă izoformă în SNC) care interacționează reversibil cu un mare număr

de liganzi, având se pare rol de mesageri secunzi între receptorii membranari și o serie de precursori enzimatici intracelulari. Proteina 14-3-3 $\gamma$  a fost propusă ca marker de leziune neuronală, în patologii însoțite de leziuni acute/extinse (encefalite, puseele neurodegenerative din boala Creutzfeld-Jakob, sindroame paraneoplazice, etc).

**Proteina Tau** este o componentă a citoscheletului neuronal. Fosfolilarea proteinei este un proces enzimatic, prin care se controlează intensitatea de incorporare a proteinei în citoscheletul neuronal. Creșterea concentrației proteinei Tau în LCR a fost asociată cu diverse patologii neurodegenerative (în special cu boala Alzheimer).

Două fragmente proteolitice **A $\beta$ 1-40** și **A $\beta$ 1-42**, provenite prin scindarea proteinei amilodice A $\beta$ , sunt exprimate de aproape toate celulele sistemului nervos, fiind de fapt niște produși de catabolism. Fiind alcătuite din 40 / respectiv 42 aminoacizi, cele două componente amiloidice de talie mică, sunt forme solubile, ușor de eliminat. În anumite patologii neurodegenerative care conduc spre demență (inclusiv în boala Alzheimer), concentrația celor două fragmente este scăzută în LCR, aceasta fiind consecința unei proteolize aberante, care conduce la acumularea în spațiul extracelular a fragmentelor de amiloid mari - insolubile.

## 8.5 ANALIZA CITOLOGICĂ A LCR

Teoretic LCR nu conține elemente celulare ale seriei albe, în mod obișnuit se găsesc maximum 0-5 elemente celulare pe mm<sup>3</sup> la adult, acestea fiind limfocite și / sau monocite. Prezența granulocitelor (chiar și a unui singur element), are semnificație patologică.

În lichidul cefalorahidian se pot găsi celule de origine sanguină și foarte rar celule exfoliate din spațiul subarahnoidian. Elementele sanguine pot ajunge în LCR fie prin accident de puncție, fie din motive patologice. Contaminarea cu sânge datorată lezării accidentale a unui vas de sânge poate duce la interpretarea greșită (ca fiind o meningită). Pentru a diferenția natura patologică de cea „fiziologică” (prin lezarea unui vas sanguin în timpul puncției) se compară raportul sanguin număr leucocite / număr hematii din sângele periferic, cu același raport obținut din LCR. Dacă raportul este similar, probabil elementele figurate din LCR provin în urma lezării unui vas sanguin în timpul manevrei de recoltare a LCR. Dacă raportul leucocite/hematii este mai mare în LCR, leucocitoza poate avea originea în substanța nervoasă (fiind de natură infecțioasă de cele mai multe ori).

Numărătoarea elementelor sanguine se face în camera Fuchs-Rosenthal; știind că volumul camerei este de 3,2  $\mu$ l (16 mm<sup>2</sup> \* 0,2 mm), numărul total al elementelor numărate se împarte la 3 - se raportează la 1 mm<sup>3</sup> ( $\mu$ l).

Pentru examinarea celularității lichidului se folosește tehnica citologică (frotiu colorat). Pentru că lichidul cefalorahidian este foarte sărac celular, este obligatoriu să se concentreze prin centrifugare sau prin filtrare (Millipore filters, nucleopore filters sau Gelman filters). De obicei fixarea frotiurilor se face prin uscarea la aer și apoi cu alcool metilic absolut, rămânând integre toate elementele celulare, în timp ce dacă fixarea se face cu alcool 50% în flaconul în care a fost adusă proba, se distrug hematiile. Se poate folosi tehnica de colorare May-Grunwald-Giemsa (MGG), Papanicolaou, Hematoxină-Eozină sau Diff-Quik.

### 8.5.1 CELULARITATE NORMALĂ

În mod normal în lichid se găsesc câteva limfocite și câteva monocite, rar se pot întâlni celule endimare și celule cuboide exfoliate din plexurile coroide, dar pot fi găsite și condrocite sau celule din măduva osoasă (când acul de puncție ajunge în cartilaj sau în corpul vertebral). Când lichidul este recoltat din *cisterna magna* sau din ventricul, se pot găsi și celule nervoase.

La adult lichidul normal conține 0 - 5 celule/ mm<sup>3</sup>, iar la nou-născut pot fi găsite 8-10/ mm<sup>3</sup> (uneori chiar mai multe - 30 / mm<sup>3</sup>), în funcție de vârstă. În timp ce la adult majoritatea celulelor sunt limfocite, la nou-născut domină monocitele.

Celularitatea normală a LCR este reprezentată prin:

**1. Leucocite:** sunt prezente limfocite mici, mature (Figurile 8.5b), plasmocite.

**2. Celule mezenchimale** - polimorfe

**3. Celule mononucleate** sunt de mai multe tipuri:

- celula monocitoidă, asemănătoare monocitului sanguin, cu care are origine comună;
- celulă monocitoidă activată, mai mare, cu citoplasma slab delimitată, mai mult sau mai puțin bazofilă, vacuolată (aspect spumos), nucleu rotund sau ovalar, uneori excentric, cu capacitate fagocitară;
- celula macrofagă, asemănătoare celulei monocitoide activate, dar care conține material fagocitat (hematii, hemosiderină, leucocite, etc) - Figurile 8.6

**4. Celule exfoliate în spațiile lichidiene:**

- celula meningiană** - deși mare, se lizează ușor (pe froiuri poate apare redusă la unul sau mai mulți nuclei fusiformi);
- celula endimară** - cu citoplasma bazofilă, nucleu picnotic, excentric, asemănându-se cu plasmocitul, în grupuri de diferite mărimi;
- celula din plexul coroid** - apare în placcarde, mai rar izolată, având nucleu rotund și cromatina fin granulată.

**5. Celulele endimare** și cele din plexul coroid se găsesc mai frecvent în lichidul recoltat suboccipital sau ventricular.

### 8.5.2 CELULARITATE PATOLOGICĂ

**1. Hematiile** nu sunt prezente în mod normal în LCR. În cantități limitate pot apare printr-o posibilă antrenare cu acul de puncție (se apreciază că în 15-10% dintre puncții survine acest fenomen). Numeroase hematii se întâlnesc în:

- accident de puncție (vezi figura 8.5a),
- intervenție chirurgicală;
- traumatism;
- hemoragie cerebrală (vezi figura 8.7).

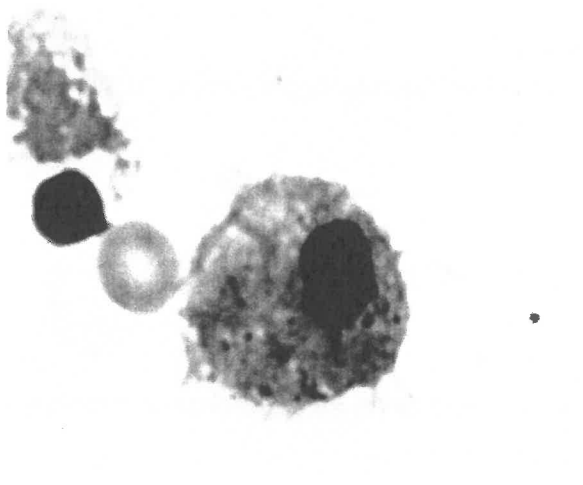
Hematiile persistă încă 12-18 ore după hemoragie, iar la 1-2 zile după hemoragie apar siderofagele, care persistă aproximativ 4 săptămâni.



**Figura 8.5a** Celularitate fiziologică în LCR (se observă un limfocit central-inferior; hematiile prezente, de aspect normal, se datorează puncției deficitare), preparat nativ în camera Fuchs-Rosenthal, MO x 400



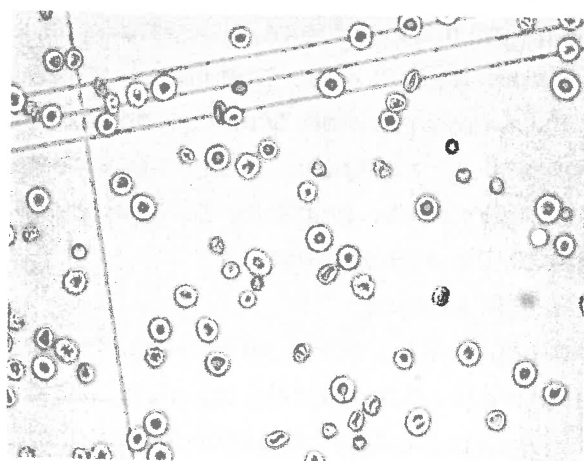
**Figura 8.5b** Componente celulare care apar în mod fiziologic în LCR: limfocite și monocite. (Giemsa X 400)



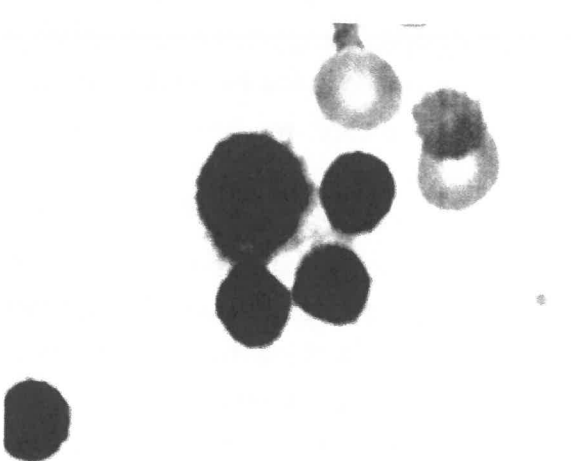
**Figura 8.6a** Macrofag cu material fagocitat, alături de un limfocit și o hematie în LCR. MGG x1000



**Figura 8.6b** Macrofag din LCR. Giemsa x 400



**Figura 8.7** Numeroase hematii în LCR-ul unui pacient cu hemoragie cerebrală (se observă atât hematii de aspect normal, cât și hematii în diverse stadii de degradare), MO x 200



**Figura 8.8** Numeroase limfocite și un monocit în LCR-ul unui pacient cu meningită virală, MGG x 1000

Figurile 8.5a, 8.6a, 8.7, 8.8 au fost obținute din cazuistica Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș, prin amabilitatea Biol. Spec. Nicoleta Pop, MLC. Figurile 8.5b, 8.6b au fost obținute din cazuistica Laboratorului Institutului Clinic Fundeni,, prin amabilitatea Biol. Spec. Ariadna Rădulescu.

**2. Limfocitele** în număr crescut indică:

- meningită virală (meningoencefalită) (figura 8.8);
- inflamație cronică nespecifică și specifică (meningita tuberculoasă);

**3. Granulocitele neutrofile** indică:

- proces inflamator acut în meningita bacteriană (figurile 8.9a, b și 8.9c);
- abces cerebral;
- unele forme de encefalită virală;
- uneori ca reacție la chimioterapie.

**4. Eozinofile sunt prezente în:**

- infecție parazitară (cisticercoză, coccidiomicoză, etc.);
- reacție la anumite medicamente;
- reacție la traumatism;
- uneori în neoplazie.

**5. Monocitele sunt:** elemente prezente ca răspuns la procesele patologice existente, uneori dobândesc funcție macrofagică (Figura 8.10).

**6. Plasmocite:** inflamație cronică (tuberculoză, cisticercoză, sifilis, SIDA, scleroză multiplă, boala Lyme)

**7. Macrofage sunt prezente în:**

- meningită;
- hemoragie subarahnoidiană, hemoragie intraventriculară;
- post inflamator;
- scleroză multiplă

**8. Lipofage:** indică distrugere de țesut nervos - hernie de disc, traumatism cranian, vasculită, meningită carcinomatoasă infiltrativă, tumori spinale.

**9. Celule gigante multinucleate** rar întâlnite în: SIDA, leucemie, limfom.

**Diverse tablouri citologice patologice în LCR** permit deducții etiologice (care necesită însă, desigur, completarea cu investigații de natură microbiologică, histopatologică, etc):

- **pleiocitoza cu neutrofile:** procese inflamatorii acute (meningite, encefalite, mielite, abcese cerebrale cu diverse microorganisme- Meningococ, Stafilococ, Pneumococ, Streptococ, Haemophilus influenzae etc.), tromboembolii cerebrale, debut de meningita tuberculoasă respectiv cu leptospire sau virusuri, procese de iritație după puncții, traumatisme etc.
- **pleiocitoza eozinofilă:** parazitoze, stări alergice.
- **pleiocitoza limfocitară** (limfoplasmocitară): procese inflamatorii (meningite virale, meningita luetică, cu leptospire, cu rickettsii, scleroza multiplă, faza de refacere a meningitelor bacteriene), procese de iritație meningiană (insolații, proces patologic de vecinătate).
- **pleiocitoza monocito-macrofagică:** accidente vasculare cerebrale, afecțiuni cu distrugeri de țesut nervos, procese de iritație meningeală.
- **pleiocitoza cu celule atipice:** neoplasme cerebrale primare (rare), metastaze cerebrale, leucemii.

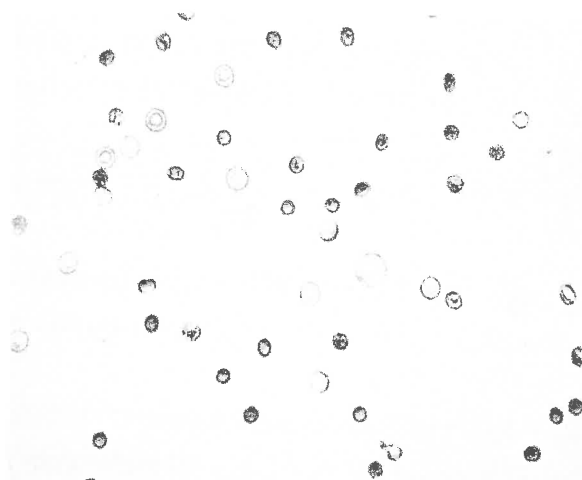


Figura 8.9a Numeroase hematii (proaspete și ratatinate) și un granulocit poziționat central – preparat LCR nativ. MO x 200

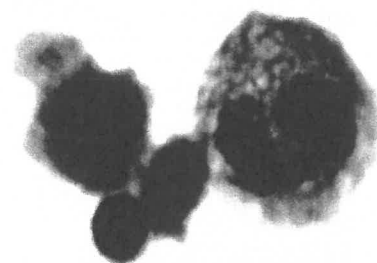


Figura 8.9b Granulocit alături de limfocite reactive, MGG x 1000

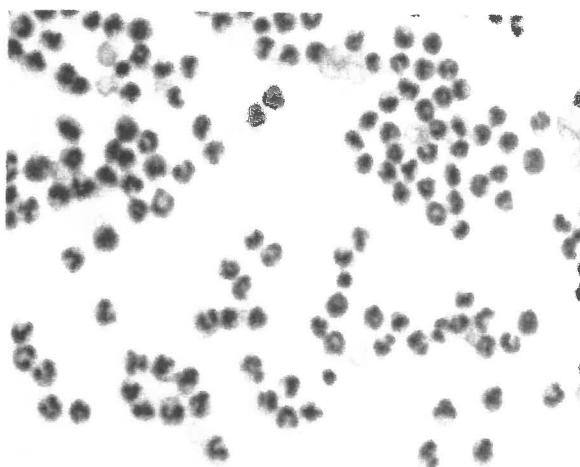


Figura 8.9c Numeroase granulocite neutrofile în LCR -citologie inflamatorie dintr-o meningită bacteriană. Giemsa x 400

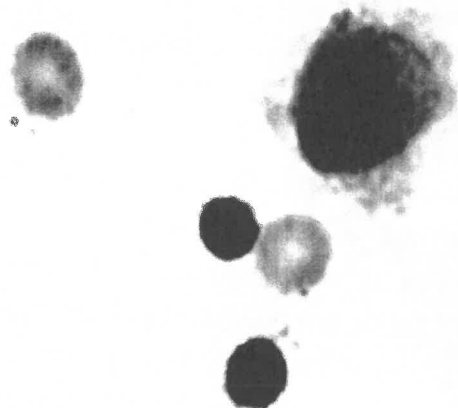


Figura 8.10 Limfocite și un monocit în transformare (+hematii ratatinate) în cazul unei meningite cronice, MGG x 1000.

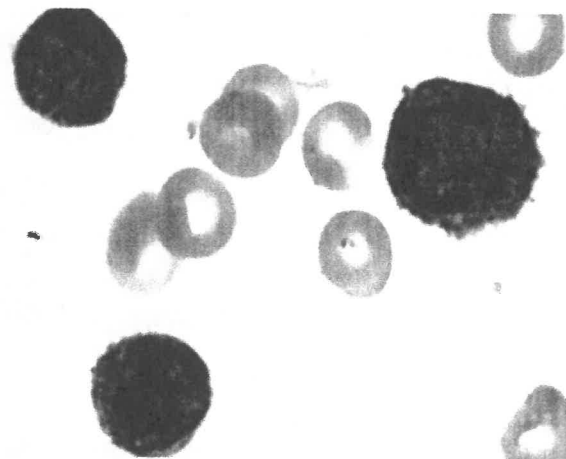


Figura 8.11 Limfocite și celule atipice (limfoblaști) evidențiați în LCR-ul unui pacient cu LLA diseminată la nivelul SNC, MGG x 1000

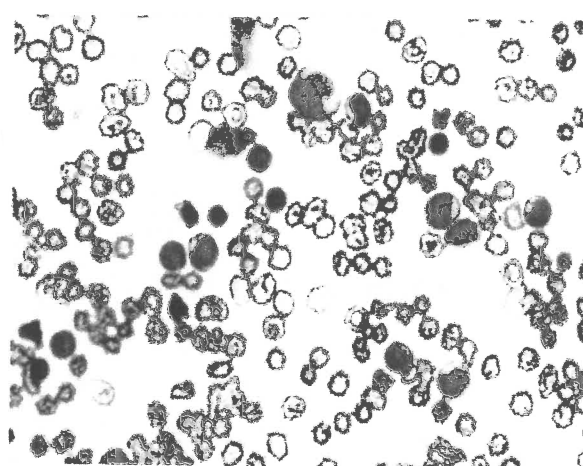


Figura 8.12 Limfoblaști evidențiați în LCR-ul unui pacient cu limfom malign. (Giemsa X 400)

Figurile 8.9a, 8.9b, 8.10 și 8.11 au fost obținute din cazuistica Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș, prin amabilitatea Biol. Spec. Nicoleta Pop, MLC. Figurile 8.9c și 8.12 au fost obținute din cazuistica Laboratorului Institutului Clinic Fundeni, prin amabilitatea Biol. Spec. Ariadna Rădulescu.

Examenul microscopic evidențiază parazitul în meningoencefalitele cu *Tripanosoma*, în preparatul proaspăt și în cel colorat panoptic. Rareori se pot întâlni amoebe (meningoencefalite amoebiene primitive) sau filarii.

### 8.5.3 CELULARITATE PATOLOGICĂ, MALIGNĂ

Tumorile localizate la nivelul sistemului nervos central pot fi tumori primare sau tumori secundare. Celule cu caractere de malignitate se vor găsi în LCR, dacă tumora se află aproape de spațiile ocupate de acesta.

În neoplazie, în LCR, apar în general puține celule maligne, spre deosebire de lichidul de ascită și pleural, însă în cazul limfomului sau leucemiei se pot găsi mai multe celule.

Cu semnificație pentru malignitate sunt celulele care în mod normal nu sunt tipice spațiului subarahnoidian și care prezintă anumite caracteristici. Celulele sunt mărite, inegale, izolate și grupate, cu nucleu mărit de volum, inegali, situați central sau excentric, contur neregulat, afinitate tinctorială ridicată, carioplasma neuniformă, grunjoasă, uneori cu nucleoli atipici, citoplasma bazofilă, uneori cu vacuolizări. În afară de celulele neoplazice se pot găsi hematii, limfocite eozinofile, granulocite neutrofile și foarte rar celule gigante multinucleate.

Tumori primare ale SNC sunt: astrocitomul, meduloblastomul, ependimomul, meningiomul, sarcomul meningeal.

Dintre tumorile secundare amintim: leucemia, limfomul, carcinomul, melanomul și metastaze de adenocarcinom (vezi figurile 8.11, 8.12).

În spațiul subarahnoidian se găsesc celule neoplazice la 5 – 8 % dintre pacienții cu cancer; în leptomeninge se dezvoltă metastaze la 11% dintre cei cu cancer pulmonar și 20% dintre cei cu melanom.

Sensibilitatea examenului citologic depinde de mai mulți factori:

- cantitatea de lichid examinat
- numărul de probe examinate
- locul de unde este prelevată proba (rezultatele pozitive ale lichidului cisternal sau ventricular, de multe ori pot fi obținute după rezultate negative ale lichidului obținut prin puncție lombară).

## 8.6 PROTOCOL PRACTIC PENTRU EXAMENUL LCR

1. Se descrie aspectul macroscopic al LCR, (opalescent, hemoragic, consistența, flocoane etc) cantitatea produsului patologic
2. Se resuspendă celulele pentru preparatul microscopic nativ
3. Se încarcă camera de numărare Fuchs-Rosenthal, se așteaptă 3-4 minute, pentru ca elementele să se așeze, se numără separat hematiile (se determină procentul de hematii proaspete / hematii ratatinate), separat leucocitele, separat alte elemente celulare
4. Se centrifughează minim 1-2 ml de LCR la 120xg, 10-15 minute, se descrie aspectul supernatantului

5. Din supernatant se efectuează:
  - Proteinorahia cantitativă
  - Glicorahia
  - Clororahia
6. Se decantează supernatantul, având grijă să nu fie antrenate celule, lăsând o cantitate de circa 40 - 50 de microlitri; se resuspendă celulele cu mișcări fin-rotative
7. Se efectuează 2-3 frotiuri :
  - uscare la temperatura camerei 24 h
  - colorația panoptică a frotiurilor (May-Grunwald Giemsa),
  - examinare frotiuri la microscop cu obiectivul 40x și apoi cu 100x (se vor număra 100 de leucocite și se va determina procentul lor).

### Bibliografie selectivă

1. Bigner S.H., Carter A.L., Central Nervous System, Bibbo M., Wilbur D.C., Comprehensive Cytopatology, Expert Consult Online + Print, Ed. 3, Saunders/Elsevier, 2008, cap.16, pag. 439-452.
2. Bullock B., Rosendahl P.P.: Pathophysiology, Lippincott Company Ed, Philadelphia, 1992.
3. Cibas E.S., Cerebrospinal Fluid, Cibas E.S., Ducatman B.S., Cytology, Diagnostic Principles and Clinical Correlates, Expert Consult Online + Print, Ed. 3, 2009, cap. 6, pag. 171-193.
4. Diesenhammer E., Bartos A., Egg R., Gilhus N.E., Giovannoni G., Ranez S., Sellebjerg F., Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis, cap. 4, EFNS European Journal of Neurology, 2006, 6/29, pag. 20-22.
5. European Handbook of Neurological Management, vol.1, 2nd Edition, Edited by Gilhus NE, Barnes MP, Brainin M, Blackwell Publishing Ltd, Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, Sellebjerg F, Tumani H, Routine cerebrospinal fluid (CSF)analysis, 2011, 5-15.
6. Fischbach F. Cerebrospinal Fluid Studies. In A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. Lippincott Williams & Wilkins, 8th Ed., 2009, 333-335.
7. Freedman M. S., Thompson E. J., Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G., Keir G., Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis A Consensus Statement, Arch Neurol. 2005;62:865-870.
8. Handbook of Clinical Neurology, Ed.D.S.Goodin, Elsevier B.V.Amsterdam, Multiple Sclerosis and Related Disorders, chapter 30, Cerebrospinal fluid analysis, 2014, 681-702.
9. Hühmer AF, Biringer RG, Amato H, Fonteh AN, Harrington MG, Protein analysis in human cerebrospinal fluid, Physiological aspects, current progress and future challenges, Disease Markers 2006, 22, 3-26.
10. Karen DF, Protein electrophoresis in clinical diagnosis, Arnold E (Publishers) Ltd, Approach to pattern interpretation in cerebrospinal fluid, 2003, 259-277.
11. Keir G, Chadwick C. – Investigation of cerebrospinal fluid, Chapter 34 in Marshall W., Lapsley M., Day A.P., Ayling R. – Clinical Biochemistry – Metabolic and Clinical Aspects, Ed. 3, ELSEVIER, 2014, p.660-672.
12. Koss L.G., Melamed M.R., Cerebrospinal Fluid, Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases, Ed. 5, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia , 2006, pag. 1023-1045.

13. Privitera MD, Zakaria T, Khatri R – Nervous System, Chapter 47 in Kaplan A.L., Pesce J.A. – Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation, Ed.5, Mosby ELSEVIER, 2010, p. 904-928.
14. Țiteica M., Halunga-Marinescu S.: Practica laboratorului clinic, Editura Academiei, R.S.R.1984.
15. Verbeek Marcel M., de Reus Herman P.M. and Weykamp Cas W., Comparison of Methods for the Detection of Oligoclonal IgG Bands in Cerebrospinal Fluid and Serum: Results of the Dutch Quality Control Survey, Clinical Chemistry, 2002, 48, 1578-1580.

# 9

## Patochimia funcțiilor renale

Minodora Dobreanu, Ileana Funduc,  
Annamaria Földes

Rinichii au roluri fundamentale în menținerea homeostaziei mediului intern, prin excreția unor produși de degradare dispensabili și conservarea altora; participă de asemenea la reglarea presiunii arteriale și a eritropoezei. Principalele funcții ale rinichiului sunt:

- **Funcția excretorie** - de eliminare prin urină a unor produși de metabolism solubili, nevolatili (uree, creatinină, acid uric, bilirubină, electroliți, metaboliții diverșilor hormoni etc.), precum și a unor substanțe străine (medicamente, aditivi alimentari), metabolizate prin enzimele xenobiotice;
- **Funcția homeostatică** - de menținere constantă a volumelor, osmolarității, compoziției organismului și a echilibrului hidro-electrolitic. De asemenea, participă la reglarea echilibrului acido-bazic în cooperare cu plămânul și cu diverse sisteme tampon extracelulare;
- **Funcția endocrino-umorală** - prin biosinteza unor produși cu rol reglator: renina, eritropoetina, 1,25-dihidroxi-colecalciferolul. *Renina* este sintetizată de celulele mioepiteliale (granulare) din peretele arteriolei aferente aflată în structura aparatului juxtaglomerular; este componentă a sistemului renină-angiotensină-aldosteron (RAA), având rol deosebit în homeostazia presiunii arteriale. *Eritropoetina* este un hormon peptidic elaborat în interstițiul renal de celulele endoteliale, fibroblaști și realizează homeostazia hematopoetică. În lipsa eritropoetinei apare anemia renală. *1,25-dihidroxi-colecalciferolul* e forma activă a vitaminei D cu rol în homeostazia fosfo-calcică.
- **Funcția metabolică** - de catabolizare a unor hormoni polipeptidici (insulină, glucagon, PTH, gastrină, vasopresină) și de gluconeogeneză.

### 9.1 ELEMENTE DE STRUCTURĂ RENALĂ

Pe o secțiune longitudinală rinichiul este format din:

- **sinusul renal** - care conține calicele și porțiunea superioară a pelvisului renal;
- **parenchimul renal** - care acoperă sinusul pe toate părțile, cu excepția hilului. Se disting corticala (*cortex renis*) și medulara (*medulla renis*). Corticala se află dispusă la periferia organului cu o grosime de aproximativ 10 mm. Medulara este alcătuită

din structuri conice numite piramidele lui Malpighi, care sunt direcționate cu baza spre suprafața organului și vârfurile spre sinus.

Unitatea morfo-funcțională renală este *nefronul*. La om fiecare rinichi posedă aproximativ 1 milion de nefroni. Nefronul este compus din glomerulul renal și tubul renal. Glomerulii renali se află dispuși la nivelul corticalei. Capsula Bowman se continuă cu tubul contort proximal (TCP). Apoi, tubul coboară în piramidă, formează ansa Henle și se întoarce în corticală. Segmentul terminal al tubului renal drenează în tubul colector, care primește mai mulți tubi și traversează în linie dreaptă corticala și medulara. Schema structurală a nefronului este prezentată în Figura 9.1.

### 9.1.1 GLOMERULUL RENAL

Are forma unei sfere cu diametrul de 200  $\mu\text{m}$ , care posedă un pol vascular - în care intră arteriola aferentă și iese arteriola eferentă - și un pol urinar care se continuă cu TCP.

Glomerulul este compus din:

1. o rețea capilară căptușită cu un strat subțire de celule endoteliale;
2. o regiune centrală în care se află celule mezangiale;
3. celule epiteliale viscerale ale capsulei Bowman și membrana bazală asociată acestora;
4. stratul parietal al capsulei Bowman cu membrana sa bazală.

Între straturile epiteliale există spațiul Bowman (spațiul urinar) care se continuă cu TCP. Capilarele glomerulare sunt tapetate cu un endoteliu fenestrat subțire. Nucleul celulelor

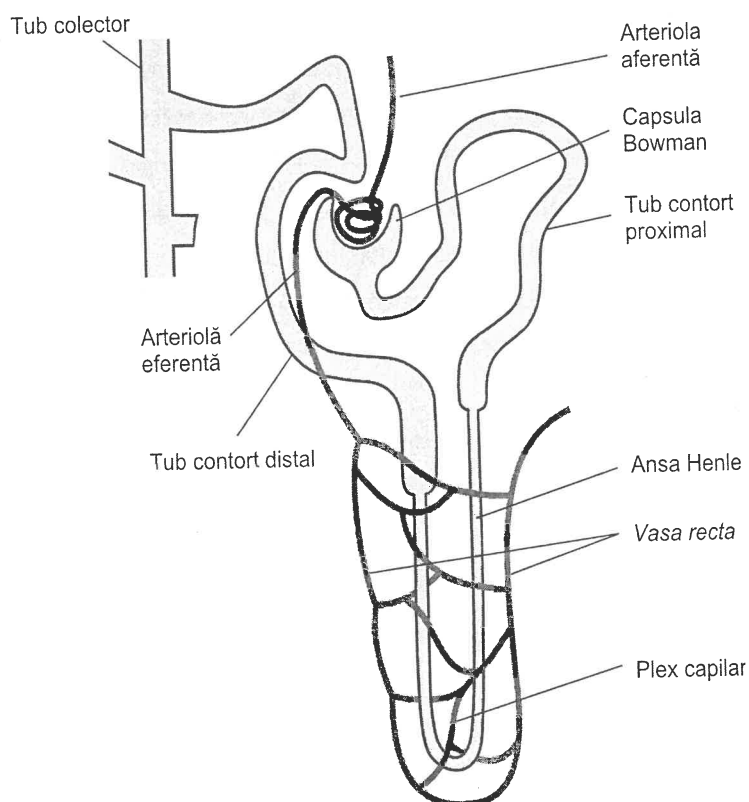


Figura 9.1 Structura schematică a nefronului

endoteliale e adiacent mezangiului. Celulele endoteliale au suprafața electronegativă, reprezentând o barieră împotriva trecerii constituenților sanguini macromoleculari anionici din lumenul capilar în spațiul Bowman. Membrana bazală glomerulară (MBG) este alcătuită din trei straturi: unul central- *lamina densa*, două straturi mai puțin dense electronomicroscopic - *lamina rara* interna și externa. Celulele epiteliale viscerale ale capsulei Bowman se numesc podocite și posedă niște prelungiri citoplasmatiche care se divid în procese pediculate numite pedicele („piciorușe”). Celulele epiteliale parietale sunt celule scuamoase și formează peretele extern al capsulei Bowman; se continuă brusc cu celulele cilindrice ale TCP.

Pentru a traversa peretele capilar, o moleculă trebuie să treacă prin endoteliul fenestrat, membrana bazală glomerulară și diafragma epitelială a capsulei Bowman. Celulele mezangiale dețin proprietăți de celulă musculară netedă, jucând rol contractil și fagocitar.

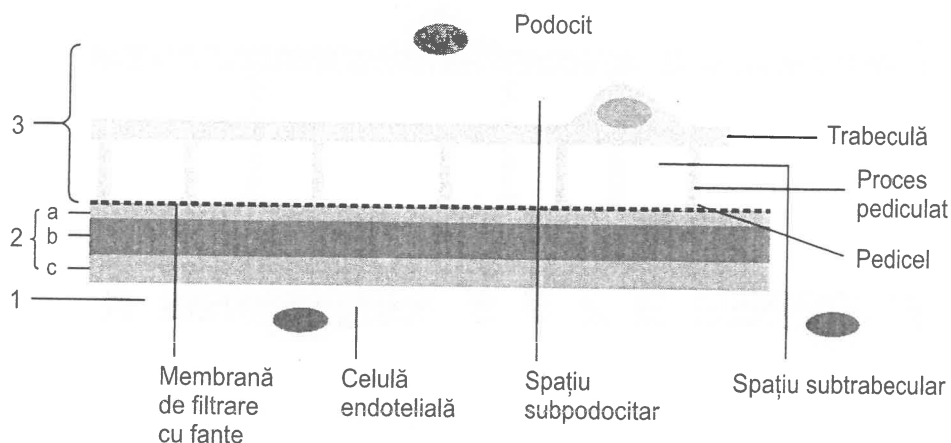
Filtrarea lichidului plasmatic are loc în glomeruli prin 3 straturi poroase, suprafața filtrantă glomerulară fiind de  $1,56 \text{ m}^2$ . Primul strat filtrant, endoteliul capilar, are lacune intercelulare cu diametrul între 50 - 100 nm; diametrul porilor membranelor bazale glucozaminoglicanice pericapilare este între 3 - 7 nm, iar stratul epitelial extern al capsulei Bowman dispune de pori, având diametrul între 20 - 50 nm (Figura 9.2).

La presiunea filtrantă efectivă (35 - 45 mbar), prin acești pori pot traversa apa, ionii și substanțele organice cu molecularitate redusă. Proteinele se filtrează selectiv, în funcție de masele lor moleculare, iar elementele figurate (hematiile) se rețin în sânge, cu excepția PMN și a macrofagelor, capabile de diapedeză.

### 9.1.2 TUBUL RENAL

Este constituit din trei porțiuni: TCP, ansa Henle (cu ramura descendentă subțire care se curbează și se continuă cu ramura ascendentă subțire și apoi groasă) și TCD. Mai mulți tubi renali se varsă într-un tub colector.

**Tubul contort proximal (TCP)** al nefronului este format dintr-un strat de celule epiteliale cilindrice, având marginea „în perie” spre lumen și un labirint bazal spre vasa recta, locali-



**Figura 9.2** Filtrul renal – schema: 1. strat endotelial intern (*lamina fenestrata*); 2. MBG cu: a. *lamina rara externa*; b. *lamina densa*; c. *lamina rara interna*; 3. strat epitelial extern podocitar.

zate în jurul tubilor în urma recapilarizării vasului eferent. Aceste celule posedă numeroase mitocondrii și joncțiuni intercelulare puțin etanșe. La nivelul TCP :

- se reabsorb izoosmotic două treimi din apa filtratului glomerular;
- se reabsorb complet: glucoza, aminoacizii, proteinele,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ , vitamina C;
- se reabsoarbe 75% din  $\text{Na}^+$  filtrat;
- se reabsorb la un nivel mai redus decât apa: urea (50%), acidul uric, fosfații (70%) și sulfații (60%) (Tabel 9.I);
- se secretă histamină, acid hipuric, creatinină.

**Ansa Henle** este continuarea spre pylon a tubului contort proximal. În rinichi există două populații principale de nefroni: 85% din nefroni au ansa Henle scurtă (acești nefroni își au originea în glomerulii de suprafață și din mijlocul cortexului, vârful ansei oprindu-se în cortexul renal), iar 15% din nefroni au ansa Henle lungă (cu originea în glomerulii juxta-medulari localizați lângă joncțiunea cortico-medulară, ansa Henle pătrunzând în medulara internă). Ramura descendentă a ansei Henle posedă celule epiteliale aplatizate cu puțini microvili, mitocondrii rare, joncțiuni permeabile (zona fiind de transport pasiv pentru apă și electroliți), iar în ramura ascendentă celulele sunt cubice, fără vili, bogate în mitocondrii, joncțiuni bine organizate, cu posibilități de transport activ al ionilor:

- porțiunea descendentă este foarte permeabilă pentru apă și moderat permeabilă pentru uree și  $\text{Na}^+$ ;
- porțiunea ascendentă subțire e foarte puțin permeabilă pentru apă și mult mai permeabilă pentru uree;
- porțiunea ascendentă groasă este special adaptată transportului activ al ionilor de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ . Interstițiul devine hiperosmotic, iar urina din lumen hipoosmotică. La acest proces de creștere a osmolarității interstițiului medular participă și difuziunea ureei din tubii colectori în interstițiu. Segmentul gros e impermeabil pentru apă și uree (Tabelul 9.I).

**Tabelul 9.I Localizarea proceselor de reabsorbție și secreție în tubii renali**

Nr.	Segmentele tubulare	Reabsorbția tubulară	Secreția tubulară
1.	TCP	- 100% glucoza, proteinele, $\text{HCO}_3^-$ , $\text{K}^+$ , vitamina C, aminoacizii, hemoglobina; - 75% $\text{Na}^+$ ; - 70% apa; - 60% ureea; - $\text{Cl}^-$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , acidul uric, fosfați, sulfați	- acidul hipuric; - acizi organici; - ureea; - creatinina; - histamina
2.	Segment descendent ansă Henle	- apa	
3.	Segment ascendent ansă Henle	- $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	
4.	TCD	- ureea, proteinele; - $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , apa, $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{HCO}_3^-$ ; - baze și acizi organici	- acidul uric; - $\text{H}^+$ ; - $\text{NH}_3$
5.	Tubul colector	- ureea; - $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , apa, $\text{K}^+$	- $\text{H}^+$ , $\text{NH}_3$ ; - $\text{K}^+$

**Tubul contort distal (TCD)** este format din celule epiteliale plate, fără microvili și cu un labirint bazal mai puțin dezvoltat; celulele posedă numeroase mitocondrii dispuse în palisadă, iar complexe joncționale sunt bine dezvoltate. De la nivelul părții ascendente a ansei, tubul se întoarce în corticală. O grupă de celule, alcătuind macula densa a tubului contort distal, sunt așezate în strânsa apropiere a celulelor mioepiteliale din peretele vasului aferent. Din corticală, sub forma tubului colector, coboară din nou în medulară. În TCD se reabsorb majoritatea ionilor, dar este impermeabil pentru apă și uree. Totuși, sub influența aldosteronului, TCD devine permeabil pentru ionii de  $\text{Na}^+$  și concomitent se creează un gradient electrochimic ce antrenează secreția ionilor de  $\text{K}^+$  și  $\text{H}^+$  în lumenul tubular. Amoniacul ( $\text{NH}_3$ ) este, de asemenea, secretat în TCD și în combinație cu ionii de  $\text{H}^+$  se excretă sub formă de ioni amoniu ( $\text{NH}_4^+$ ) (Tabelul 9.I).

**Tubii colectori** au celule epiteliale plate. Prin confluență mai mulți tubi colectori se adună într-un singur tub comun, care se deschide în bazinetul renal, la vârful câte unei piramide renale. Pereții tubilor colectori sunt permeabili față de apă numai în prezența hormonului antidiuretic (ADH); din lichidul hipoosmotic intratubular, apa trece spontan (fără nici un aport energetic) în interstițiul hiperosmotic, ducând la concentrarea urinei definitive. În caz contrar, se elimină o urină diluată și voluminoasă. Ductele colectoare prezintă permeabilitate pentru uree, de aceea o parte din uree se absoarbe în medula renală. Dar cea mai mare parte din uree retrodifuzează în ansa Henle, revenind apoi în ductele colectoare de unde este excretată în final. Tot în acest segment se secretă ioni de  $\text{H}^+$  cu rol în menținerea echilibrului acido-bazic (Tabelul 9.I).

În timp ce TCP este responsabil de reabsorbția masivă din filtratul glomerular, TCD exercită un control fin asupra compoziției fluidului tubular în concordanță cu necesitățile organismului.

### 9.1.3 APARATUL JUXTAGLOMERULAR RENAL

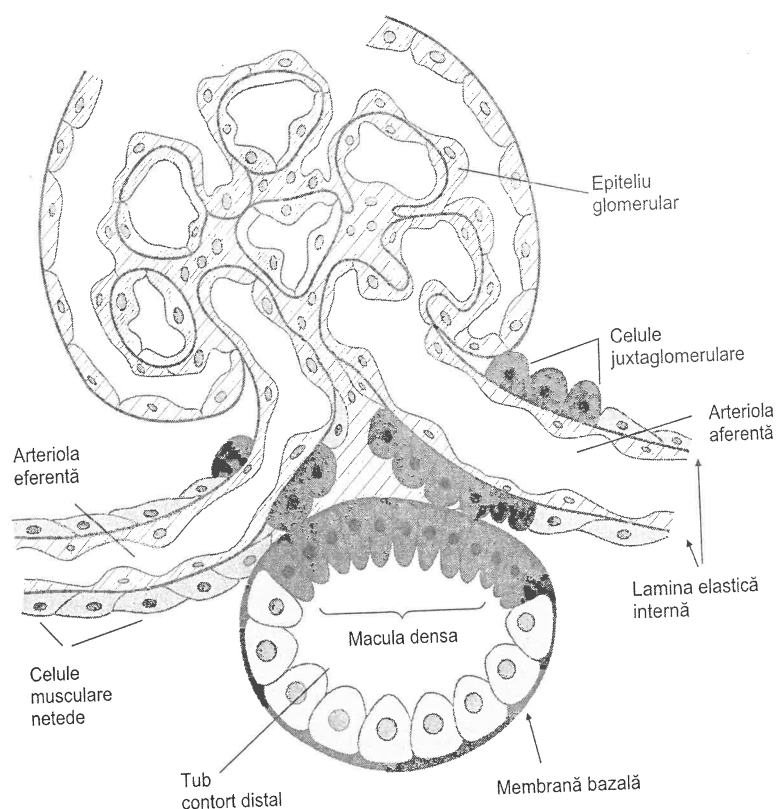
Descris de Goormaghtigh, este alcătuit dintr-o componentă vasculară și una tubulară (Figura 9.3). Produce, depozitează și secretă doi factori renali: *renina* și *eritropoietina* - glicoproteina purtătoare de semnale.

**Componenta vasculară** este formată din porțiunea terminală a arteriolei aferente, porțiunea inițială a arteriolei eferente și regiunea mezangială extraglomerulară (*lacis*). În componenta vasculară intră două tipuri de celule: celulele juxtaglomerulare granulare (mioepiteliale) ce secretă renina și celulele mezangiale extraglomerulare agranulare (celulele lacisului sau celulele *polkissen* ale lui Goormaghtigh). Lacisul se învecinează cu celulele *maculei densa*.

**Componenta tubulară** este *macula densa*, reprezentată de porțiunea tubului contort distal (TCD) care vine în contact cu componenta vasculară.

### 9.1.4 SISTEMUL VASCULAR RENAL

Artera renală se ramifică în hilul renal în artere destinate fiecărei zone a rinichiului: artere polare superioare, artere centrale și artere polare inferioare. În parenchimul renal, aceste artere trec printre piramidele renale (lobi renali), fiind denumite *artere interlobare*. La baza



**Figura 9.3 Aparatul juxtaglomerular renal**

piramidei și la jonțiunea medulare cu corticala se formează *arterele arciforme* ce dau naștere *arterelor interlobulare*, care străpung corticala. Fiecare arteră interlobulară generează *vasul aferent*, care printr-o primă capilarizare formează câte un glomerul renal, învelit de capsula epitelială a lui Bowman. *Vasul eferent*, emergent din glomerul, se recapilarizează, formând *vasa recta* din jurul anselor Henle. Venele, adunând sângele acestor vase, prin confluență, formează *vene recta*, *vene arcuate*, *vene interlobare* și în sfârșit, *vena renală*. Rinchii dispun și de o rețea limfatică bogată.

#### 9.1.4.1 Fluxul sanguin renal

Prin cele două artere renale, desprinse direct din aorta abdominală, rinichii au o irigare sanguină abundentă: din debitul cardiac 20% trece în fiecare minut prin rinichi. Acest volum se numește fluxul sanguin renal (FSR). Cunoscând valoarea hematocritului, se poate calcula și fluxul plasmatic renal [ $FPR = FSR \times (1 - \text{hematocrit})$ ], având valoarea normală între 600 - 650 ml/minut. În comparație cu valoarea medie de 65 - 75 mmHg a presiunii sanguine intraarteriale renale, presiunea capilară glomerulară este de 55 - 60 mmHg. Din această valoare trebuie să fie scăzută presiunea intracapsulară renală de 27 - 28 mmHg, rămânând astfel presiunea efectivă de filtrare PEF (presiunea capilară - presiunea intracapsulară) = 28 - 32 mmHg. Datorită autoreglării circulației renale, valoarea presiunii efective de filtrare rămâne constantă în ciuda variațiilor însemnate (între 60 - 150 mmHg) ale presiunii arteriale sistemice. Scăderea presiunii efective de filtrare, manifestată prin tulburarea metabolismului energetic sau scăderea excesivă a presiunii sistemice (colaps, hemoragie), duce la scoaterea din funcție a autoreglării și la oprirea filtrării glomerulare.

Circulația renală medulară: din volumul total al FSR 88 % trec prin stratul cortical și 12 % prin zona medulară, din care 11 % prin cea externă și 1 % prin cea internă. În caz de concentrare a urinei debitul circulației medulare scade, în cazul diluției, crește. În aprecierea epurării renale, din valoarea fluxului sanguin și plasmatic trebuie scăzută valoarea debitului circulației medulare.

Consumul de oxigen al rinichilor este însemnat (15 - 20 mmol/min, ceea ce reprezintă 5 - 8 % din consumul total de oxigen al organismului), deși diferența presiunii parțiale ( $pO_2$ ) a oxigenului între sângele arterei și venei renale este de numai 1 - 2 %.

#### 9.1.4.2 Reglarea fluxului sanguin renal

Fluxul sanguin renal este responsabil de filtrarea și excreția unor produși finali de metabolism (ca ureea și creatinina), de adaptarea rapidă a excreției de apă și electroliți în funcție de aportul acestora și de compoziția organismului, servește ca rezervă funcțională hemodinamică (1L/ min) în caz de urgență extremă. În șoc FSR poate fi redus la nivele foarte scăzute cu scopul susținerii fluxului sanguin spre alte organe - cord, creier (dacă însă situația se prelungește, pot rezulta leziuni renale severe). Reglarea fluxului sanguin renal este realizată de factori externi și umorali, precum și de un mecanism intrinsec de autoreglare. Activarea nervilor simpatici renali, descărcarea de adrenalină și noradrenalină vor genera vasoconstricție renală. Hipoxia, anxietatea și schimbările posturale activează reflexul chemoreceptor cu scăderea FSR. De asemenea, barbituricele și anestezicele diminuează FSR.

Autoreglarea intervine la valori ale presiunii arteriale medii situate în intervalul 70-210 mmHg, când FSR și RFG rămân aproape constante, în ciuda variațiilor presionale sanguine. Survine la nivelul arteriolei aferente, printr-un mecanism de feed back tubulo-glomerular declanșat de variațiile cantității de apă și de  $Na^+$  care vin în contact cu componentele aparatului juxtaglomerular (vezi sistemul RAA). Celulele juxtaglomerulare sintetizează și depozitează în citoplasma lor, sub formă de granule, o enzimă proteolitică numită renină. În cazul scăderii fluxului sanguin renal sau a conținutului în sodiu al tubului contort distal, renina se eliberează prin degranulare (consecință a scăderii calciului intracelular). Această protează descompune o proteină plasmatică  $\alpha$ -2-globulinică (de origine hepatică), numită angiotensinogen, cu eliberarea unui decapeptid, numit angiotensină- I. Aceasta este încă inactivă, dar sub acțiunea unei alte peptidaze produse în plămân, numită angiotensinază sau convertază (Angiotensin Converting Enzyme, ACE), prin eliberarea proteolitică a doi aminoacizi terminali, se transformă într-un octapeptid, numit **angiotensină-II** (AT II), care este purtătorul de semnal propriu-zis al sistemului osmoreglator.

Acțiunea vasoconstrictoare a angiotensinei-II se manifestă pe de o parte la nivelul pereților arteriolelor eferente (reduce fluxul sanguin renal, menținând filtrarea), ducând la menținerea presiunii arteriale sistemice. Pe de altă parte, stimulează puternic producția de aldosteron în celulele zonei glomerulare a corticosuprarenalei. Nivele plasmatice crescute ale AT II produc o contracție a celulelor mezangiale (ceea ce descrește filtrarea glomerulară) și vasoconstricție generalizată (inclusiv a arteriolelor aferente și eferente), ceea ce menține

presiunea arterială centrală, cu sacrificiul fluxului sanguin renal. Vasodilatatoarele (PG, NO și ANP) au efecte contrareglatorii (absența sau blocarea acestora produc hipertensiune și vasoconstricție renală).

## 9.2 METABOLISMUL RENAL

La nivelul rinichiului se desfășoară un metabolism intens. Cea mai mare parte a proceselor metabolice sunt aerobe, consumul de oxigen al rinichiului fiind egal cu acela al miocardului (triplic față de acela al țesutului nervos), în cortexul renal fiind mult mai mare decât în medulară. Cea mai mare parte a activității metabolice este necesară pentru susținerea reabsorbției tubulare – 70% din consumul de oxigen este utilizat pentru transportul activ al sodiului.

### 9.2.1 METABOLISMUL ENERGETIC

Principalele substraturi energetice utilizate în cortexul renal sunt: acizii grași, lactatul, glutamatul, citratul și corpii cetonici.

În celulele renale bogate în mitocondrii, se desfășoară reacțiile ciclului Krebs, iar fosforilarea oxidativă atinge un nivel ridicat. În zona corticală predomină izoenzimele LDH<sub>1</sub> și LDH<sub>2</sub>. La nivelul medulei renale are loc glicoliza anaerobă și predomină izoenzimele LDH<sub>4</sub> și LDH<sub>5</sub>. Ciclul pentozo-fosfaților este slab reprezentat. La nivelul țesutului renal fosfatazele sunt foarte active cu producere de fosfați, iar corpii cetonici ( $\beta$ -hidroxibutiratul, acetilacetatul) pot fi utilizați, într-o mică măsură, ca substrat energetic.

### 9.2.2 Metabolismul azotat

Rinichiul este dotat cu sisteme enzimatice de dezaminare oxidativă a aminoacizilor. Prin corelarea acestora cu procesul de transaminare are loc producerea de NH<sub>3</sub>, care se elimină prin urină sub formă de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. De asemenea, are loc generarea creatininei din creatină, proces care se desfășoară însă mult mai intens în ficat.

## 9.3 FUNCȚIILE RENALE

Deși nefronul (sistem glomerulotubular) funcționează ca un tot unitar, se obișnuiește tratarea separată a funcțiilor glomerulare și tubulare, precum și a celor de reglare a presiunii arteriale, a secreției de renină și eritropoietină.

Formarea urinei se realizează în trei etape: filtrarea glomerulară, reabsorbția tubulară și secreția tubulară.

### 9.3.1 FILTRAREA GLOMERULARĂ

Filtrarea glomerulară este un proces pasiv prin care se realizează ultrafiltrarea plasmelor, în raport de prezența factorilor determinanți, ca FSR, respectiv FPR și PEF. Filtratul glomerular (urina primară) corespunde deci ultrafiltratului plasmelor, conținând totuși cantități reduse de proteine. Urina definitivă este lipsită de proteine (maximum 0,15 g/l = 15 mg/dL), deoarece la nivelul tubilor proximali are loc reabsorbția proteinelor filtrate. Permeabilitatea glome-

ulară este selectivă: moleculele cu diametrul  $<4$  nm traversează fără restricții capilarele glomerulare, iar pentru moleculele cu diametrul  $>8$  nm filtrarea este blocată. Datorită GM mici, albumina ar putea traversa porii filtrului glomerular, dar fiind încărcată negativ la pH-ul fiziologic, apare fenomenul de respingere electrostatică cu suprafața electronegativă a celulelor endoteliale. Celelalte proteine au diametrul prea mare pentru a trece prin membrana filtrantă glomerulară.

Viteza de formare a ultrafiltratului (rata filtrării glomerulare - RFG) este de 125 ml/min, reprezentând 15-20% din fluxul plasmatic renal. Zilnic se filtrează prin glomerulii renali aproximativ 180-200 l apă și substanțe dizolvate cu greutate moleculară mică ( $GM < 68.000$  D). Producția zilnică de urină însă, este de numai 1-2 l. Extracția unei substanțe din plasmă poate varia între 0 și 100 %, ceea ce corespunde valorilor gradului de extracție între 0 și 1. Aceste valori sunt exprimate în practica medicală prin volumul virtual de plasmă epurată de o substanță oarecare, într-un minut (*Clearance*):

$$C = \frac{U \cdot V}{P} \text{ mL/min, unde}$$

C-volumul de plasmă epurată în 1 minut;

P-concentrația în plasmă a substanței;

V-volumul urinar/minut;

U-concentrația în urină a substanței.

În cazul unei substanțe care se filtrează în glomeruli, dar nu se reabsoarbe în tubi (creatinina endogenă sau inulina exogenă), valoarea normală a coeficientului de epurație variază între 60 - 125 ml/min, valori mai scăzute înregistrându-se la persoanele vârstnice. Dacă Clearance-ul este foarte scăzut (sub 10 ml/min), la persoanele cu disfuncții renale severe, creatinina se secretă semnificativ la nivelul tubilor uriniferi, astfel încât clearance-ul este supraestimat prin formula clasică. Pentru substanțele, care se reabsorb parțial (ureea), valoarea este mai mică (60 - 80 ml/min), pentru cele care se reabsorb în întregime (glucoza), este egală cu 0, iar cele care se filtrează, dar se și elimină din sânge prin secreție tubulară (acidul para-amino hipuric = PAH), prezintă o valoare de clearance foarte mare (700 - 800 ml/min).

### 9.3.2 FUNCȚIILE TUBULARE

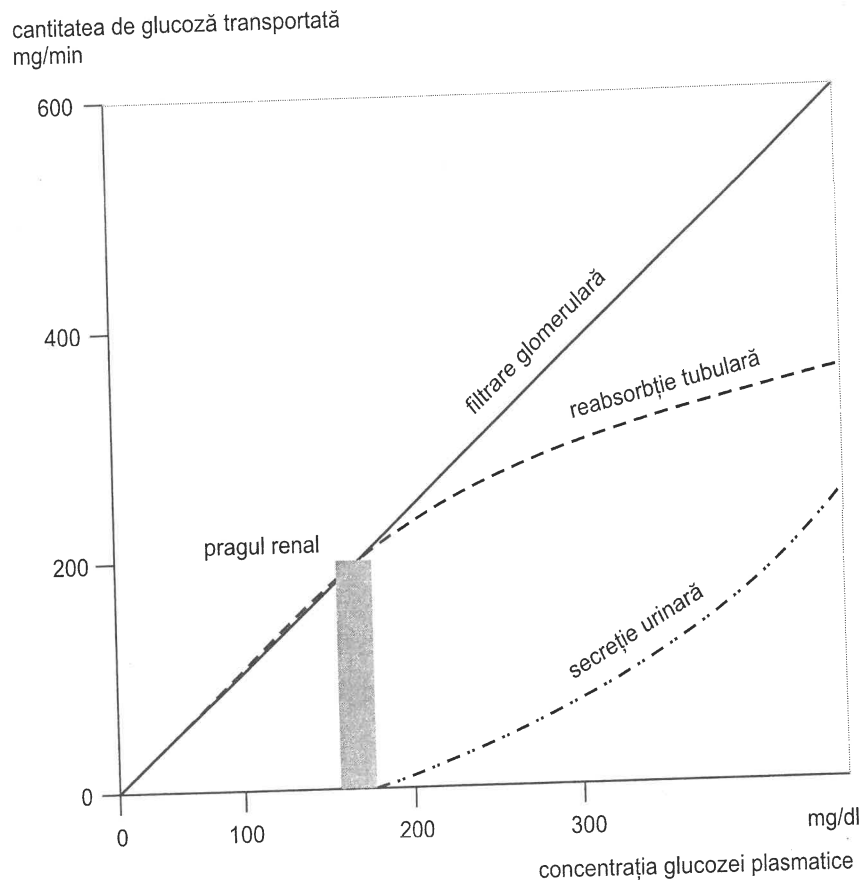
#### 9.3.2.1 Reabsorbția tubulară

Se poate realiza prin transport transcelular sau paracelular prin spațiul dintre celulele tubulare (prin difuziune pasivă sau prin atragerea solventului).

Transporturile pasive tubulare au loc în sensul și pe seama gradientilor de concentrație.

Transporturile active sunt cel mai adesea limitate, având o capacitate maximă ( $T_m$ ): tipul glucozei (Figura 9.4) și de asemenea al aminoacizilor și proteinelor.

Substanța de transportat se unește cu un transportor membranar („carrier”) pe fața luminală a celulelor tubulare, de care se decuplează după pătrunderea substanței în celule. Apoi, substanța trece din celulele tubulare în capilarele peritubulare, iar transportorul re-



**Figura 9.4 Filtrarea și reabsorbția glucozei la nivel renal**

vine la suprafața luminală. În mod normal,  $T_m$  este de 2-3 ori mai mare decât concentrația substanței în ultrafiltratul glomerular.  $T_m$  este independent însă de concentrația substanței aflate în ultrafiltratul glomerular. În cazul în care filtratul glomerular nu conține cantități excesive ale substanțelor respective, care să depășească capacitatea maximă a transportului tubular ( $T_m$ ), urina definitivă va fi lipsită de acestea. În cazul unei filtrări glomerulare excesive, capacitatea  $T_m$  este depășită și substanțele apar în urină (de exemplu glucozuria în caz de hiperglicemie persistentă peste 180 mg/dL). În condiții normale, glucoza din urina primară este reabsorbită activ în prima porțiune a TCP. Glucoza, fructoza, galactoza sunt transportate printr-un „carrier” ce posedă pentru toate un singur locus de fixare (glucoza având afinitate maximă) și un locus pentru fixarea  $\text{Na}^+$ . Transportul are loc numai când ambele situsuri sunt ocupate, de aceea se numește *cotransport* sau *simport*. Astfel, glucoza este transferată activ în celulele epiteliale ale TCP. De aici, glucoza traversează, prin difuziune facilitată, membrana bazo-laterală unde se află ATP-aza  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependentă și pătrunde în spațiile intercelulare și, în final în plasmă.

Aminoacizii sunt resorbiți activ în TCP, unii aproape total, iar alții numai într-o proporție ridicată (cistina, lizina, histidina). Transportul aminoacizilor la nivelul marginii în perie a nefrocitelor proximale este realizat de un sistem transportor stereospecific saturabil, dependent de gradientul electrochimic de  $\text{Na}^+$  lumen-celulă. În condiții normale, excreția urinară a aminoacizilor este foarte scăzută.

### 9.3.2.2 Secreția tubulară

Reprezintă capacitatea celulelor tubulare renale de a sintetiza/secreta substanțe care, fie nu există în urina primară, fie sunt într-o concentrație mai mică decât în urina finală (ex. PAH, penicilina, ionii de  $K^+$ ,  $H^+$ ). Celulele epiteliale tubulare pot extrage din plasmă și secreta în urină diferite substanțe, ca acidul para-amino hipuric (PAH). Capacitatea de secreție a epiteliului tubular este saturabilă. Cantitatea filtrată a substanței administrate intravenos corespunde valorii coeficientului de epurație (120 mL/min). Cantitatea excretată însă este mult mai mare și poate fi calculată din suma cantităților filtrate și secretate. Cantitatea secretată la început crește liniar cu creșterea concentrației plasmatice, însă numai până la o anumită cantitate limită, de 100 mg/L PAH. Acest nivel al concentrației plasmatice de PAH se numește limita de autodeprimare (Self Depression Limit, SDL). La valori și mai mari, capacitatea secretorie se saturează, manifestându-se limita de saturație (Saturation Limit, SL), după care măsura epurației PAH corespunde coeficientului de epurație. În condiții fiziologice, valoarea coeficientului de epurație (clearance-ul) a PAH se modifică între 700 - 800 mL/min.

### 9.3.2.3 Difuziunea neionică

Din cauza compoziției lor lipidice, membranele celulare sunt impermeabile pentru apă și ioni. Totuși electroliții slabi, sub forma lor neionizată (apolară), pot traversa membranele celulare fără nici o dificultate. Astfel, amoniacul ( $NH_3$ ) format în celulele tubulare, prin dezaminarea aminoacizilor, trece prin difuziune neionică în lumenul tubular, unde fixează un proton ( $H^+$ ) și se transformă în cation amoniu  $NH_4^+$ . Sub această formă poate neutraliza acizi (acidul uric, oxalic), participând la menținerea echilibrului acido-bazic, dar nu se poate reîntoarce în celule. În mod similar, în cazul unei intoxicații cu barbiturați, acidul barbituric filtrat în urina acidă nu se poate disocia electrolitic și (prin difuziune neionică) se reabsoarbe în sânge. În urma alcalinizării urinei (prin perfuzia bicarbonaților), acidul barbituric disociază electrolitic, sub această formă ionică nu se reabsoarbe și se elimină rapid din organism prin urină.

### 9.3.3 MECANISMELE FUNCȚIEI GLOMERULO-TUBULARE DE CONCENTRARE ȘI DE DILUARE A URINEI

Volumul filtratului glomerular este de 180 L în 24 de ore, conținând printre altele 26 moli  $Na^+$ , 19 moli  $Cl^-$  și având osmolaritatea plasmei. În schimb, urina definitivă are un volum de 1,5 L, conține numai 0,23 moli  $Na^+$  și 0,19 moli  $Cl^-$  și are osmolaritatea între 650 și 1.200 mosmol/L, respectiv densitatea între 1,002 – 1,030 g/mL. Reiese că prin contribuția sistemului tubular, cantitățile de apă și de electroliți filtrate suferă modificări substanțiale. Activitatea de concentrare sau de diluție a rinichilor poate fi explorată pe baza valorii coeficientului de epurație al apei. În cazul în care valoarea osmolarității urinei ( $U_{osm}$ ) este egală cu valoarea osmolarității plasmei ( $P_{osm}$ ), coeficientul de epurație (clearance) al apei este egal cu zero ( $C_{apă} = 0$ ). În cazul, în care valoarea  $U_{osm}$  depășește valoarea  $P_{osm}$ , valoarea  $C_{apă}$  devine negativă, ceea ce înseamnă o retenție de apă, adică concentrarea urinei. În caz de diluare a urinei valoarea  $U_{osm}$  devine inferioară valorii  $P_{osm}$ , valoarea  $C_{apă}$  devenind pozitivă - eliminare renală în exces a apei.

La nivelul TCP, din conținutul total în apă și substanțe filtrate în glomeruli, se reabsorb în mod obligatoriu aproximativ 70%. Reabsorbția ionilor are loc în condiții izoosmotice, urmată de reabsorbția pasivă a apei. Ca urmare, în această porțiune tubulară, urina primară rămâne izoosmotică. În segmentul descendent al ansei Henle se reabsoarbe pasiv apa. În porțiunea ascendentă a ansei Henle, celulele epiteliale transportă activ ionii de  $\text{Na}^+$  din lumen în interstițiu, urmați în mod pasiv de  $\text{Cl}^-$ . Prin aceasta, țesutul interstițial din jur devine hiperosmotic, iar urina din lumen - hipoosmotică. Celulele epiteliale ale tubilor contorți distali, răspund la acțiunea aldosteronului, prin reabsorbția sodiului și a clorurilor și prin eliminarea potasiului. La acest nivel se manifestă și schimburile ionice între  $\text{Na}^+$  și  $\text{H}^+$ . În prezența ADH, pereții tubilor colectori devin permeabili pentru apă (care, din cauza gradientului de concentrație existent între lumen și interstițiu) pătrunde rapid în țesutul renal hiperosmotic din jur. Astfel urina definitivă devine mai concentrată. Vârful osmotic reprezintă cea valoare maximă (1.500 mosmol/L) a osmolarității urinei, la care poate fi concentrată urina în comparație cu plasma (300 mosmol/L). Valoarea vârfului osmotic este limitată de capacitatea transportului activ pentru ionii de  $\text{Na}^+$  al epiteliului porțiunii ascendente a ansei Henle. În reabsorbția apei sunt implicate două procese:

- reabsorbția izoosmotică a apei în TCP;
- disocierea reabsorbției apei de aceea a solviților în ansa Henle, TCD și tubul colector.

Ajustarea densității urinare se produce între porțiunea terminală a TCP și porțiunea distală a tubului colector. Intervin două mecanisme:

- **multiplicarea în contracurent** – este un proces activ ce se desfășoară în ansa Henle, datorită diferențelor de permeabilitate între porțiunile ansei Henle. Multiplicarea în contracurent depinde de apozitia dintre segmentele descendent și ascendent ale ansei Henle cu vasa recta (o rețea de capilare derivate din arteriola eferentă, care ajung profund în medulară). La intrarea în segmentul descendent al ansei Henle, fluidul este izoosmolar (300 mmol/L), va deveni aici hiperosmolar, iar în cel ascendent – hipoosmolar. Ureea are acțiune osmotică în interstițiul medular și poate potența multiplicarea în contracurent. Ductele colectoare sunt permeabile pentru uree, aceasta pătrunzând în profunzimea medularei, crescând astfel osmolaritatea interstițiului.
- **schimbul în contracurent** – este un proces pasiv ce se desfășoară numai în prezența ADH-ului. Apa fără solviți este reabsorbită din ductul colector în vasa recta ascendentă, în sensul gradientului osmotic creat de multiplicarea în contracurent și de osmolaritatea crescută din medulară (Figura 9.5). Schimbul în contracurent este esențial alături de multiplicare pentru concentrarea urinei. În prezența ADH-ului crește proporțional permeabilitatea pentru apă a celulelor din TCD și colector.

Capacitatea de concentrare a rinichilor este dependentă de următoarele condiții:

- Rata filtrării glomerulare (cantitatea filtrată de apă și de substanțe) să fie suficient de mare;
- Circulația medulară renală să fie optimă;
- Funcția de transport activ a  $\text{Na}^+$  în porțiunea ascendentă a ansei Henle, să fie intactă.

## 9.4 EXPLORAREA DE LABORATOR A FUNCȚIILOR RENALE

Examenul fizic și biochimic al urinei furnizează informații valoroase referitoare la starea funcțională a rinichilor.

Culoarea normală este galben-pai (din cauza urobilinei), dar se poate modifica în funcție de prezența coloranților endogeni (hemoglobina, bilirubina) și exogeni (medicamente).

Densitatea se poate modifica între 1,002 g/ml și 1,032 g/ml. O densitate constant sub 1,010 g/ml (*hipostenurie*) corespunde fazei de poliurie compensatorie a unei insuficiențe renale. Densitatea urinară constantă de 1,010 g/ml (egală cu densitatea plasmiei) – *izostenurie*, corespunde unei stări grave de insuficiență renală, cu pierderea capacității de concentrare a urinei. Valori extrem de mari (*hiperstenurie*) apar la diabeticii neechilibrați terapeutic, din cauza glucozuriei (și cetonuriei) masive.

Reacția urinei poate fi alcalină, neutră sau acidă, cu aciditatea actuală între pH = 4,5 – 8,5. În condiții normale, într-o perioadă de 24 de ore, se elimină prin urină maximum 50 mmol acizi (aciditate titrabilă). În acidoze sau alcaloze metabolice, aciditatea sau alcalinitatea titrabilă a urinei poate prezenta valori de 5 - 10 ori mai mari.

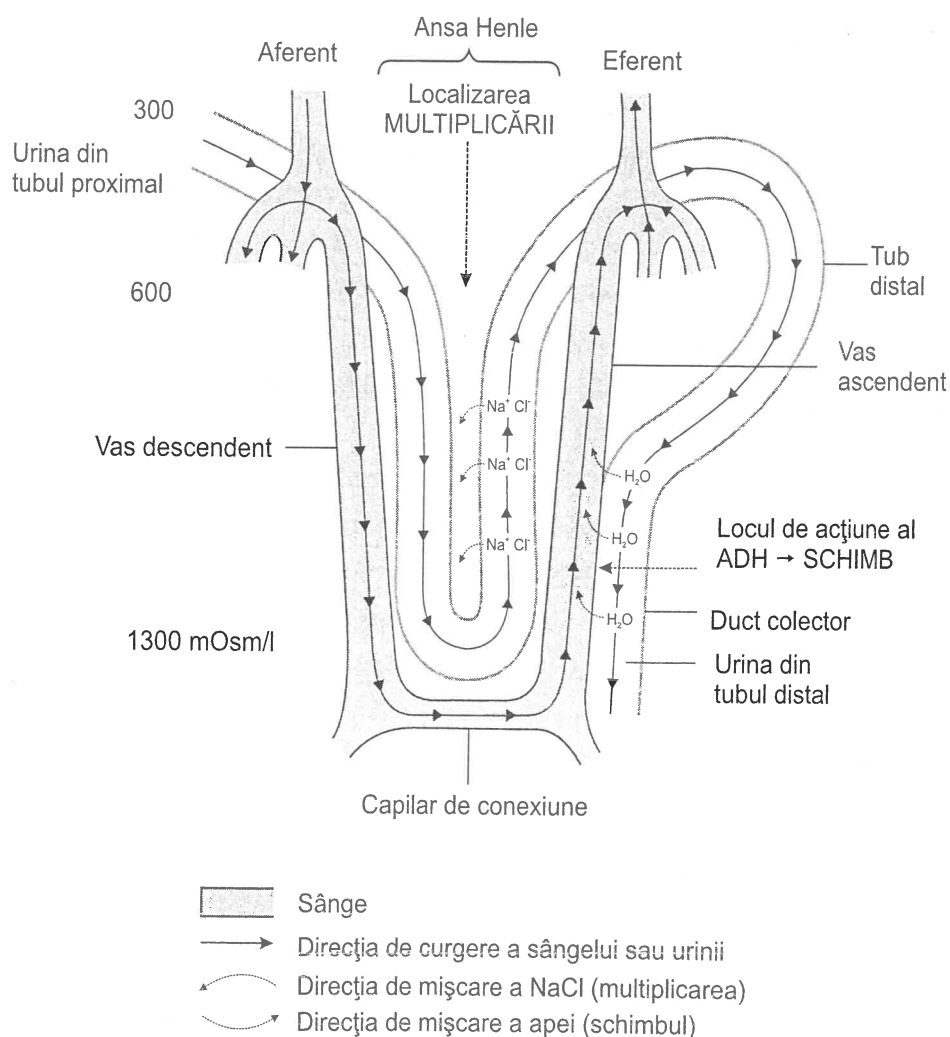


Figura 9.5 Mecanismul în contracurent – relația dintre tubii renali și vasa recta

### 9.4.1 EXPLORAREA IRIGAȚIEI RENALE

Metoda de rutină este determinarea *clearance-ului acidului para-amino hipuric (PAH)*. PAH administrat intravenos sau per os este eliminat în totalitate la un singur pasaj renal, coeficientul lui de epurație fiind egal cu fluxul plasmatic renal. Valoarea normală a *clearance-ului PAH* este 700-800 ml/min. Se mai poate utiliza *clearance-ului acidului 5 hidroxindolacetic*.

### 9.4.2 EXPLORAREA FILTRĂRII GLOMERULARE

#### 9.4.2.1 Rata filtrării glomerulare (RFG)

RFG este de 120-150 mL/min la tineri și de 60-80 mL/min la vârstnici. RFG înregistrează o regresie fiziologică odată cu înaintarea în vârstă (scade cu aproximativ 6,5 mL/min/1,73m<sup>2</sup>/decadă de vârstă), procesul fiind mai exprimat la bărbați. RFG se determină prin măsurarea excreției unei substanțe filtrate liber la nivel glomerular și care nu se reabsoarbe, nici nu se secretă la nivelul tubilor uriniferi. RFG depinde de:

- dimensiunea și permeabilitatea capilară;
- gradientul de presiune hidrostatică și oncotică între capilarul glomerular - capsula Bowman - tubul urinifer;
- existența unor afecțiuni renale.

Explorarea de rutină a RFG se face determinând *clearance-ului creatininei endogene*. Creatinina plasmatică este produsul metabolic al creatinei și fosfocreatinei, ambele prezente aproape în exclusivitate în mușchi. De aceea, nivelul creatininemiei este corelat cu masa musculară, care la rândul ei e influențată de sex, vârstă și alimentație. Creatinina este produsă în organism din fosfocreatina musculară și are proprietăți apropiate de ale inulinei. Totuși la o RFG normală, aproximativ 10% din creatinina excretată este de fapt secretată. Datorită limitelor practice de dozare, concentrația serică a creatininei măsurate este cu aproximativ 10% mai mare decât concentrația reală, astfel încât cele două aspecte se compensează și  $C_{\text{creatinină}} = C_{\text{inulină}}$  la subiecții sănătoși.

Determinarea *clearance-ului creatininei* implică colectarea urinei pe 24 de ore; nu este un procedeu simplu de realizat: unii pacienți pot uita să includă unele eșantioane de urină sau chiar să adauge apă sau urină provenită de la alți pacienți, în intenția de a impresiona cadrele medicale prin „performanță”. După 24 de ore se omogenizează amestecul și se determină creatinina urinară și cea serică. Când RFG scade foarte mult va crește creatinina serică și creatinina este secretată activ de tubii renali, de aceea *clearance-ului* va indica o valoare mai mare decât RFG reală. Astfel, în insuficiența renală cronică cu RFG < 10 mL/min, *clearance-ului creatininei* nu mai reflectă corect RFG, ci o supraestimează. De aceea, la acești pacienți se recomandă utilizarea *clearance-ului* unor izotopi (<sup>51</sup>Cr EDTA) sau *clearance-ului* altor markeri specifici (Inulină, Manitol).

Dintre metodele speciale de determinare a RFG menționăm *clearance-ului inulinei* (standardul de aur pentru aprecierea RFG). Inulina este un polimer al fructozei care nu se metabolizează renal. Metoda nu poate fi aplicată pacienților cu transplant renal.

Datorită dificultăților de colectare a urinei de 24 de ore și a valorii aproximative a parametrului obținut la recoltarea de 3 ore a urinei, se utilizează adesea formule de calcul pentru a estima RFG (RFG<sub>e</sub>), pe baza unei singure determinări de concentrație serică a creatininei, cu corecții pentru vârstă și masă corporală (Formula Cockcroft-Gault):

$$C = \frac{[140 - \text{vârsta (ani)}] \times \text{greutatea (kg)}}{72 \times \text{creatinina serică (mg/dL)}} \times (\text{la femei}) 0,85$$

Pentru femei se consideră o masă musculară cu 15% mai redusă la aceeași vârstă și greutate.

Includerea masei corporale în formulă, ca măsură a masei musculare, constituie un element problematic la persoanele obeze sau cu edeme. La acestea, formula trebuie corectată pentru suprafața corporală, prin înmulțire cu 1,73 și apoi divizare la suprafața corporală calculată pentru persoana în cauză ( $\rightarrow$  RFG<sub>e</sub>, ml/min/1,73 m<sup>2</sup>).

În conformitate cu recomandările CDC, se poate utiliza o formulă mai simplă (în care greutatea nu este inclusă), rezultată din studiul MDRD (Modification of Diet in Renal Disease):

$$\text{RFG}_e = 186 \times \text{Cr seric}^{-1.154} \times \text{ani}^{-0.203} \times (\text{la femei}) 0,742$$

Prezența unei RFG<sub>e</sub> < 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> pentru o perioadă mai lungă de 3 luni, indică în general o afectare renală cronică.

Trebuie menționat însă faptul că această formulă derivă din multiple studii efectuate pe pacienți cu boală renală cronică, de aceea ea este mai puțin performantă la persoane cu disfuncții ușoare ( $90 \geq \text{RFG}_e \geq 60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), situație în care se dorește efectuarea screening-ului pentru depistarea lor precoce.

Datorită faptului că utilizarea tehnicii Jaffe pentru determinarea creatininei în ser și urină (foarte răspândită în laboratoarele medicale) are un mic bias analitic pozitiv (deviație de la valoarea reală), comparând această tehnică cu tehnica IDMS (Isotope-Dilution Mass Spectrometry) s-a propus înlocuirea în formula MDRD a factorului 186 cu 175.

Având în vedere faptul că disfuncția renală cronică este o problemă de sănătate publică (afectând aproximativ 10% din populația generală și în 80-90% din cazuri, fiind asimptomatică inițial), pentru creșterea șansei de identificare a persoanelor cu disfuncție renală silențioasă s-a propus estimarea RFG pentru toate persoanele cărora li se determină concentrația creatininei serice. Recent s-a propus o altă formulă (CKD-EPI: Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration), care se corelează mai bine, se pare, cu RFG măsurată, decât formula MDRD și care, în asocierie cu proteinuria, are rolul de a identifica precoce persoanele cu risc crescut de boală renală cronică:

$$\text{RFG}_e = 141 \times \min(\text{sCr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{sCr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{ani}} \times 1.018 [\text{la femei}]$$

unde: Scr este creatinina serică în mg/dL,

$\kappa$  este 0.7 pentru femei și 0.9 pentru bărbați,  
 $\alpha$  este -0.329 pentru femei și -0.411 pentru bărbați,  
 min indică cea mai mică valoare Scr/ $\kappa$  sau 1,  
 max indică cea mai mare valoare Scr/ $\kappa$  sau 1.

Formulele mai sus menționate pot fi folosite doar la pacienți cu funcție renală relativ stabilă (nu se pot utiliza în situații în care funcția renală se deteriorează rapid).

La copii, pentru calcularea RFG se aplică formula Schwartz modificată, cu condiția ca pentru determinarea creatininei să se folosească metoda enzimatică:

$$RFG = \frac{0,413 \times \text{Înălțime (cm)}}{Cr_{\text{serică}} \text{ (mg/dL)}}$$

Concentrația plasmatică a ureei variază de asemenea invers cu RFG (uremia, azotemia). Totuși uremia poate crește și datorită reabsorbției tubulare excesive a ureei (ca în deshidratare, rezultând un raport crescut Uree/Cr, tipic pentru azotemia prerenală) sau datorită excesului de proteine în dietă. La pacienți cu afecțiuni hepatice sau anorexie, ureea poate rămâne scăzută sau normală în ciuda unei RFG reduse.

#### 9.4.2.2 Creatinina plasmatică

În formula clearance-ului creatininei, RFG este invers proporțională cu concentrația plasmatică de creatinină. În timp ce creatininemia crescută indică de obicei afectarea funcției renale, o valoare normală a concentrației creatininei plasmatice nu implică în mod necesar o funcție renală absolut normală. Este cunoscut faptul că doar atunci când aproximativ 50% din glomeruli sunt afectați, apare o creștere semnificativă a creatininei serice peste pragul superior al concentrației fiziologice. Funcția renală se poate deteriora semnificativ, în timp ce creatininemia crește lent, cu menținerea chiar în intervalul fiziologic, („zona oarbă a creatininemiei”), de aceea este importantă și cinetica valorilor fiziologice (Figura 9.6). Relația inversă între concentrația creatininei serice și clearance, este una exponențială, valoarea creatininemiei crescând rapid din momentul în care clearance-ul scade sub 70 ml/min. Modificarea concentrației plasmatice a creatininei se poate produce însă și independent de funcția renală (ex. modificarea masei musculare).

#### 9.4.2.3 Ureea plasmatică

Ureea este produsul final al metabolismului proteic (reprezintă aproximativ 75% din azotul nonproteic excretat de organism) și se sintetizează în ficat. Aproximativ 90% din ureea produsă în ficat este eliminată prin urină, fără alte transformări și reprezintă o rută majoră pentru excreția azotului. Datorită faptului că 50-60% din ureea filtrată glomerular se reabsoarbe pasiv la nivelul tubilor uriniferi, RFG este subestimată cu această substanță. Nivelul ureei plasmatice depinde de alimentație (dieta bogată în proteine), rata catabolismului și de funcția hepatică. Ureea este difuzibilă prin membranele celulare. Excreția urinară depinde de RFG și reabsorbția tubulară.

Afecțiuni ce determină hiperuremie:

**a. prerenale:**

- hemoragiile gastro-intestinale;
- statusul hipercatabolic (traumatisme, arsuri, intervenții chirurgicale);
- hipertiroidismul, sindromul Cushing;
- scăderea perfuziei renale (insuficiența cardiacă, stenoza arterei renale, scăderea volemiei);

**b. renale:** glomerulonefrite acute, cronice, pielonefrite, necroza tubulară acută;

**c. postrenale:** obstrucția tractului urinar (litiază, tumori).

Deși, concentrația serică de creatinină și uree se măsoară deseori simultan, creatinina reflectă mult mai fidel funcția glomerulară, deoarece ureea este afectată în mare măsură de factori extrarenali. Ureea este utilă mai ales pentru depistarea altor probleme clinice asociate disfuncției renale (ex. dieta bogată în proteine, hemoragiile digestive, statusul hipercatabolic). Nivelul plasmatic al ureei se corelează mai bine cu simptomatologia „uremică” și reflectă aportul de proteine (factor important care trebuie monitorizat la bolnavii cu insuficiență renală cronică).

Deseori se utilizează raportul uree serică (mg/dL) / Creatinină serică (mg/dL), valoarea normală a acestui raport pentru persoane sănătoase cu o dietă normală, fiind între 26 și 43. Raport semnificativ scăzut indică necroze tubulare acute, boală hepatică gravă sau aport alimentar de proteine foarte scăzut. Raport crescut cu valori normale ale creatininei serice, indică azotemie prerenală (leziuni tisulare, aport proteic crescut). Raport crescut cu valori crescute ale creatininei serice, indică de obicei o obstrucție postrenală, sau azotemie pre-renală asociată cu afectare renală.

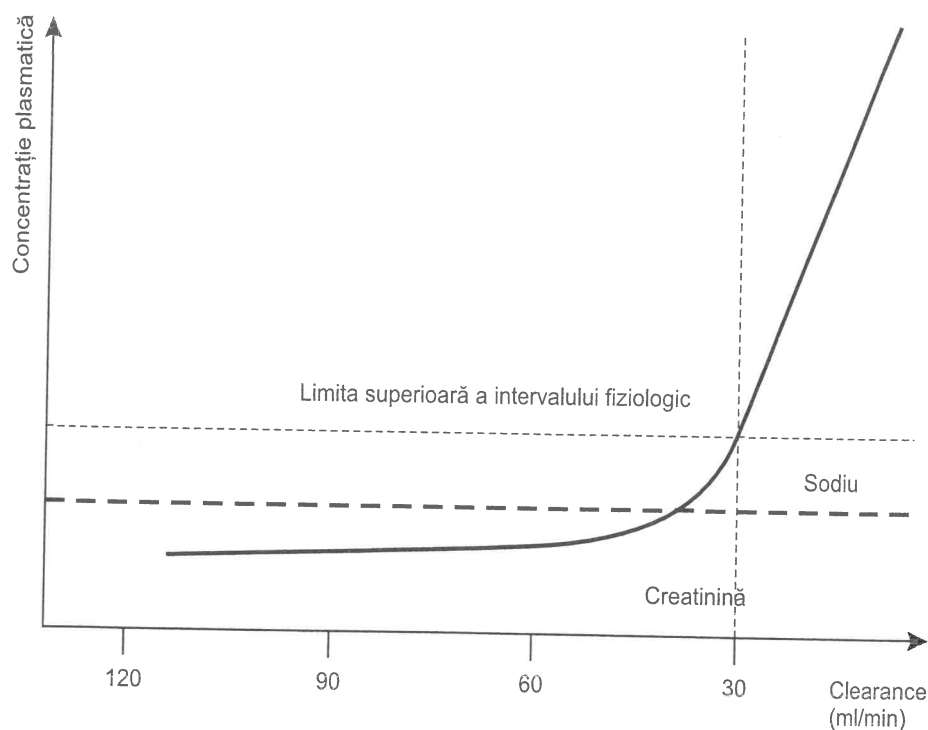


Figura 9.6 Relația dintre clearance-ul și concentrația plasmatică a creatininei

#### 9.4.2.4 Cistatina C

Este o protează cisteinică cu greutatea moleculară de 13 kDa, produsă în condiții fiziologice cu o rată constantă de toate celulele nucleate, filtrată aproape complet la nivelul glomerulului renal și masiv catabolizată de către celulele tubulare renale proximale. Din momentul demonstrării corelației dintre concentrația serică a acestei proteine și RFG, a fost introdusă ca un marker de screening al funcției renale. Este recomandată în special la copii, la care, spre deosebire de concentrația serică a creatininei (al cărei bias pozitiv este chiar mai accentuat la valorile mici de concentrație), are capacitatea de a reflecta funcția glomerulară independent de vârstă. Spre deosebire de creatinină, acest marker este mai puțin influențat de vârstă, înălțime, sex, anumite suferințe cronice (diabet, hipertensiune), precum și proporția între țesutul muscular / adipos. Ca și valoare în evaluarea filtrării glomerulare, a fost comparată cu rolul Hb A1c în diagnosticul și monitorizarea diabetului zaharat. Terapia cu glucocorticoizi, disfuncțiile tiroidiene și dezvoltarea unor tumori, pot influența concentrația serică a Cistatinei C, a cărei concentrație fiziologică nu depășește 1,2 mg/L. Pentru monitorizarea funcției renale la pacienții cu boală renală confirmată, se preferă însă în continuare Clearance-ul de creatinină.

#### 9.4.3 EXPLORAREA FUNCȚIEI TUBULARE

##### 9.4.3.1 Excreția urinară a aminoacizilor

Poate fi investigată prin metode cromatografice. Cauzele apariției în urină a aminoacizilor:

- deficiență generalizată (globală) a transportului tubular (sindromul Fanconi);
- deficiență selectivă (izolată) a transportului tubular al unor aminoacizi (cistinuria);
- creșterea concentrației plasmatice a aminoacizilor cu depășirea (saturarea) mecanismului de transport tubular.

Clasificarea aminoaciduriilor patologice:

- în funcție de etiologie, pot fi congenitale sau dobândite;
- după gradul de interesare al unui singur aminoacid sau al unor grupuri de aminoacizi, aminoaciduriile sunt izolate sau globale;
- după mecanismul fiziopatologic se disting:
  - aminoacidurii renale – cu afectarea reabsorbției aminoacizilor din TCP, concentrația plasmatică a aminoacizilor fiind normală;
  - aminoacidurii prerenale – defectul primar nu este de natură renală, de cele mai multe ori fiind implicate tulburări congenitale ale metabolismului aminoacizilor.

În acest caz, concentrațiile sanguine și urinare ale aminoacizilor sunt crescute.

**a. Aminoaciduriile prerenale izolate (congenitale)** se datorează unor deficiențe de sinteză a unei enzime dintr-o cale metabolică, cu acumularea consecutivă a substanței care este substrat în reacția catalizată de enzima deficitară (vezi și capitolul 5.4.1).

- *Boala urinelor „cu miros de arțar”* apare datorită unei deficiențe în decarboxilarea oxidativă a aminoacizilor cu catenă apolară ramificată (valina, leucina, izoleucina),

care se elimină sub formă de  $\alpha$ -cetoacizi, ce imprimă urinei mirosul caracteristic aromat. Din punct de vedere clinic se caracterizează prin retard mental.

- *Alcaptonuria* se datorează unei deficiențe a homogentizin oxidazei, care se soldează cu acumularea acidului homogentizinic (Alcapton) în țesutul conjunctiv, tegumente și mucoase, generând dureri artritice, fotosensibilitate și urini de culoare închisă. Manifestările clinice debutează de obicei, după 30-40 de ani.
- *Fenilcetonuria* este consecutivă deficitului de fenilalanin hidroxilază (FAH) hepatică (forma clasică se datorează unor mutații ale genei localizate pe cromozomul 12), cu acumularea în organism a fenilalaninei și creșterea concentrației sale plasmatice. Analiza ADN a genei FAH, a arătat peste 100 de mutații (insertii, deleții, non-sens) până în prezent. Consecința este apariția unor leziuni ireversibile la nivelul sistemului nervos și deficiențe în dezvoltarea fizică și intelectuală.
- *Albinismul* este generat de deficitul tirozin oxidazei din calea de obținere a pigmentului melanic, manifestându-se clinic prin pete depigmentate pe tegument, păr alb.

#### b. Aminoacidurii renale globale

- *Sindromul Toni – Debre - Fanconi (diabetul renal gluco – fosfo - aminoaciduric)* se caracterizează prin pierderi urinare de substanțe a căror reabsorbție ar trebui să aibă loc în TCP. Elementele esențiale ale acestui sindrom sunt: glucozurie normoglicemică, aminoacidurie generalizată cu concentrație normală a aminoacizilor plasmatice, hiperfosfaturie cu fosfatemie scăzută asociate cu rahitism vitamino-D rezistent sau osteomalacie, fosfataza alcalină crescută. De asemenea, se însoțește de acidoză tubulară proximală de tip II și poliurie vasopresino- rezistentă.

#### c. Aminoacidurii renale izolate (familiale)

- *Boala Hartnup* – se transmite autozomal recesiv și se caracterizează prin deficit de reabsorbție tubulară și intestinală a aminoacizilor monoaminomonocarboxilici (Ala, Ser, Thr, Asn, Phe, Val, Leu, Ile, His, Trp). Pierderea Trp va genera deficit de vitamina PP (factorul pelagopreventiv). Clinic se înregistrează ataxie cerebeloasă și pelagră (cu simptomatologia celor trei D: dermatită, demență, diaree).
- *Boala Joseph* – se datorează unui deficit de reabsorbție tubulară a prolinei și a hidroxiprolinei.
- *Cistinuria* – este o boală congenitală cu transmitere autozomal recesivă caracterizată prin deficit de reabsorbție a aminoacizilor dibazici din TCP și mucoasa jejunală. Manifestările clinice sunt reprezentate de litiaza renală cistică și complicațiile ei: uropatie obstructivă, pielonefrita cronică și insuficiența renală cronică. Apare în decadele a 2-a și a 4-a de viață. Calculii de cistină conțin sulf, sunt denși și radioopaci.

#### 9.4.3.2 Excreția urinară a glucozei

Glucoza apare în urină în următoarele situații:

- concentrația glucozei plasmatice crește cu depășirea capacității de reabsorbție tubulară;

- scăderea capacității de reabsorbție tubulară (în sarcină, de exemplu);
- defect de transport tubular al glucozei (sindromul Fanconi).

Glucozuria apare cel mai frecvent la diabetici. În lipsa altor semne ale acestei boli metabolice, trebuie exclusă posibilitatea altor melitirii (fructozurie, galactozurie, pentozurie), precum și scăderea sau lipsa capacității de transport maximale a celulelor epiteliale din tubii contorți proximali (diabetul renal). După punerea în evidență a glucozuriei trebuie să fie determinată și cantitatea glucozei eliminate în 24 ore. În mod fiziologic se elimină mai puțin de 150 mg glucoză / 24 ore.

#### 9.4.3.3 Teste de concentrare / diluție urinară

Testul de concentrare urinară (privare de lichide):

- micul dejun la ora 8½ și cântărirea bolnavului înainte de test și după 4, 6, 7 și 8 ore;
- privare de lichide pe o durată de 8 ore, perioadă în care nu se fumează;
- se recoltează urina din oră în oră și se determină volumul urinar și osmolaritatea urinară;
- se recoltează sânge pentru determinarea osmolarității la ½ intervalului pentru fiecare recoltare urinară;
- după 8 ore se administrează apă per os și 2μg Desmopresină (derivat de vasopresină) intramuscular;
- se recoltează urina timp de 2 ore, din 30 în 30 minute.

*Interpretarea testului:* în mod normal, la o osmolaritate plasmatică de 300 mOsm se obține o osmolaritate urinară de aproximativ 600 mOsm. În diabetul insipid, osmolaritatea plasmatică crește, iar osmolaritatea urinară scade (osmolaritatea urinară fiind inferioară celei plasmatice). După administrarea hormonului (la 8 ore de la începerea testului) situația se remediază în cazul diabetului insipid central. Diabetul insipid nefrogen nu răspunde la vasopresină.

#### 9.4.3.4 Teste de acidifiere urinară

În menținerea echilibrului acido-bazic sunt esențiale eliminarea ionilor de  $H^+$  și reabsorbția/neoformarea  $HCO_3^-$ .

**Acidoza tubulară renală** este de două tipuri:

- *acidoza tubulară distală tip I* – caracterizată prin incapacitatea nefronului distal de a secreta ionii  $H^+$  astfel încât pH-ul urinar nu scade sub 5,5 în pofida acidemiei sistemice. Este o acidoză metabolică hipercloremică și hipopotasemică. Manifestările clinice sunt cele ale acidozei, hipopotasemiei și nefrocalcinozei sau litiazei renale.
- *acidoza tubulară proximală tip II* – constă într-o reabsorbție deficitară a  $HCO_3^-$  la nivelul TCP și se însoțește de urini cu aciditate normală, în ciuda acidozei sistemice și pierderii marcate de bicarbonat. Este o acidoză metabolică hipercloremică și hipopotasemică. Pierderea a peste 15% din bicarbonatul filtrat este patognomonică. Creșterea concentrației bicarbonatului în TCD se însoțește de pierdere urinară de  $Na^+$  sub formă de  $NaHCO_3$ , care generează hipovolemie cu hiperaldosteronism

secundar. Hiperaldosteronismul este responsabil de schimbul distal al  $\text{Na}^+$  cu  $\text{K}^+$ , cu apariția de hiperkaliurie și hipopotasemie.

#### Testul de acidifiere cu $\text{NH}_4\text{Cl}$ :

- se administrează  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1 g/kg corp per os pentru inducerea acidozei metabolice (nu este necesară această administrare dacă bolnavul se află deja în acidoză metabolică);
- se verifică  $\text{CO}_2$  total plasmatic ( $=\text{HCO}_3^- + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{CO}_3$ )-rezerva alcalină, care trebuie să scadă cu cel puțin 4 mmol/L (dacă s-a indus acidoza metabolică);
- se recoltează urina din oră în oră timp de 6 – 8 ore, cu verificarea pH-ului urinar.

*Interpretarea testului:* - pH-ul urinar  $\leq 5,3$  semnifică eliminare normală de ioni de  $\text{H}^+$ , dar poate indica o acidoză tubulară renală proximală (tip II). Un pH urinar  $> 6$  se asociază cu acidoza tubulară renală distală.

#### 9.4.4 PROTEINURIA

Dimensiunea porilor de filtrare glomerulari împiedică în mod fiziologic proteinele să treacă din sânge în urină. În mod normal proteinele mari (masă moleculară  $> 50\,000$  D) nu pot traversa membrane bazală; proteinele mici (masă moleculară  $< 20\,000$  D) traversează ușor filtrul glomerular, sunt reabsorbite însă în tubulul contort proximal și doar cantități mici sunt excretate. Sarcina de suprafață a proteinelor plasmactice poate influența permeabilitatea glomerulară; celulele endoteliale glomerulare au sarcină de suprafață negativă datorită prezenței glicoproteinelor încărcate negativ. De asemenea presiunea hidrostatică poate altera compoziția proteică a urinei. Dacă presiunea sângelui crește, chiar și moleculele mai mari pot trece prin glomeruli. Factorii care influențează proprietățile electrostatice și/sau structurale ale membranei bazale glomerulare (de ex. afecțiuni inflamatorii renale) pot crește eliminarea zilnică de proteine prin urină. Prin glomeruli se filtrează zilnic 7-10 g proteine, dar marea majoritate a acestora se reabsoarbe prin endocitoză în TCP, astfel încât prin urina definitivă se elimină în mod fiziologic numai 0,03 – 0,20 g proteine/ 24 h, care însă nu pot fi puse în evidență cu ajutorul metodelor uzuale. Proteinele urinei fiziologice sunt alcătuite aproximativ 2/3 din proteine de origine plasmatică și 1/3 proteine derivate din tractul urinar. La persoanele sănătoase, în urină pot fi prezente urme de: albumină,  $\alpha_1$ -microglobulină, IgG,  $\alpha_1$ -glicoproteină acidă,  $\alpha_1$ -antitripsină, transferină, RBP,  $\beta_2$ -microglobulină, lizozim, cistatină C. Din cantitatea de proteine zilnic eliminate într-o urină fiziologică, albumina reprezintă sub 0,03 g/24h (așa - zisa normalbuminurie).

Proteinele produse de tractul urinar sunt reprezentate în mare măsură de glicoproteina Tamm-Horsfall, o glicoproteină secretată în principal de celulele tubulare ale porțiunii groase ascendente a ansei Henle. Celulele tubulare supraviețuiesc în mediul hipertonic al medulei renale, prin acumularea lentă a unor substanțe osmotice active (sorbitol și glicerofosfocolină prin sinteză, betaină și inozitol prin cotransport cu Na), care pot fi rapid eliberate atunci când osmolaritatea scade.

Cantitatea de proteine din urină este, în cele mai multe cazuri, insuficientă pentru detectare prin tehnicile electroforetice standard. În consecință, urina normală trebuie concen-

trată, cu toate că prin acest proces este posibilă pierderea unei părți a proteinelor cu masă moleculară mică. Gradul de concentrare a urinei variază în funcție de tehnica folosită pentru separarea electroforetică. O concentrare de 50-100 ori este suficientă chiar și pentru urina cu cantități mici de proteine. Concentrarea urinei este în special importantă pentru detectarea cantităților mici, dar relevante clinic, cum sunt lanțurile ușoare libere monoclonale. Cum uneori colectarea urinei de 24h este dificilă, s-a folosit raportul proteine totale/ creatinină care la adulți trebuie să fie  $< 0,2$ . Un model tipic de urină normală concentrată, conține o cantitate mică de albumină și urme de transferină, fără să fie vizibile alte fracțiuni. Electroforeza urinară, poate avea valoare clinică în identificarea proteinelor, precum și pentru a evalua natura sau extinderea unei leziuni renale.

Proteinuria ortostatică este o formă benignă de proteinurie ce poate apărea la ortostatism prelungit în și care dispare ulterior. Această anomalie se poate datora răspunsului corpului la modificarea poziției, unei anormalități a glomerulilor sau a unui răspuns exagerat al sistemului circulator.

Creșterea patologică a concentrației proteice din urină se datorează cel mai adesea:

- prezenței într-o cantitate crescută a proteinelor plasmatiche cu masă moleculară mică (protenuria prerenală sau de supraîncărcare);
- pierderii abilității glomerulului de a reține moleculele mari de proteine (proteinuria glomerulară);
- incapacității tubulilor proximali de a resorbi și a cataboliza proteine, funcția glomerulară fiind normală (protenurie tubulară);
- lezarea căilor urinare (situație în care se însoțește de obicei cu hematurie).

Proteinuria tranzitorie este cauzată de o tulburare funcțională ce poate fi o modificare temporară a hemodinamicii glomerulare, după care urmează un curs benign, autolimitat.

Proteinuria persistentă reflectă boli ale rinichilor sau tulburările sistemice. Această proteinurie poate fi însoțită și de alte anomalii ca hematuria sau bacteriuria.

#### 9.4.4.1 Proteinuriile prerenale (de supraîncărcare)

Proteinuria de supraîncărcare apare datorită unui exces de proteine cu masă moleculară mică (lanțuri ușoare libere, lizozim, mioglobină, hemoglobină) care se filtrează prin glomerulii normali la o viteză ce depășește capacitatea de reabsorbție a tubulilor proximali. Pot apare din cauza creșterii marcate a RFG, a proteinemiei peste 100 g/L (depășirea capacității de TmP), în efort fizic, ortostatism, staza renală din cauza trombozei venei renale, mielom multiplu, etc.

**Proteinele Bence Jones** (lanțurile ușoare libere imunoglobulinice monoclonale) se găsesc în serul și urina pacienților cu mielom multiplu, sub formă de monomeri (22 kDa), dimeri (44 kDa), polimeri sau fragmente ale acestora și pot fi identificate prin electroforeza proteinelor urinare (Figura 9.7) și / sau prin dozarea nefelometrică a concentrației acestora în ser.

#### 9.4.4.2 Proteinuriile renale

Sunt cele mai frecvente și se clasifică în proteinurii glomerulare, tubulare sau mixte.

**a. Proteinuria glomerulară** variază cantitativ de la 300 mg/zi (microalbuminuria, Figura 9.8) până la 20 g/zi (proteinuria masivă).

Microalbuminuria reprezintă excreția persistentă în urină a 30-300 mg albumină /zi, constituindu-se într-un marker cu care se poate evalua riscul de boală renală cronică sau pentru o leziune renală (este un marker valoros pentru estimarea riscului de nefropatie diabetică).

Proteinuria glomerulară apare de obicei prin creșterea permeabilității glomerulare. Proteinuriile pot fi **selective** (cu prezența proteinelor cu greutate moleculară mică: albumină - minimum 80%, transferină,  $\alpha_1$ -glicoproteine și urme de imunoglobuline), **semiselective** (cu depistarea unor fracțiuni intermediare: imunoglobulinele IgG și IgA) și **proteinurii neselective** (cu prezența tuturor fracțiunilor serice, inclusiv a proteinelor cu greutate foarte mare: IgM,  $\beta$ -lipoproteina și  $\alpha_2$ -macroglobulina). Aceasta din urmă orientează spre leziuni glomerulare severe (Figura 9.9).

Clearance-ul diferitelor proteine indică mult mai precis gradul de selectivitate al leziunii renale. Clearance-ul proteinelor cu GM mică, cum ar fi albumina sau transferina este comparat cu cel al proteinelor cu GM mare. Rezultatul este, de obicei, exprimat sub formă de

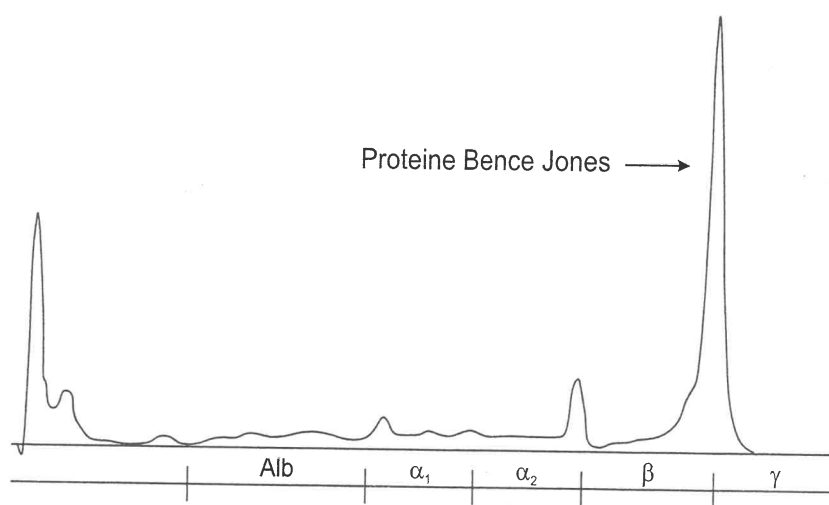


Figura 9.7 Traseu caracteristic pentru electroforeza capilară a unei proteinurii Bence Jones

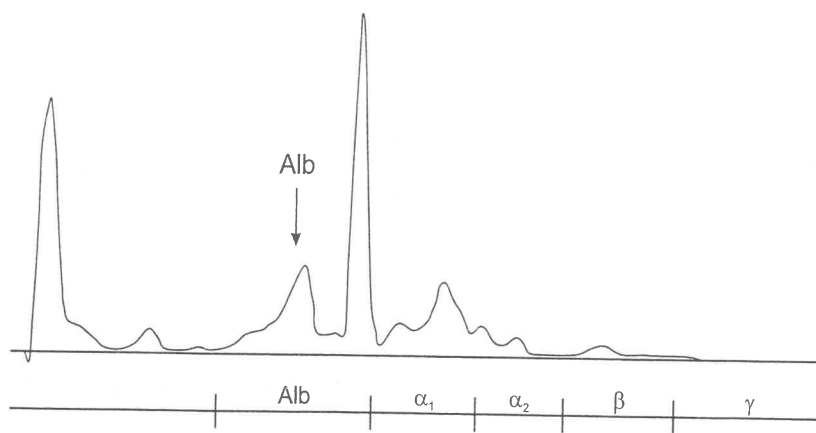
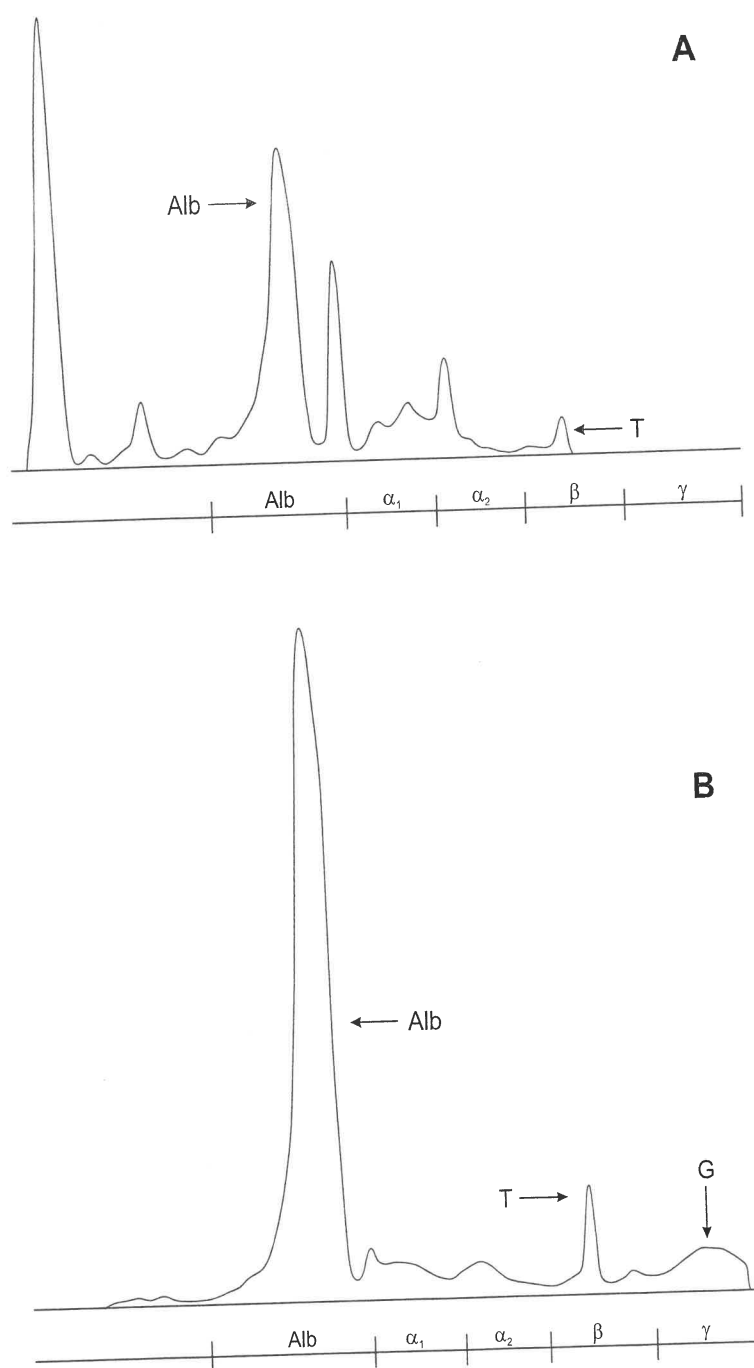


Figura 9.8 Traseu caracteristic pentru electroforeza capilară în SDS-agaroză a microalbuminuriei. Alb = albumina



**Figura 9.9 Densitograme caracteristice pentru proteinuria glomerulară A. Electroforeza capilară a proteinuriei glomerulare selective. B. Electroforeza capilară a proteinuriei glomerulare neselective. Alb - albumina, T – transferina, G – globuline**

raport (R). Astfel, **indexul de selectivitate** este definit ca raportul clearance IgG/ clearance Transferină. Un  $R < 0,2$  indică selectivitate mare (se pierde predominant proteine cu GM mică) și are un prognostic mai favorabil decât atunci când raportul are o valoare mai mare (0,3-0,5 pentru proteinuria moderat selectivă, iar la valori  $> 0,5$  proteinuria este non-selectivă).

$$R = \frac{U_{\text{IgG}}}{U_{\text{TF}}} \cdot \frac{P_{\text{TF}}}{P_{\text{IgG}}}$$

$P_{TF}$  sau  $P_{IgG}$  - concentrația în plasmă a Transferinei sau IgG;

$U_{TF}$  sau  $U_{IgG}$  - concentrația în urină a Transferinei sau IgG.

La copii, indexul de selectivitate sub 0,16 are valoare prognostică pentru răspunsul favorabil la steroizi, în cazul nefropatiilor cu leziuni minime.

**b. Proteinuria tubulară** survine în toate afecțiunile care interesează TCP. Proteinuria tubulară este caracterizată prin excreția proteinelor cu masă moleculară mică (< 40kDa), datorită reabsorbției tubulare reduse, sau prin excreția proteinelor derivate din lezarea celulelor epiteliale tubulare, filtrarea glomerulară rămânând normală. Din punct de vedere cantitativ, se situează între 1-2 g/zi. Markerii ai leziunilor tubulare sunt proteinele cu GM mică, cum ar fi  $\beta 2$ -microglobulina,  $\alpha 1$ -microglobulina, lizozimul, proteina care leagă retinolul (RBP) și mai recent glicoproteina KIM-1 (Kidney Injury Molecule - 1) - molecula de monitorizare a injuriei renale. Aceste proteine cu GM mică sunt, în mod normal, filtrate glomerular și reabsorbite tubular (Figura 9.10).  $\beta 2$ -microglobulina plasmatică este un peptid mic (GM 11,8 kDa) și aparține complexului major de histocompatibilitate de clasa I. Este prezentă pe suprafața majorității celulelor nucleate din organism și în concentrație scăzută și în plasmă. Este filtrată de glomeruli, dar reabsorbită și catabolizată de celulele TCP. Concentrația plasmatică de  $\beta 2$ -microglobulină este un bun index al RFG la persoanele sănătoase, nefiind influențată de dietă sau masa musculară. Ea crește în bolile maligne și inflamatorii.  $\beta 2$ -microglobulina este însă instabilă în urină, de aceea se preferă alte proteine care sunt indicatori mai fideli ai leziunilor tubulare.

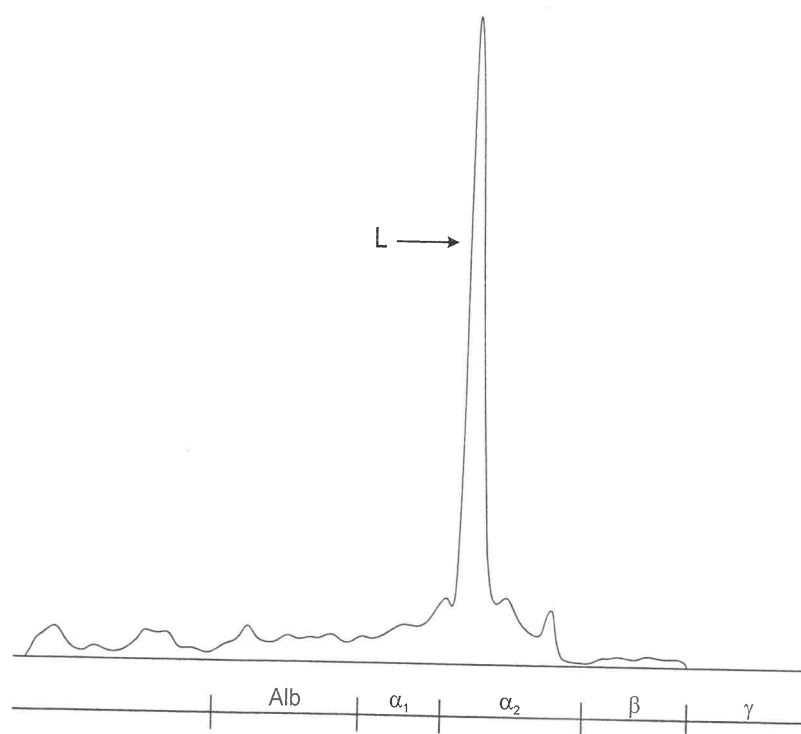


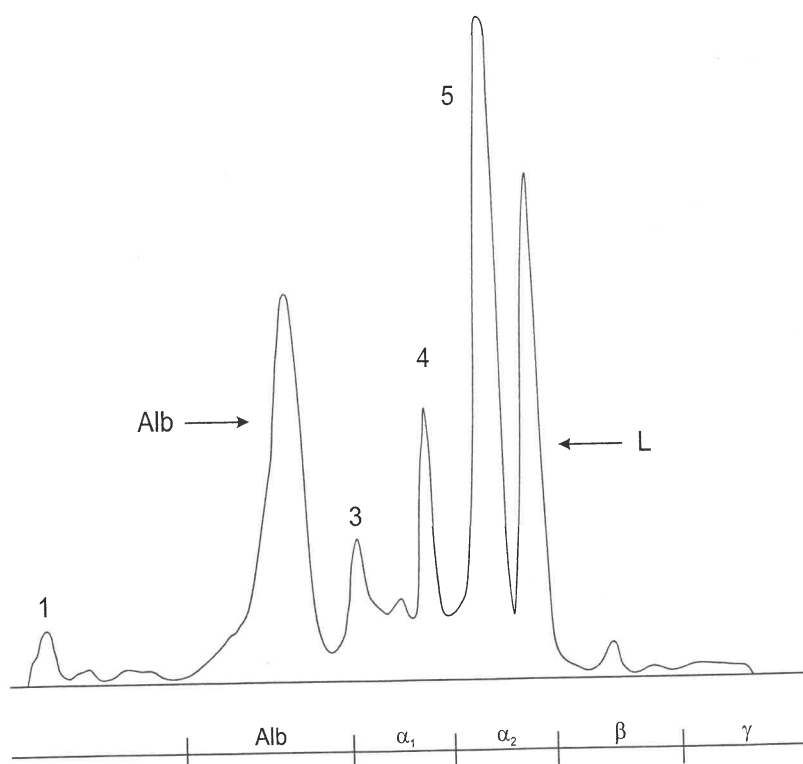
Figura 9.10 Densitogramă caracteristică pentru electroforeza capilară a unei proteinurii tubulare. L – Proteinele cu mase moleculare scăzute (2 000 – 3 000 Da)

Metodele clasice de determinare a gradului de disfuncție renală acută (concentrațiile serice ale ureei, creatininei, glucozurii, proteinurii, GGT, F Alc) sunt nespecifice și cu sensibilitate scăzută. KIM-1 este o proteină exprimată doar pe membranele apicale ale celulelor tubulare renale proximale, la rinichiul afectat acut. Este o glicoproteină transmembranară de tip 1 cu un ectodomeniu N-terminal mucinic și IgG-like și un domeniu citoplasmatic C-terminal, cu tirozină. Această glicoproteină este un biomarker sensibil și specific al injuriei tubulare renale proximale, ectodomeniul acesteia fiind depistat în urină în concentrații crescute, imediat după survenirea leziunii. Se sugerează că KIM-1 urinară ar putea fi utilizată ca marker surrogat în monitorizarea pacientului transplantat renal.

**c. Proteinuria mixtă** este combinația dintre proteinuria glomerulară și cea tubulară. Apare ca un fenomen datorat supraîncărcării aparatului tubular în cazul unei proteinurii glomerulare severe (Figura 9.11). Această proteinurie poate fi :

- Glomerulo-tubulară când albumina depășește 30% din totalul proteinelor urinare și există greutăți moleculare mari de 75 kDa, 150 kDa și chiar mai mari, dar și proteine tubulare sub 68 kDa, chiar și de 12 kDa.
- Tubulo-glomerulare când albumina este sub 30% din totalul proteinuriei și există proteine cu greutăți sub 68 kDa, dar pot apare și proteine mai mari, ca de ex. transferina și urme de IgG.

Electroforeza dintr-un specimen de urină poate ajuta la diferențierea variatelor tipuri de proteinurie. Se poate detecta proteinuria Bence-Jones; în proteinuria glomerulară sunt



**Figura 9.11** Densitogramă caracteristică pentru electroforeza capilară a unei proteinurii mixte (tubulo-glomerulară). Fracțiunile 1 și 3-5 corespund unor substanțe neidentificate de masă moleculară mică (< 5 000 Da). A - albumină și L - proteine de masă moleculară mică.

prezente în urină proteine cu GM mare (peste 70 kDa), iar în proteinuria tubulară predomină proteine cu GM mică (proteine filtrate, care nu sunt reabsorbite).

#### 9.4.4.3 Proteinuriile postrenale

Apar în urma unor leziuni ale căilor urinare între pielon și uretră. Dat fiind că aceste leziuni se manifestă aproape exclusiv cu hemoragii, proteinuriile postrenale sunt asociate cu hematurie. Acest tip de proteinurie se aseamănă cu o proteinurie renală, ce cauzează o boală renală, care în realitate nu există.

#### 9.4.5 PIGMENTURIA

**Hematuria** este fie microscopică (hematii prezente în sedimentul urinar), fie macroscopică. La **proba celor trei pahare (proba Guyon)** prin care se recoltează urina la începutul, mijlocul și sfârșitul micțiunii, hematuria poate fi inițială (din zona cervico-prostatică), terminală (din vezica urinară) sau totală (de origine renală sau ureterală). La examenul microscopic, hematiile provenite din leziunile glomerulare sau tubulo-interstițiale sunt fragmentate, decolorate, iar eritrocitele cu originea în căile urinare (bazineț, ureter, vezică, uretră, prostată) își păstrează forma și culoarea. Hematuria poate fi izolată sau însoțită de durere, tulburări de micțiune, piurie, proteinurie, cilindurie, cheaguri etc.

**Hemoglobinuria** masivă poate fi recunoscută ușor și după aspect. Ea semnifică prezența hemoglobinei libere în urină și este consecința unei hemolize intravasculare. Poate surveni în urma unor infecții, intoxicații, după efort fizic intens ("hemoglobinuria de marș"). După centrifugare urina are culoare roz, roșie sau negricioasă. Se decelează scăderea concentrației plasmatică a haptoglobinei, precum și hemosiderinuria (celulele tubulare care se descuamează vor conține fier). Aceasta din urmă permite stabilirea diagnosticului retrospectiv de hemoglobinurie.

**Mioglobinuria** reprezintă prezența mioglobinei în urină; apare în rhabdomioliză și infarct miocardic (necroza și distrugerea fibrelor musculare). Urina rămâne incoloră după centrifugare. Concentrația serică a haptoglobinei este normală, dar se eliberează în plasmă creatin-fosfokinaza, LDH, GOT, aldolaza.

#### 9.4.6 PIURIA

Reprezintă prezența în urină a unui mare număr de leucocite, care pot fi alterate și aglutinate, conferind urinei un aspect tulbure încă de la emisie. Piuria însoțită de bacteriurie cu *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* etc. apare în infecțiile tractului urinar (ITU) cu localizare joasă (vezica urinară și căile subvezicale) sau înaltă (uretere, parenchim renal).

Piuria sterilă reprezintă persistența leucocitelor în urină în absența decelării bacteriilor prin procedurile microbiologice de cultivare de rutină. În cadrul evaluării clinice, epidemiologice și de laborator a pacienților cu piurie sterilă trebuie să urmărim principalele cauze:

**1. Cauze infecțioase:** ITU recent tratată cu antibiotice, ITU induse de germeni pretențioși nutritiv, infecții ginecologice, uretrite cauzate de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorr-*

*hoecae*, specii aparținând genurilor *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, prostatite, balanite, infecții virale ale tractului genitourinar inferior, infecții fungice, tuberculoza genitourinară, paraziți (*Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma haematobium*);

**2. Cauze neinfecțioase:** prezența sau utilizarea recentă a unui cateter urinar, efectuarea recentă a unei cistoscopii sau endoscopii urologice, litiaza și neoplazia tractului urinar, amplasarea de stenturi urinare, fistula urinară, boala rinichiului polichistic, rețetul transplantului renal, tromboza de venă renală, nefrita interstițială, lupusul eritematos sistemic, boala Kawasaki.

#### 9.4.7 Sedimentul urinar

Este constituit din elemente organizate și neorganizate.

**A. Sedimentul organizat (componenta biologică)** – este insolubil la cald și în prezența acizilor. Conține celule epiteliale, celule sanguine (hematii, leucocite), cilindri, filamente de mucus, microbi, paraziți, levuri etc.

##### 9.4.7.1 Celulele epiteliale

Aparatul urinar este tapetat cu mai multe straturi de celule epiteliale, cu excepția tubilor uriniferi la care uroteliul este format dintr-un singur strat. Aceste celule prezintă particularități morfologice:

- **Celulele epiteliale pavimentoase (scuamoase, plate)** - sunt mari, plate, cu nucleu picnotic, provin din straturile superficiale ale segmentelor inferioare ale căilor urinare (Figura 9.12). În mod normal, aceste celule sunt absente sau rare.
- **Celulele epiteliale tranzitionale** – sunt fusiforme sau rotunde, au diametrul mai mic decât celulele pavimentoase și posedă nucleu voluminos. Ele provin din descuamarea calicelor renale, bazinei, ureterelor, vezicii urinare, până la segmentul proximal al uretrei. Apar frecvent în procese inflamatorii sau neoplasme. În mod fiziologic se pot identifica sub 3 celule tranzitionale/câmp (Ob. 40x).
- **Celulele epiteliale renale tubulare** – de formă cubică sau cilindrică, citoplasma fin granulată, cu un nucleu mare voluminos (Figura 9.13). Aceste celule sunt un marker pentru leziunile tubulare. Mai apar în infecții de tract urinar (I.T.U.), după administrare de substanțe toxice renale, chimioterapice. Se pot încălca cu lipide, mai ales cu esteri de colesterol. În sedimentul normal se identifică sub 2 celule tubulare/câmp (Ob. 40x).

##### 9.4.7.2 Leucocitele

Sunt sferice, conțin nucleu lobat și granulații fine intracitoplasmice. Le putem identifica izolate, în grupuri sau înglobate în cilindri (Figura 9.14). În urina normală decelăm sub 4-6 leucocite/câmp (Ob. 40x). Prezența lor în număr mare (*piurie*) semnifică I.T.U., tuberculoză renală, procese degenerative ale tractului urinar. Leucocitele rămân intacte în urina acidă și se deformează în urina alcalină.

### 9.4.7.3 Hematiile

Sunt mai mici decât leucocitele, nu au nucleu, prezintă dublu contur la mișcarea vizei micrometrice. Hematiile pot apărea sub două forme:

- *izomorfe* (figura 9.15.a) – au formă de disc biconcav, cu tentă gălbuie, cu contur precis și diametrul constant;
- *dismorfe* (figura 9.15.b) – sunt vidate de hemoglobină, apar decolorate, sunt de mărimi diferite și au un diametru mai mic. Membrana lor este discontinuă și prezintă evaginări veziculare, de aceea se mai numesc *acantocite*. Se vizualizează foarte bine cu microscopia în contrast de fază.

Urina normală conține sub 4-6 hematii/ câmp (Ob. 40x). În hematuria glomerulară peste 80% din eritrocite sunt dismorfe și decolorate. Hematuria nonglomerulară se caracterizează prin prezența de peste 80% de hematii izomorfe. În hematuria mixtă se înregistrează raporturi aproximativ egale de hematii izomorfe și dismorfe. În urinale acide hematiile se pot deforma devenind crenelate, iar în urinale cu pH alcalin se edemațiază devenind rotunde.

### 9.4.7.4 Cilindrii

Sunt mulaje ale tubilor renali, fiind considerați patognomonici leziunilor renale. Se prezintă sub forma unor elemente alungite, cilindrice, bine conturate, cu capete rotunjite sau tăiate drept. Cilindrii pot fi clasificați după mecanismul de formare și după structură (Tabelul 9.II).

Cilindrii nu trebuie confundați cu alte formațiuni lipsite de semnificație patologică, cum ar fi:

- Pseudocilindrii* – sunt aglomerări de produse anorganice (urați, fosfați) sau organice (puroi, fibrină). Eliminarea confuziilor se face prin examinarea la microscopia în contrast de fază și lumină polarizată;
- Cilindrozii* – au formă de panglică cu striatii longitudinale și capete ascuțite, frecvent unul din capete este despicat, marginile nu sunt perfect paralele.

### 9.4.7.5 Picăturile de lipide

Apar în urină numai în context patologic. Se prezintă sub formă de picături libere de grăsime și corpusculi ovalari grăsoși. Se pot identifica prin colorare cu Sudan III când dobândesc o culoare portocaliu-roșie sau în lumină polarizată luând aspect de *cruce de Malta*. Apar în sindromul nefrotic, GN membranoase, după ingestia de etilenglicol sau mercur.

### 9.4.7.6 Levurile (semnificație prezintă mai ales *Candida* spp.)

Au formă ovală sau rotundă, sunt inegale, incolore și pot apare izolate sau grupate – înmugurite (Figura 9.16). Nu au dublu contur. Se pot confunda cu hematiile (adăugarea unei picături de acid acetic 3% va induce liza hematiilor, în timp ce levurile rămân întegre).

### 9.4.7.7 Paraziți

Sunt frecvent întâlniți: *Trichomonas vaginalis*, *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma haematobium*, *Filaria bancrofti*.

Tabelul 9.II Principalele tipuri de cilindri urinari

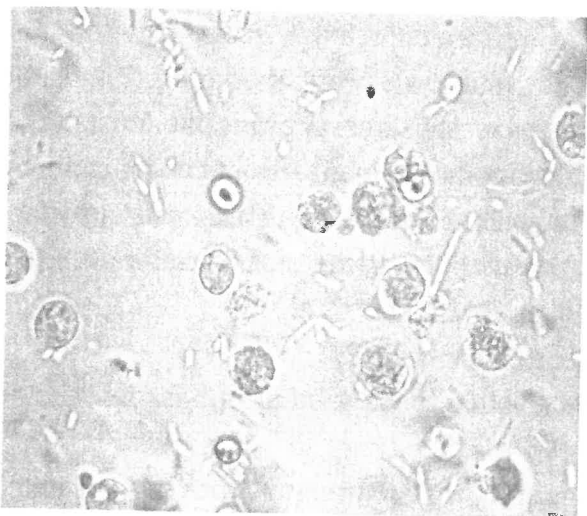
Nr.	Tipul cilindrului	Caracteristici structurale	Condiții de apariție
1.	Cilindri hialini	- au o structură fină, sunt transparent, incolori, omogeni, cu lungimi variabile și extremități rotunjite; - sunt alcătuiți numai din substanța proteică de bază	- normal se evidențiază 0 - 2 cilindri / câmp (Ob. 20x); - însoțesc proteinuriile, mai ales în sindromul nefrotic; - nefropatiile parenchimatoase asociate cu oligurie și pH acid; - la persoane sănătoase apar foarte rar, mai ales după efort fizic prelungit, febră, după administrare de antibiotice
2.	Cilindri granuloși	- frecvent sunt de talie mai mare decât cilindrii hialini, au contur net și extremități rotunjite sau frânte; - prezintă granulații refringente fine sau mari, care provin din dezintegrarea leucocitelor, hematiilor și celulelor epiteliale tubulare (Figura 9.17)	- normal se pot găsi 0 - 2 cilindri / câmp (Ob. 20x); - se înregistrează constant în nefropatiile glomerulare sau interstițiale și în necroza tubulară acută (NTA)
3.	Cilindri ciroși	- au aspect de ceară, culoare gălbuie, au contur bine definit, cu margini crestate, sunt foarte fragili încât se găsesc deseori fragmentați - se formează prin degenerarea cilindrilor granuloși fixați în lumenul tubular timp îndelungat (cilindri de stază)	- normal sunt absenți; - în sindromul nefrotic, în leziuni grave ale parenchimului renal: GN severă, pielonefrită, amiloidoză
4.	Cilindri hematici	- sunt compuși din hematii care sunt înglobate într-o matrice; - uneori hematiile prezintă alterări morfologice	- în mod normal sunt absenți; - indică o hematurie renală; - apar în glomerulonefritele (GN) acute și subacute, GN lupică, rețetul de transplant renal, uneori și în nefropatia tubulo-interstițială
5.	Cilindri leucocitari	- conțin PMN cu diverse grade de degenerescență grupate în formațiuni cilindrice (Figura 9.18);	- normal sunt absenți; - sunt markeri ai infecțiilor acute sau cronice ale parenchimului renal; - apar în pielonefrite, nefropatia lupică
6.	Cilindri epiteliali	- au în componență celule epiteliale tubulare aflate în diferite stadii de degenerescență sau se pot încărca cu corpusculi grăsoși	- normal sunt absenți; - sunt markeri nespecifici ai leziunilor tubulare; - în GN, în sindromul nefrotic
7.	Cilindri grăsoși	- posedă numeroase granulații grăsoase care acoperă suprafața matricei hialine; - în lumină polarizată apar sub formă de cruce de Malta	- normal sunt absenți; - apar în sindromul nefrotic
8.	Cilindri fibroși	- aspect de reticuli speciali de fibrină, de culoare gălbuie	- normal sunt absenți; - sunt de origine sanguină și indică o congestie renală
9.	Cilindri micști	- hialinoleucocitari, hialinohematici, hialinogranuloși, hematoleucocitari, grăsoși - granuloși	- normal sunt absenți;



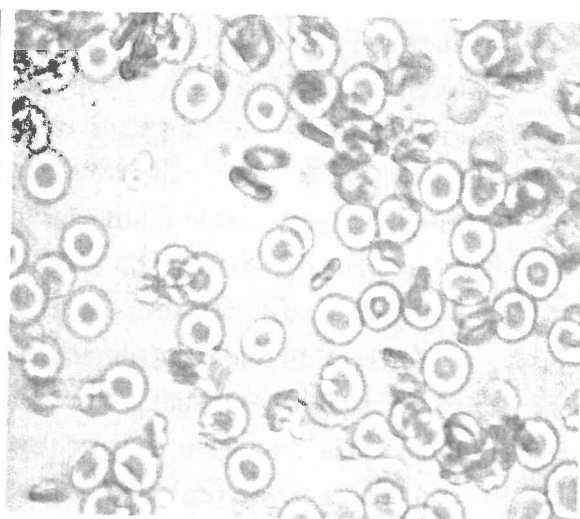
**Fig. 9.12** Celule scuamoase (epiteliale plate sau pavimentoase) în placard - MO x200



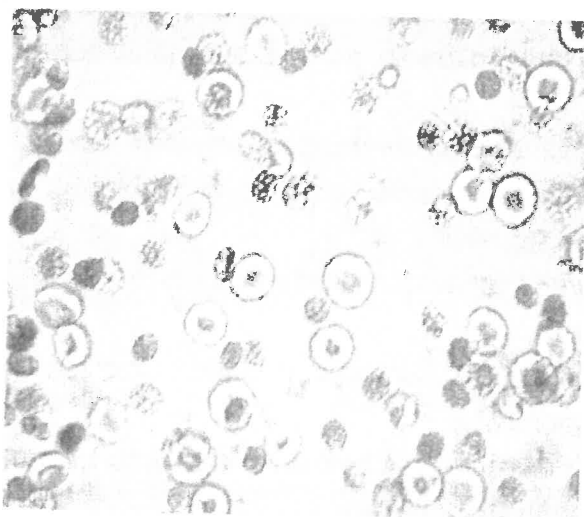
**9.13** Celule renale tubulare (central), alături de câteva leucocite - MO x 200



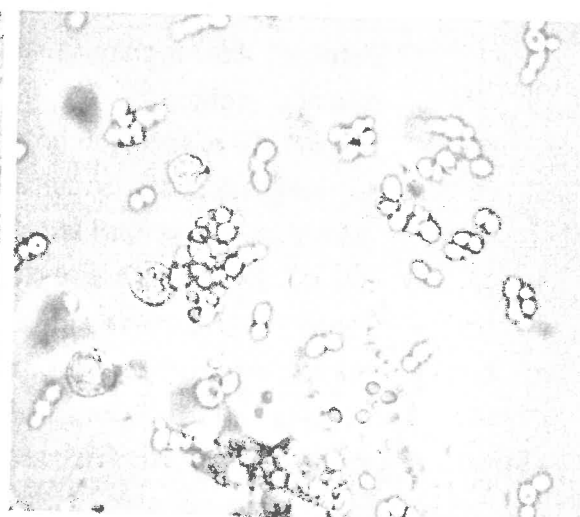
**Fig. 9.14** Frecvente leucocite neutrofile și bacterii, alături de câteva hematii - MO x 400



**Fig. 9.15a** Numeroase hematii eumorfe (aspect de dublu contur) - MO x 400



**Fig. 9.15b** Numeroase hematii dismorfice, cele mai multe ratatinate („în castană”) - MO x 400



**Fig. 9.16** Numeroase celule levurice (aspect oval/“în-mugur”), alături de câteva leucocite - MO x 400

Figurile 9.12 – 9.16 au fost obținute din cazuistica Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș, prin amabilitatea Biol. Spec. Nicoleta Pop, MLC

#### 9.4.7.8 Flora microbiană

Dacă este în cantitate mare, trebuie examinată prin urocultură (vezi figurile 9.14, 9.20).

#### 9.4.7.9 Celulele neoplazice

Necesită colorare cu May-Grunwald-Giemsa sau cu metoda Papanicolau.

#### 9.4.7.10 Filamentele de mucus

Se prezintă sub forma unor benzi subțiri, albicioase (vezi figura 9.17).

#### 9.4.7.11 Alte elemente organice

Spermatozoizi, corpusculi de lecitină (rotunzi, alcătuiți din straturi concentrice, se întâlnesc în afecțiuni prostatice).

**B. Sedimentul neorganizat (componenta chimică)** – este reprezentat de săruri în stare amorfă sau cristalină, de origine metabolică, organică sau anorganică. Urina normală poate conține o anumită cantitate de cristale. În urma diverselor modificări ale pH-ului urinar, ale volumului urinar (oligurie) sau consecutiv unor anumite diete, aceste săruri pot precipita. Cristaluria devine semnificativă în litiaza urinară. În condiții normale sedimentul urinar poate conține următoarele elemente (Tabelul 9.III): cristale de oxalat de calciu, fosfat de calciu, fosfat amoniaco-magnezian, sulfat de calciu, carbonat de calciu, urat de calciu, magneziu, sodiu și potasiu, acid uric (în urina cu pH acid), acid hipuric.

Sedimentul urinar **patologic** poate conține cristale de:

- *tirozină* – cristale sub formă de ace fine, gălbui dispuse sub formă de snopi sau de stea. Sunt solubile în  $\text{NH}_4\text{OH}$ ;
- *leucină* – cristale sferice galben-brune, cu striții concentrice sau radiare, insolubile în HCl sau eter;
- *cistina* - cristale sub formă de tablete hexagonale, incolore, suprapuse, mai greu solubile decât cele de cisteină (cistina este forma dimerică rezultată prin oxidarea cisteinei). Apar în tulburări ale metabolismului protidic. Sunt solubile în HCl, dar nu și în acid acetic;
- *colesterol* – cristale sub formă de „fragmente de sticlă”, rombice, subțiri, incolore, cu marginile tăiate în scară. Se decelează în sindromul nefrotic. Sunt solubile în cloroform și eter, dar nu în acizi sau alcali;
- *bilirubină* – ace roșii-brune care se colorează în verde cu acidul azotic;
- *xantină* – romburi mici incolore;
- *origine medicamentoasă* (acid acetilsalicilic, acid ascorbic, sulfamide, fenacetina etc.) – cu aspect polimorf (Figura 9.19).

**Examenul microscopic cantitativ** al leucocitelor și hematiilor oferă informații mai exacte și permite urmărirea în dinamică a modificărilor urinare.

**Metoda Addis-Hamburger** – proba se recoltează din a 2-a urină de dimineață și urină emisă în următoarele 3 ore, de pacientul menținut în clinostatism.

Tabelul 9.III Principalele tipuri de cristale urinare în sedimentul fiziologic

Nr.	Tipul cristallului	Caracteristici morfologice	Condiții de apariție
1	Oxalatul de $\text{Ca}^{2+}$	- cristale incolore, mici, sub formă octaedrică „de plic” (Figura 9.20) sau de halteră („de pișcot”)	- în urinale cu pH acid; - fiziologic se întâlnesc după ingestia de alimente bogate în oxalați (ex. tomate, portocale, usturoi); - patologic apar în diabetul zaharat, boli hepatice; - cristalele sunt solubile în HCl
2	Fosfatul acid de $\text{Ca}^{2+}$	- cristale incolore, sub formă de plăci („pene”) adunate în rozete sau plăci subțiri și înguste	- în urina acidă, neutră și slab alcalină; - se dizolvă în HCl
3	Acidul uric	- cristale galben-brune polimorfe (rombice, pătrate, cubice, în butoiaș, în stea, haltere, rozete), inegale (Figura 9.21);	- în urina cu pH acid; - se dizolvă în NaOH (formează săruri);
	Urații de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	- granulații fine amorse galben-roz;	- în urina acidă; - formează în vasul colector un depozit de culoare cărămiziu-roșietică; - cristalele precipită la rece și sunt solubile la cald, în acid acetic, HCl
	Uratul de amoniu	- granule galben-brune cu radiații periferice (spiculi), generând aspect de „castană sălbatică” (Figura 9.22)	- preponderent în urina cu pH alcalin, dar și în urinale acide sau neutre; - cristalele sunt solubile în HCl sau acid acetic
4	Sulfatul acid de $\text{Ca}^{2+}$	- cristale incolore aciforme lungi și subțiri sau grupate în rozetă	- în urina cu mare aciditate; - cristalele sunt insolubile în acizi
5	Acidul hipuric	- prisme romboedrice incolore	- cristale solubile în alcool, insolubile în acid acetic
6	Fosfatul amoniaco-magnezian (Figura 9.19)	- cristale incolore prismatice cu aspect de „capac de coșciug”	- în urinale alcaline; - se întâlnesc frecvent în bolile însoțite de stază urinară asociată cu I.T.U., și de asemenea în hipertrofia de prostată, cistita cronică; - cristalele sunt solubile în acizi și insolubile în NaOH
7	Fosfat bicalcic	- cristale aciculare dispuse în stea sau în cruce	- în urinale alcaline; - se dizolvă în HCl, acid acetic
	Fosfat tricalcic	- granule amorse de culoare alb-cenușie;	
	Fosfații bazici de $\text{Mg}^{2+}$	- tablete rombice refringente, incolore, în formă de „cioburi de geam”;	
8.	Carbonatul de $\text{Ca}^{2+}$	- aspect de granulații amorse, sferice sau în halteră, albe-cenușii; - în vasul colector formează un depozit de culoare albă-cenușie	- în urinale alcaline, neutre sau slab acide; - se dizolvă în acid acetic cu degajare de $\text{CO}_2$



Fig. 9.17 Cilindru granulos cu capete drepte, într-o masă de mucus și resturi celulare - MO x200

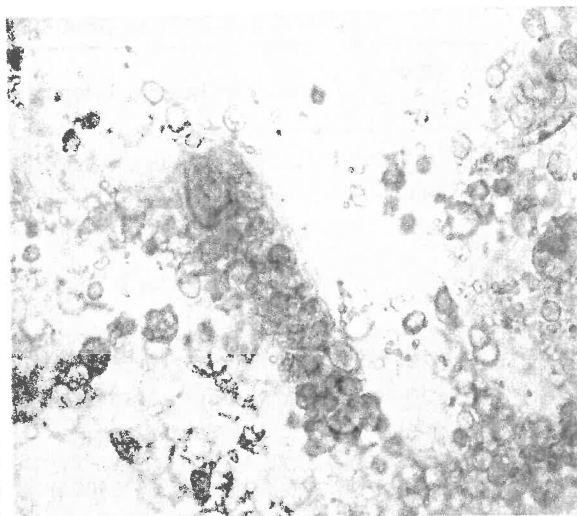


Fig. 9.18 Cilindru leucocitar, într-o masă de neutrofile și levuri izolate și grupate - MO x 200

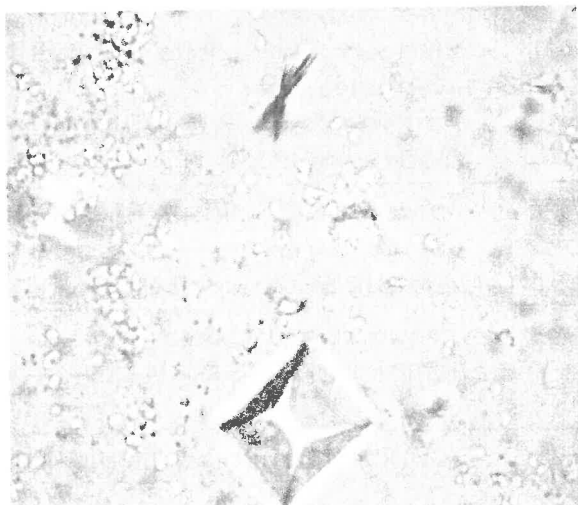


Fig. 9.19 Un macrocristal de fosfat amoniaco-magnezian, alături de un cristal de sulfamidă și frecvente bacterii, umbre de hematii - MO x 400

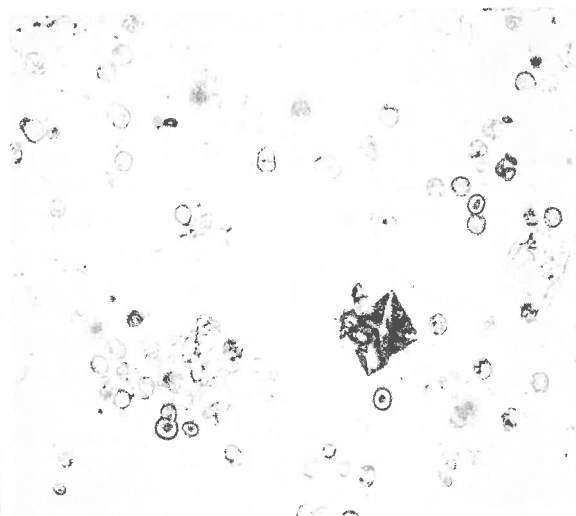


Fig. 9.20 Grup de cristale de oxalat de calciu dihidrat, numeroase bacterii, frecvente leucocite și rare hematii - MO x 200

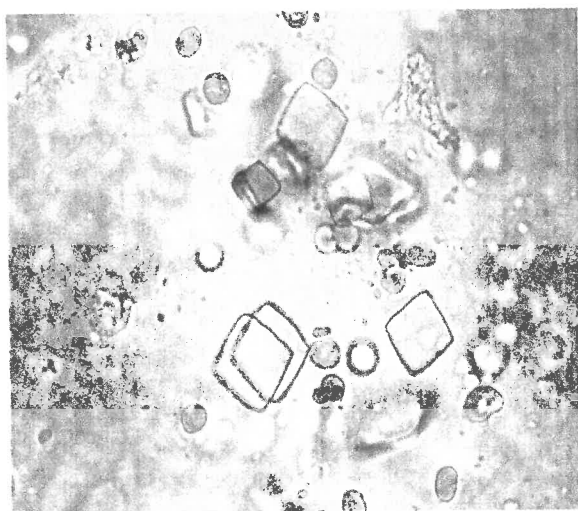


Fig. 9.21 Frecvente cristale de acid uric de formă ovoidală, alături de leucocite - MO x 400

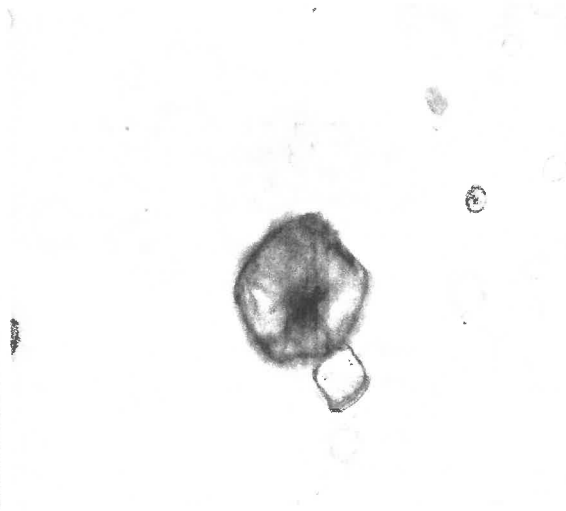


Fig. 9.22 Un cristal de urat alături de câteva leucocite și umbre hemactice - MO x 400

Valorile normale: leucocite < 2000/minut, hematii: 100–1000/minut, cilindri absenți.

Alterări fiziologice ale sedimentului urinar:

- excreția crescută de proteine, celule și cilindri apare în stări febrile, după efort fizic, insuficiență cardiacă congestivă, inaniție, lordoză posturală;
- după administrarea de laxative pot apare în sediment celule gigante multinucleate;
- diureticele de ansă nu induc proteinurie, dar cresc eliminarea de hematii, leucocite, celule epiteliale și produc o cilindrurie importantă;
- în anurie putem identifica piurie, hematurie.

#### 9.4.8 ALTE DETERMINĂRI DIN URINĂ

În urina adunată 24 de ore se pot determina o serie de componenți anorganici (ioni) și organici (acidul uric, creatinina, acidul vanil mandelic, acidul 5-hidroxi indolacetic, metaboliți hormonal).

Creșterea cantității urobilinogenului în urină pledează pentru o afecțiune hepatocelulară, iar lipsa lui totală semnalizează o ocluzie biliară totală (icter mecanic).

Numai bilirubina directă (conjugată) se elimină în urină, nu și bilirubina indirectă (legată de albumină).

Pentru explorarea corectă a funcțiilor renale, privind echilibrul hidromineral, acidobazic, de filtrare glomerulară, de reabsorbție și de secreție tubulară, se recomandă determinarea paralelă a parametrilor respectivi, atât în plasmă cât și în urina colectată 24 de ore.

### 9.5 SINDROAME NEFROLOGICE

#### 9.5.1 SINDROMUL NEFRITIC

Are ca substrat o inflamație a parenchimului renal, cu atingere predominant glomerulară, caracterizat prin proteinurie < 3,5 g / 24 h, hematurie cu hematii dismorfice, cilindrurie (cilindrii hematici fiind patognomonici), edeme, HTA, cu sau fără insuficiență renală. Acest sindrom recunoaște în majoritatea cazurilor o patogenie imunologică. Se produce o proliferare a celulelor endoteliale, epiteliale, mezangiale, cu depozite de imunoglobuline, complement și fibrinogen la nivel glomerular. Cauze:

- glomerulonefrita (GN) difuză acută poststreptococică;
- GN din LED, endocardită, crioglobulinemii;
- GN cu IgA; GN cu anticorpi anti membrană bazală glomerulară;
- toxic-medicaționale: neomicina, amfotericina, citostatice;
- tromboza de venă cavă, de venă renală, insuficiența cardiacă, pericardita.

#### Investigații de laborator:

a. Examenul urinei:

- examenul sumar de urină evidențiază proteine, hematii;
- proteinuria < 3,5 g/24 h;
- sedimentul urinar: hematii dismorfice, cilindrii hematici, hematuria este superioară leucocituriei;

- electroforeza proteinelor urinare decelează o proteinurie de tip glomerular;
- urocultura;
- b. Examenul sanguin:
  - dozări serice de Ig : IgA seric crește în GN cu depozite mezangiale de IgA. În GN cu leziuni minime se observă creșterea de IgM și IgE, iar IgG și IgA sunt scăzute;
  - determinarea de antigene, implicate în reacții imune, de origine virală, bacteriană, parazitară, alimentară etc.;
  - dozarea serică a complexelor imune circulante;
  - determinarea Ac anti-MBG;
  - dozarea complementului seric – scăderea sa se observă în GNA poststreptococică, GN din endocardita bacteriană, din LES. Se poate urmări în dinamică – complementul seric revine la normal în 6-8 săptămâni în caz de evoluție favorabilă;
  - clearance-ul de creatinină scade dacă apare insuficiență renală;
  - determinarea produșilor de degradare ai fibrinei PDF din ser și urină.

### 9.5.2 SINDROMUL NEFROTIC

Este caracterizat prin proteinurie masivă ( $> 3,5 \text{ g} / 24 \text{ h}$ ) cu hipoalbuminemie (sinteza hepatică e inferioară pierderilor urinare de proteine), edeme, hiperlipemie. Se datorează tulburărilor de permeabilitate ale membranei bazale glomerulare, cu sau fără depuneri de imunoglobuline și/sau complement.

#### 9.5.2.1 Etiologie

**Sindrom nefrotic primar** (80% din cazuri):

- GN cu leziuni minime (nu poate fi evidențiată la microscopia optică, dar microscopia electronică decelează fuziunea podocitelor);
- GN membranoasă;
- GN cu depozite mezangiale de IgA;
- GN membranoproliferativă - asociază depuneri de complexe imune și complement;
- Glomeruloscleroza focală și segmentară;
- GN fibrilară.

**Sindrom nefrotic secundar** (20%)

- cauze infecțioase, toxic-medicamentoase, alergice, neoplazice;
- colagenoze, vasculite, mielom multiplu, amiloidoză, diabet zaharat, leucemii, limfoame, vasculite, nefroangioscleroză.

#### 9.5.2.2 Fiziopatologie

- **Tulburări ale metabolismului proteic:**
  - proteinuria este urmată de hipoproteinemie
  - prin pierderea de transferină apare o anemie hipocromă rezistentă la terapia cu fier
  - pierderea proteinelor ce fixează Zn conduce la deprimarea imunității celulare

- pierderea proteinelor care leagă cortizolul favorizează dezvoltarea mai rapidă a sindromului Cushing iatrogen;
- pierderea de ceruloplasmină va genera deficit de Cu;
- pierderea globulinei ce transportă vitamina D se însoțește de hipocalcemie și hiperparatiroidism secundar.
- **Tulburări ale metabolismului lipidic:** în sindromul nefrotic crește colesterolul, trigliceridele și lipidele totale. Se înregistrează creșterea concentrației de apolipoproteină B, C II și E, crește lipoproteina (a); hiperlipemia favorizează arterioscleroza, participă la hipercoagulabilitate și la scăderea imunității celulare; La examenul urinei cu microscopul cu lumină polarizată se evidențiază cristale birefringente caracteristice, expresie a lipiduriei.
- **Tulburări ale metabolismului hidro-mineral:** edeme, sete, oligurie cu hiponatriurie;
- **Tulburări ale hemostazei:** crește concentrația fibrinogenului, a factorilor II, V, VII, VIII, X și XIII cu hipercoagulabilitate și tendință la tromboze; se înregistrează scăderea concentrației de antitrombina III și de plasminogen.
- **Tendința la infecții:** prin scăderea concentrației globulinelor plasmatică și a complementului prin pierdere urinară sau deficit de sinteză.

### 9.5.2.3 Investigații de laborator

#### a. Examenul urinei:

- densitatea urinară poate fi crescută;
- proteinurie >3,5g/24 h;
- sedimentul urinar: celule epiteliale, cilindri hialini (în sindromul nefrotic pur). Apariția de hematii pledează pentru o leziune glomerulară (sindrom nefrotic impur). Putem identifica leucociturie, iar la microscopul cu lumină polarizată se evidențiază cristale birefringente;
- urocultura este de obicei negativă;
- uneori apare o glucozurie moderată;
- PDF pot fi prezenți.

#### b. Examenul sanguin:

- produșii de retenție azotată sunt în limite normale în GN cu leziuni minime;
- VSH-ul și fibrinogenul sunt crescute;
- electroforeza proteinelor serice identifică hipoproteinemie cu reducerea albuminei și a  $\alpha$ 1-globulinei, creșterea nivelului de  $\alpha$ 2- și  $\beta$ -globuline, în timp ce  $\gamma$ -globulinele pot fi normale sau diminuate;
- colesterolul și trigliceridele sunt crescute;
- ionograma serică indică hiponatriemie, hipocloremie, hipo-/ hiperpotasemie, hipocalcemie, normo-/ hiperfosfatemie;
- determinări de imunoglobuline plasmatică;
- proteina C reactivă este normală, dacă nu se suprapune o complicație infecțioasă.

### 9.5.3 INSUFICIENȚA RENALĂ ACUTĂ (IRA)

Este un sindrom acut de deteriorare a funcțiilor renale care are ca și consecință oligurie (<400 ml/24 h), creșterea produșilor de retenție azotată (uree, creatinină), tulburări ale echilibrului hidroelectrolitic și acido-bazic. Evoluția este variabilă în raport cu etiologia, corectitudinea și precocitatea instituirii tratamentului.

#### 9.5.3.1 Cauze

**a. prerenale** – hipovolemia (hemoragii, arsuri, vărsături, diaree, hipertermie), scăderea debitului cardiac (infarct miocardic, tahiaritmii paroxistice prelungite, embolie pulmonară acută), vasodilatația periferică (septicemia cu germeni Gram negativi, reacții anafilactice);

**b. renale** – glomerulonefrite, pielonefrite, nefrite interstițiale, necroza tubulară acută, leziuni vasculare cu ischemie renală (tromboze, anevrism disecant de aortă, HTA malignă, vasculite, sindrom hemolitic-uremic), medicamente nefrotoxice (ex. aminoglicozide, cisplatin);

**c. postrenale** – obstrucții ale tractului urinar (ex. calculi, hiperplazie benignă de prostată, tumori ale tractului urinar), traumatisme vezicale. Obstrucția care se ivește deasupra joncțiunii vezico-ureterale trebuie să fie bilaterală pentru a avea un răsunet major asupra fluxului urinar.

IRA prerenală (funcțională, azotemie, uremie) reprezintă 80% din cazurile de IRA. Este rezultatul unui răspuns fiziologic normal la hipovolemie sau la scăderea presiunii arteriale. Stimularea sistemului RAA și secreția de ADH generează producția unui volum scăzut și foarte concentrat de urină cu natriurie scăzută (<20 mmol/l). Funcția tubulară renală este normală, dar scăderea RFG determină retenția substanțelor care, în mod normal, sunt excretate prin filtrare (ex. creatinina, ureea - raportul concentrației uree urinară: uree plasmatică este >20). Hipoperfuzia renală induce vasoconstricție renală intensă cu redistribuția fluxului sanguin renal și scăderea consecutivă a RFG, dar cu conservarea funcției tubulare. Netratată, uremia prerenală poate progresa spre IRA intrinsecă. Aceasta poate fi prevenită, dacă perfuzia renală este restabilită anterior apariției leziunilor structurale.

În IRA renală (intrinsecă, organică), leziunile glomerulare nu sunt comune în necroza tubulară acută. Totuși, RFG diminuează prin hipoperfuzie glomerulară, generată la rândul ei de vasoconstricția arteriolară. Revenirea la normal a RFG, după corecția deficitului circulator, reprezintă un eșec comun. Motivele nu sunt clare, dar sunt implicate eliminarea intrarenală de substanțe vasoactive și obstrucția lumenului tubular prin cilindrii tubulari sau edem interstițial. Natriuria depășește de obicei 40 mmol/l, iar raportul concentrațiilor uree urinară: uree plasmatică este sub 10, iar raportul dintre osmolaritatea urinară și cea plasmatică este sub 1,1.

În IRA postrenală (mecanică, obstructivă) obstrucția fluxului urinar determină creșterea presiunii hidrostatice, care acționează în opoziție cu RFG și dacă se prelungește, sfârșește în leziuni tubulare renale secundare. Reversibilitatea leziunilor renale în IRA obstructivă depinde de extinderea și durata lor. Anuria completă este rară în IRA și reprezintă un indicator puternic al prezenței obstrucției.

### 9.5.3.2 Fazele clinico-biochimice ale IRA

**a. Faza preanurică (inițială)** are durată de 24-36 ore, debutul este brutal sau insidios. Se caracterizează prin oligurie <400 ml/24 h cu proteinurie discretă, azoturie scăzută, iar ureea și creatinina serice sunt ușor crescute.

**b. Faza anurică** are durată de 9-17 zile. Clinic apar manifestări digestive, cardio-vasculare, neurologice, respiratorii, cutanate, renale, generale. Volumul urinar este sub 400 ml/24 h (în 40% din cazuri nu scade sub această valoare). Osmolaritatea urinară este scăzută. Urina este închisă la culoare (bogată în pigmenti) și proteine. Proteinuria se situează între 1–10 g/24 h. Sedimentul urinar conține celule epiteliale numeroase, *terci epitelial*, leucocite, eritrocite, cilindrii hematici, cilindrii granuloși, cristale de diverse tipuri, germeni.

La bolnavii hipercatabolici (cu febră, stare septică sau traumatisme) ureea și creatinina serice cresc zilnic cu peste 100%; se produce o creștere a produșilor de retenție azotată; apar tulburări hidroelectrolitice: retenție hidrosodată, hiperkaliemie, hiperfosfatemie, hipermagneziemie, hipocalcemie (fie prin diminuarea sintezei 1,25-dihidroxicolecalciferolului, fie prin rezistență la acțiunea PTH-ului), perturbări ale echilibrului acido-bazic.

**c. Faza poliurică** se caracterizează prin eliminarea a peste 4 l urină diluată/24 h; se datorează reluării FG, dar fără reluarea funcției tubulare. În această perioadă există riscul pierderii excesive de apă și electroliți; produșii de retenție azotată scad progresiv. Proteinuria este discretă, de aproximativ 1 g/zi. Sedimentul urinar conține frecvente celule epiteliale, hematii, leucocite, germeni.

**d. Faza de recuperare funcțională** se asociază cu o revenire treptată la normal a funcțiilor tubulare, cu regenerarea celulelor tubulare, dar o deficiență de concentrare poate fi detectată multe luni după faza acută.

### 9.5.3.3 Biomarcheri pentru identificarea precoce a IRA

IRA este o urgență medicală a cărei diagnosticare rapidă este esențială pentru tratamentul corect și reducerea perioadei de recuperare.

Grupul de inițiativă pentru calitatea dializei acute (Acute Dialysis Quality Initiative Group) a propus sistemul de clasificare **RIFLE** (Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage kidney disease) al IRA în trei grupe de severitate și două categorii de prognostic clinic, bazat pe RFG și diureză:

**Risc** – creșterea creatininei serice cu 50% sau scăderea RFG cu mai mult de 25%, respectiv oligurie sub 0,5 mL/kg/oră pentru mai mult de 6 ore

**Injurie** – creșterea creatininei serice cu 100% sau scăderea RFG cu mai mult de 50%, respectiv oligurie sub 0,5 mL/kg/oră pentru mai mult de 12 ore

**Failure** (insuficiență) – creșterea creatininei serice cu 200% (sau peste 4mg/dL) sau scăderea RFG cu mai mult de 75%, respectiv oligurie sub 0,3 mL/kg/oră pentru mai mult de 24 ore (sau anurie mai mult de 12 ore)

**Loss** (pierderea completă a funcției renale pentru mai mult de 4 săptămâni)

**End Stage Kidney Disease** (pierderea completă a funcției renale pentru mai mult de 3 luni).

### A. Marcherii clasici

Metodele disponibile actualmente în diagnosticul leziunilor renale acute, nu au de exemplu valoarea troponinei, în diagnosticul infarctului miocardic:

- Creatinina serică – cu toate calitățile pe care le are în estimarea RFG, nu este un marker care să evidențieze în timp real modificarea de funcție glomerulară (este nevoie să treacă 24-48 ore de la injurie și până la creșterea creatininei serice)
- Ureea serică – concentrația acesteia crește și în situații care nu sunt însoțite neapărat de afectare renală acută (de exemplu în hemoragii gastro-intestinale, arsuri extinse, terapie cu steroizi)
- Diureza - este un parametru dinamic important al funcției renale, care poate funcționa ca un barometru pentru modificarea perfuziei renale, dar are sensibilitate și specificitate scăzute pentru IRA

Acești marcheri sunt utilizați mai degrabă pentru a confirm instalarea IRA, decât pentru a o prevedea.

### B. Biomarcheri potențiali

- Cystatina C** (vezi și 9.4.2.4)- marker important al filtrării glomerulare, chiar dacă creșterea concentrației serice survine abia după 12-14 ore de la injurie, crește oricum cu cel puțin 24 ore mai repede decât creatinina.
- IL-18** – este o citokină proinflamatorie produsă de leucocite și de celulele tubulare proximale. Se pare că creșterea concentrației acesteia în urina pacienților cu IRA (la 2-4 ore după injurie) precede simptomatologia clinică cu cel puțin 12 ore, iar creșterea concentrația urinare peste 100pg/mL a fost asociată cu o creștere semnificativă a riscului de a dezvolta IRA în următoarele 24 ore.
- Neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL)** – este o glicoproteină de 25 kDa, importantă în transportul fierului, eliberată de neutrofile ca răspuns la leziuni tubulare renale acute ischemice sau toxice (la 2-4 ore postinjurie). Creșterea acestui parametru în urina pacienților cu transplant renal, are valoare prognostică negativă.
- KIM-1 (kidney injury molecule -1)** – este o glicoproteină transmembranară implicată în procesele de reparație, exprimată masiv postinjurie (la 12-14 ore) de celulele tubulare renale proximale.

Doar pentru Cystatina C serică și NGAL urinar, există actualmente kituri comerciale, pentru restul markerilor fiind necesare și alte studii pentru a defini mai bine rolul lor în diagnosticul leziunilor renale acute. Se discută tot mai mult despre combinarea biomarkerilor pentru un algoritm diagnostic cât mai precoce/performant în IRA.

#### 9.5.4 BOALĂ/INSUFICIENȚA RENALĂ CRONICĂ (IRC)

Este un sindrom cronic, cu debut insidios, caracterizat prin incapacitatea rinichilor de a-și asigura funcțiile normale, datorită leziunilor organice, ireversibile, cantonate în ambii rinichi sau pe rinichi unic. IRC poate fi explicată în două moduri:

**a. teoria „nefronului intact”** care se referă la reducerea numărului de nefroni activi, iar nefronii restanți devin hiperfuncționali;

**b. teoria clasică a „nefronului patologic”**, cu alterarea difuză, dar incompletă a tuturor nefronilor.

IRC evoluează în cinci stadii: stadiul de deplină compensare, stadiul compensat, stadiul decompensat, stadiul uremic și stadiul de uremie depășită. În raport cu gravitatea, IRC poate avea 6 stadii:

1. Boala renală cronică cu RFG normală sau chiar crescută ( $\text{RFG} \geq 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), presupune însă existența altor anomalii (proteinurie, hematurie, etc)
2. Boala renală cronică cu diminuare ușoară a RFG ( $60\text{-}89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), presupune însă existența altor anomalii (proteinurie, hematurie, etc)
- 3a. Boala renală cronică cu scădere moderată a RFG ( $45\text{-}59 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), prezintă risc crescut de complicații cardiovasculare
- 3b. Boala renală cronică cu scădere moderată a RFG ( $30\text{-}44 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), mulți pacienți pot rămâne asimptomatici în acest stadiu
4. Boala renală cronică cu scăderea severă a RFG ( $15\text{-}29 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), cei mai mulți pacienți sunt simptomatici
5. Insuficiența renală cronică propriu-zisă ( $\text{RFG} < 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), necesită hemodializă și/sau transplant.

Așadar mulți pacienți pot rămâne asimptomatici înainte de scăderea RFG sub  $15 \text{ ml/min}$ . Apare însă deficit în concentrarea urinei, poliuria nu este marcată (nu depășește  $4 \text{ l/zi}$ , pentru că RFG este diminuată).

În IRC apar următoarele modificări:

- *sindromul de retenție a toxinelor uremice*: uree, creatinină, acid uric.
- *sindromul de tulburare a echilibrului hidro-electrolitic* cu pierderi renale de  $\text{Na}^+$ , oligoanurie, poliurie compensatorie. Bolnavii cu IRC își mențin echilibrul  $\text{K}^+$  până când RFG scade sub 25% din valoarea normală. Apare hipocalcemie și hiperfosfatemie.
- *sindromul de tulburare a echilibrului acido-bazic* cu acidoză metabolică hipercloremică.
- *sindromul anemic* - anemie normocromă normocitară

Alte modificări de laborator:

- examenul sumar de urină decelează densitate și osmolaritate scăzute, proteinurie, produși azotați scăzuți, electroliți variabili;
- sedimentul urinar conține hematii decolorate, disforme, frecvente leucocite izolate și grupate, numeroase celule epiteliale, cilindri variați;
- urocultura poate fi negativă sau pozitivă.

Balanța  $\text{Na}^+$  este menținută înainte ca RFG să scadă sub  $20 \text{ ml/min}$ . Sindromul „nefritei cu pierdere de sare” apare cel mai frecvent la pacienții la care boala renală afectează tubii renali: ex. nefropatia la analgezice, boala polichistică și pielonefrita cronică (concentrația plasmatică a  $\text{Na}^+$  va fi scăzută). Hiperpotasemia apare tardiv, dar poate fi precipitată de deteriorarea funcției renale și de utilizarea inadecvată a diureticelor economisitoare de  $\text{K}^+$ .

Pacienții cu IRC tind să dezvolte acidoză metabolică. Capacitatea de tamponare urinară este deficitară ca rezultat al scăderii excreției de fosfat și a sintezei de  $\text{NH}_3$  /eliminării de  $\text{NH}_4^+$ . Capacitatea nefronilor de a reabsorbi bicarbonatul filtrat este deficitară, astfel crește concentrația plasmatică a ionilor de  $\text{H}^+$  și scade bicarbonatul, dar aceste modificări progresează lent, datorită tamponării excesului de ioni de  $\text{H}^+$  în țesutul osos. Mulți pacienți cu IRC devin hipocalcemici și în timp vor dezvolta osteodistrofie renală. Se reduce producția renală de vitamina D și consecutiv se înregistrează hipocalcemie și hiperparatiroidism secundar. Tamponarea ionilor de  $\text{H}^+$  de către țesutul osos conduce la demineralizare osoasă. Creșterea nivelului de PTH cauzează scăderea reabsorbției renale de fosfați. Deprecierea RFG (care este factorul limitant în excreția de fosfați), va conduce la hiperfosfatemie, ce va inhiba sinteza de vitamină D.

Printre consecințele endocrine ale IRC se numără toleranța alterată la glucoză datorită rezistenței la insulină. În timp, pacienții cu IRC vor dezvolta anemie normocromă normocitară datorită inhibării sintezei de eritropoetină, dar și toxinelor remanente ce deprimă măduva osoasă hematogenă.

#### 9.5.5 LITIAZA RENALĂ

Reprezintă prezența de calculi în căile urinare, care se formează prin depuneri de săruri anorganice sau organice în tractul urinar.

Compoziția chimică a calculilor:

- 80% conțin  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- 15% struvit ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ) – apar în infecții ale tractului urinar produse de germeni care posedă capacitatea de a converti ureea în  $\text{NH}_3$  și bicarbonat (ex. *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp.);
- 5% au în compoziție acid uric (se asociază uneori cu hiperuricemia cu sau fără manifestări clinice de gută);
- sub 1% conțin cistină (Cys are solubilitate scăzută în urină, comparativ cu alți aminoacizi transportați de același sistem transportor tubular: Lys, Orn, Arg).

#### Etapele litogenezei:

- hiperconcentrarea urinei în cristaloizi este elementul central (cristaluria);
- formarea nucleelor de condensare;
- creșterea nucleelor;
- formarea calculilor urinari.

#### Factorii precipitanți ai litiazei renale:

- pH-ul urinar acid favorizează precipitarea acidului uric, a cistinei;
- pH-ul alcalin crează condiții pentru formarea calculilor fosfato-amoniaco-magnezieni și a celor cu conținut de fosfat de calciu;
- pH-ul indiferent facilitează dezvoltarea calculilor de acid oxalic;
- urostaza;
- infecția urinară;

- supersaturarea urinei;
- scăderea concentrației inhibitorilor – urina normală conține inhibitori (pirofosfați și glicoproteine), care inhibă creșterea cristalelor de fosfat de  $\text{Ca}^{2+}$  și oxalat de  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- leziunile uroteliale.

Clinic apare colica renală, însoțită de hematurie, proteinurie, leucociturie (piurie).

Analiza calculului este singura investigație care furnizează diagnosticul de certitudine al tipului de litiază. Se poate realiza prin metode chimice sau fizice (cu lumină polarizată, prin difracție de raze X, microscopie electronică de baleiaj). Calculii care au în compoziție  $\text{Ca}^{2+}$  sunt albi, radioopaci; cei care conțin acid uric sunt mici, friabili, galben-maronii, radiotransparenți, dar pot fi vizualizați prin examinare ultrasonică sau urografie (Tabelul 9.IV).

**Tabelul 9.IV Caracteristici ale principalilor calculi urinari**

Nr.	Tipul calculului	Culoarea	Aspectul extern	Consistența	Aspectul radiologic
1.	Oxalatul de $\text{Ca}^{2+}$	galben-brună, verzuie sau neagră	- neted sau cu excrescențe rotunjite muriforme; - structură cristalină vizibilă la exterior	foarte duri	radioopaci
2.	Fosfați de $\text{Ca}^{2+}$ și $\text{Mg}^{2+}$	alb-gălbuie sau cenușie	- neted	sfărâmcioși	radioopaci
3.	Fosfatul amoniac-magnezian	albă cu nuanțe de cenușiu	- structură cristalină	sfărâmcioși	radioopaci
4.	Acidul uric și urații	galben-portocaliu până la brun-roșcat	- formă globoidă, mici și compacți	duri - friabili	transparenți
5.	Cistina	alb-gălbuie sau verzuie	- translucid, ceros	denși	radioopaci

## 9.6 PREZENTĂRI DE CAZ

### 9.6.1 INSUFICIENȚĂ RENALĂ ACUTĂ LA UN PACIENT CU COLITĂ CAUZATĂ DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Bărbat în vârstă de 69 ani este adus cu ambulanța la un serviciu de urgență cu stare generală alterată, acuzând diaree apoasă cu sânge de mai multe zile, dureri abdominale difuze, febră, frisoane.

Din antecedentele personale patologice aflăm că este cu sechele post AVC și recent a fost externat dintr-un serviciu specializat, unde a urmat tratament cu antibiotice. Pacientul nu se afla în evidența medicului de familie cu IRC sau boală hematologică.

Examenul obiectiv evidențiază: tegumente palide și extremități reci, semne de iritație peritoneală, febră 38,50C, anurie.

Rezultatele analizelor de laborator și paraclinice:

- Hemoleucograma: WBC 32.000/ $\mu\text{l}$ , Hgb 14,9 g/dl, Htc 48,8%, PLT 250.000/ $\mu\text{l}$ ;
- Creatinina serică 3,20 mg/dl, Ureea serică 97 mg/dl;

- AST 70 U/l, ALT 24 U/l, Fosfataza alcalină 211 U/l, Amilaza serică 80 U/l;
- BiT 0,40 mg/dl, BiD 0,10 mg/dl;
- Albumina serică 12,0 g/L;
- PCR 120 mg/L;
- Ecografia abdominală decelează îngroșarea peretelui colonic, preponderent pe cadranul descendent, ascită medie perihepatic, interileal și la nivel pelvin;
- Proba de scaun a fost pozitivă pentru toxinele A și B de *C. difficile*.

**Discuție:** Infecția cu *C. difficile* este favorizată de consumul de antibiotice administrate sistemic. La cazul redat anterior remarcăm prezența mai multor factori de severitate ai infecției: vârsta, temperatura corporală, leucocitoza, hipoalbuminemia.

Starea septică reprezintă asocierea dintre semnele sindromului de răspuns inflamator sistemic (SIRS) și prezența unui focar de infecție. Reacția gazdei la invazia microbiană implică o polifonie de semnale și răspunsuri care induce amplificarea procesului inflamator și agravează disfuncția endotelială. Când mecanismele compensatoare sunt depășite survin disfuncții de organ majore. La cazul prezentat apariția IRA a generat conturarea sepsisului sever. IRA a survenit prin reducerea efectivă a volumului circulator și implicit a fluxului sanguin renal în contextul sindromului diareic prelungit, a hipoalbuminemiei, a pierderii de fluide în așa numitul “al treilea spațiu” coroborat cu declanșarea mecanismelor sepsisului. Hipovolemia generează hipoperfuzia cerebrală și a altor organe vitale cu activarea baroreceptorilor. Se amplifică eliberarea de hormoni cu efect vasoconstrictor. În plus, vârstnicii sunt susceptibili la dezvoltarea de IRA și prin predispoziția lor la hipovolemie, precum și datorită unei prevalențe mari a bolii aterosclerotice ce implică artera renală.

Diagnosticul precoce al infecției cu *C. difficile* și administrarea tratamentului specific mai ales la pacienții vârstnici previn apariția complicațiilor, a sindromului de disfuncție multiplă de organe și evoluția fatală.

### 9.6.2 PACIENTĂ CU MIELOM MULTIPLU (MM)

Femeie în vârstă de 53 ani se prezintă la un serviciu specializat acuzând astenie, dureri osoase dorsolombare accentuate la mobilizare, cu iradiere în membrul inferior drept, parestezii, transpirații profuze nocturne, scădere ponderală.

Examenul clinic nu decelează adenopatii periferice palpabile, nici hepatosplenomegalie; Rezultatele analizelor de laborator și paraclinice au relevat:

- Hemoleucograma: WBC 8.900/μl, Hgb 13,2 g/dl, Htc 41,0%, PLT 225.000/μl;
- VSH 132/148 mm (1oră/2 ore);
- Proteine totale serice 91 g/L, Electroforeza serică: gradient monoclonal “M” în zona gama 3 de aproximativ 70% din valoarea proteinelor totale;
- Ca seric 2,7 mM/L, Acidul uric seric 9,6 mg/dl; Fosfataza alcalină 241 U/l;
- β2-microglobulina 7521 ng/ml;
- Creatinina serică 2,55 mg/dl, Ureea serică 63 mg/dl;

- Pe frotiul sanguin periferic s-au evidențiat rulouri eritrocitare, iar măduva osoasă a fost infiltrată cu 45% plasmocite maligne;
- Proteinurie Bence Jones pozitivă;
- RMN: leziuni osteolitice la nivelul coloanei vertebrale toraco-lombo-sacrate.

**Discuție:** MM trebuie suspionat la pacienții care acuză dureri osoase persistente inexplicabile, cu VSH > 100 mm/oră, cu proteine totale serice crescute, proteinurie, hipercalcemie și fosfatază alcalină normală.

La cazul prezentat valorile creatininei și ureei serice sunt crescute. Insuficiența renală (rinichiul mielomatos) se înregistrează frecvent la debutul MM sau survine pe parcursul evoluției bolii datorită depunerii de lanțuri ușoare libere de imunoglobuline (proteinele Bence Jones) în tubii contorți distali, hipercalcemiei, hiperuricemiei, amiloidozei. Creșterea concentrației  $\beta$ 2-microglobulinei serice indică prezența unei mase tumorale mari sau o funcție renală alterată.

### 9.6.3 ITU CU GERMEI DIFICIL DE IDENTIFICAT PRIN METODELE BACTERIOLOGICE UZUALE DE CULTIVARE

#### 9.6.3.1 ITU cu *Haemophilus influenzae* la o pacientă diabetică

Femeie în vârstă de 74 ani cunoscută cu DZ tip 2 tratat cu antidiabetice orale se prezintă la un serviciu de urgență acuzând astenie, fatigabilitate, xerostomie, poliurie, disurie.

Din antecedentele personale patologice mai reținem sechele post AVC, cardiomiopatie dilatativă, fibrilație atrială cronică, gonartroza stangă avansată.

Rezultatele analizelor de laborator:

- Glicemia 350 mg/dL;
- Hemoleucograma: WBC 14.200/ $\mu$ L, Hgb 14,1 g/dL, Htc 42,5%, PLT 350.000/ $\mu$ L;
- Examenul sumar de urină:
  - Bilirubina - negativ
  - Urobilinogen – normal
  - Corpi cetonic - negativ
  - Acid ascorbic - negativ
  - Glucoza 500 mg/dL
  - Proteine 500 mg/dL
  - pH = 5
  - Nitriți - negativ
  - Eritrocite 50/ $\mu$ L
  - Leucocite 75/ $\mu$ L
  - Densitate 1,015 g/mL
- Sedimentul urinar: eritrocite izomorfe, leucocite, numeroși germeni;
- Urocultura evidențiază *Haemophilus influenzae* netipabil >100.000 UFC/ml
- VSH: 52/85 mm (1oră/2 ore)

**Discuție:** ITU se întâlnesc frecvent la pacienții diabetici și în majoritatea cazurilor sunt cauzate de *E. coli*. Infecțiile amplifică eliberarea hormonilor cu efect hiperglicemiant generând creșterea necesarului de insulină.

Particularitatea cazului este dată de diagnosticarea unei ITU cu *H. influenzae* la o pacientă vârstnică având în vedere că *H. influenzae* este în general raportat ca și cauză de ITU mai ales la copii. Datorită exigențelor nutritive ale speciilor de *Haemophilus* evidențierea acestora din urocultură necesită atenție sporită din partea microbiologului precum și o permanentă colaborare cu clinicianul. Cu certitudine incidența reală a ITU cu *H. influenzae* rămâne subestimată.

### 9.6.3.2 ITU cu *Corynebacterium urealyticum* la un pacient cu antecedente urologice semnificative

Bărbat în vârstă de 75 ani cunoscut cu litiază ureterală bilaterală, ureterohidronefroză asociată și multiple intervenții urologice invazive se prezintă la un serviciu specializat acuzând disurie, polakiurie, emisia de urini tulburi cu nuanță roșiatică.

Analizele de laborator au evidențiat:

- Examenul sumar de urină:
  - Bilirubina - negativ
  - Urobilinogen – normal
  - Corpi cetonic - negativ
  - Acid ascorbic - negativ
  - Glucoza - normal
  - Proteine 500 mg/dL
  - pH = 9
  - Nitriți - negativ
  - Eritrocite 300/μL
  - Leucocite 500/μL
  - Densitate 1,005 g/mL
- Sedimentul urinar indică prezența cristalelor de fosfați amoniaco-magnezieni și numeroși germeni;
- Din uroculturi seriate se evidențiază *Corynebacterium urealyticum* >100.000 UFC/mL

**Discuție:** *C. urealyticum* se asociază cu ITU acute sau cronice, cu urolitiază, precum și cu cistita încrustată alcalină mai ales la pacienți imunodeprimați, posttransplant renal sau la cei cu complicații postchirurgicale urologice. Acest microorganism are capacitatea de a transforma ureea cu producerea de  $\text{NH}_3$  și alcalinizarea consecutivă a urinei.

## Bibliografie selectivă

1. Bagshaw S. M., Zappitelli M. and Chawla L. S. - Novel biomarkers of AKI: the challenges of progress 'Amid the noise and the haste', *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28: 235-238.
2. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p. 315-344.
3. Bishop M.L., Fody E.P. – Reference values for frequently assayed clinical chemistry analytes. In *Clinical Chemistry: Principles procedures, correlations*, 5th Ed, Williams & Wilkins, 2005.
4. Bonventre, J. – Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A specific and sensitive biomarker of kidney injury, *Scand J Clin&Lab Invest*, 2008, 68 (S241): 78-83.
5. Delanghe J.R – How to establish glomerular filtration rate in children, *Scand J Clin&Lab Invest*, 2008, 68 (S241): 46-51.
6. Devlin T.–*Textbook of Biochemistry*, Ed.3, Wiley- Liss, 1992, p. 1045-1058.
7. Dumitrașcu V., Gîju S., Grecu D.Ș. – *Sedimentul urinar*, Ed de Vest Timișoara, 2007, 42-289.
8. Edwards JJ, Tollaksen SL, Anderson NG -Proteins of human urine.III. Identification and two-dimensional electrophoretic map positions of some major urinary proteins, *Clin Chem* 1982, 28/4, 941-948.
9. Funduc I, Urinary proteins, *Revista Română de Medicină de Laborator* 2008,12,3,63-68.
10. Gilbert J.W., Peter N.S. – Sterile pyuria, *N Engl J Med* 2015;372:1048-54.
11. Guder WG, Zawta B Renal diseases- Fundamentals of laboratory diagnostics Boehringer Mannheim GmbH, Ed.B.Zawta, 1955-8.
12. Henry J. B. – *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th Ed, Saunders, 2001, p. 367-402.
13. Kaplan L.A., Pesce A.J. – *Clinical Chemistry - theory, analysis, correlation*, 5th Ed, Mosby Co, 2010, p. 567-585.
14. Karen DF - Protein electrophoresis in clinical diagnosis, Arnold E (Publishers)Ltd , Examination of urine for proteinuria, 2003, 217-259.
15. Kashif W, Siddiqi N, Dincer AP, dincer HE, Hirsch S - Proteinuria:how to evaluate an important finding, *Cleveland Clin J Med* 2003, 20,6,535-46.
16. Marshall W., Bangert S., Lapsley M. – *Clinical Chemistry*, Ed.7, Mosby, 2012, p.63-84.
17. Marshall W., Lapsley M., Day A.P., Ayling R. – *Clinical Biochemistry – Metabolic and Clinical Aspects*, Ed. 3, ELSEVIER, 2014, p.124-151.
18. Martensson J., Martling C.-R. and Bell M.- Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability, *British Journal of Anaesthesia*, 2012, 109(6):843-50.
19. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine*, Williams & Wilkins, 1994, p. 371-386, 513-548.
20. Myers, G.L. – Standardization of serum creatinine measurement: Theory and practice, *Scand J Clin&Lab Invest*, 68 (S241), 2008, 57-63.
21. Pagana K., Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby-ELSEVIER, 3rd Ed, 2006, p. 953-1031.
22. Turgeon M. L. – *Clinical Laboratory Science - The basics and routine techniques*, Evolve-Elsevier, 5th Ed, 2007, p.349-424.
23. Ursea N. – *Esențialul în nefrologie*, Editura Medicală, 2000.

24. Venkat KK - Proteinuria and microalbuminuria in adults:significance, evaluation and treatment, Southern Med J, 2004, 97(10), 969-79.
25. [www.kidney.org](http://www.kidney.org) (National Kidney Foundation US)

# 10

## Concepte de bază în interpretarea variațiilor patologice ale enzimelor serice

Mircea Cucuianu, Ioana Brudașcă

După enzimologi, viața ar fi o funcție armonioasă a enzimelor, iar bolile s-ar putea defini ca fiind deficite sau dezordini ale sistemului enzimatic. O astfel de definiție, voit exagerată, este desigur menită să atragă atenția asupra importanței sistemelor enzimatic, a căror perturbare se situează între verigile patogenice cele mai importante.

Pentru practica clinică este în primul rând important de a stabili mecanismele care duc la modificări ale enzimelor detectabile prin metodele laboratorului clinic, respectiv de a se preciza valoarea diagnostică și limitele determinărilor de enzime.

Pe de altă parte, hormonii, citokinele și o mare parte a medicamentelor acționează prin intermediul sistemelor enzimatic, stimulând sau inhibând aceste sisteme prin diverse mecanisme. Din acest motiv este necesară o scurtă trecere în revistă a unor probleme cu caracter mai general privind noțiunea de enzimă, localizarea intracelulară a enzimelor, clasificarea și mecanismul de acțiune al enzimelor, factorii de care depinde viteza unei reacții enzimatic, precum și mecanismele de activare, de degradare și de eliminare din organism a diverselor enzime.

### 10.1 DATE GENERALE PRIVIND ENZIMELE

Enzimele sunt proteine produse de celulele vii și dotate cu funcții catalitice specifice. Ele catalizează reacții enzimatic care, în lipsa lor, ar putea decurge doar foarte lent sau la temperaturi ridicate incompatibile cu viața. În calitatea lor de catalizatori, enzimele sunt dotate cu următoarele proprietăți: sunt eficiente în cantități mult mai reduse decât substanțele pe care le transformă și care poartă denumirea de substrat; rămân practic neschimbate la sfârșitul reacției catalizate; nu modifică echilibrul unei reacții reversibile dar accelerează viteza cu care acest echilibru este atins.

Totodată, în calitatea lor de proteine, enzimele prezintă toate caracteristicile legate de structurile compușilor proteici, putând fi denaturate de agenți care le alterează conformația și putând fi separate și purificate cu ajutorul tehnicilor utilizate în studiul proteinelor.

O proprietate importantă a reacțiilor enzimatic care au loc în celulele vii (in vivo) constă în posibilitatea de a fi susceptibile față de o reglare biologică, putându-și crește sau limita activitatea în funcție de anumite semnale și oarecum în funcție de necesități.

Întrucât marea majoritate a reacțiilor biochimice sunt catalizate de enzime specifice, numărul de enzime descoperite și descrise este în continuă creștere depășind, la ora actuală, cifra de 2000.

### 10.1.1 CLASIFICAREA ȘI NOMENCLATURA ENZIMELOR

Conform recomandării Comisiei pentru enzime (Enzyme Commission) a Uniunii Internaționale de biochimie, denumirea enzimelor se bazează pe următoarele criterii:

- A. Enzimele se împart în 6 clase principale în funcție de tipul reacției catalizate (Tabelul 10.1).
  - B. Numele fiecărei enzime are două părți. Prima parte indică substratul sau substratele asupra cărora acționează enzima; a doua parte a denumirii indică tipul de reacție catalizată, iar la sfârșit se adaugă sufixul *ază*.
  - C. Informații suplimentare privind eventualele particularități ale reacției catalizate pot fi date în paranteză.
  - D. Fiecare enzimă are un număr de cod: prima cifră indică tipul de reacție (clasa de enzime); eventuala subclasificare este semnalată de următoarele două cifre iar a patra cifră indică enzima individuală din respectiva clasă. Numărul de cod este precedat de inițialele EC (Enzyme Commission).
- Așa de exemplu creatinkinaza (CK, notată și CPK), care catalizează reacția:



ar avea ca denumire științifică: ATP - creatinfosfotransferază iar numărul de cod ar fi EC 2.7.3.2 (2 pentru clasa transferazelor, 7 pentru subclasa fosfotransferazelor, 3 pentru grupul de fosfotransferaze având ca acceptor un radical nitrogen, iar 2 pentru locul enzimei în cadrul subgrupeii).

Conform aceluiași principiu, o serie de enzime determinate în mod curent în laboratorul clinic ar căpăta denumiri recomandate de EC. De exemplu:

- transaminaza glutamic oxalacetică (GOT) ar deveni EC 2.6.1.1. L-aspartat-2-oxoglutarat aminotransferază (ASAT sau AST);
- transaminaza glutamic piruvică (GPT) s-ar denumi corect EC 2.6.1.2. L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferază (ALAT sau ALT);
- lactatdehidrogenaza (LDH) s-ar denumi EC 1.1.1.27. L-lactat NAD oxidoreductază;
- colinesterază serică (CHE) s-ar defini ca EC 3.1.1.8 acil colinacilhidrolază.

Astfel de denumiri și numere de cod facilitează găsirea enzimelor în cataloage și evită confuziile, dar îngreunează comunicarea rapidă între secțiile clinice (incluzând și personalul mediu) și laborator. Din acest motiv, denumirile uzuale ale enzimelor (și de cele mai multe ori doar prescurtările acestor denumiri) înrădăcinate în patologia clinică se vor folosi pe parcursul acestui capitol.

Tabelul 10.1 Clasificarea și nomenclatura enzimelor

Clasa	Reacții catalizate	Exemple de subclase	Exemplu ilustrat cu:	
			Denumirea științifică	Denumirea uzuală
1. Oxidoreductaze	Oxidarea unui substrat (S) concomitent cu reducerea altuia (S'); $S \text{ redus} + S' \text{ oxidat} \rightarrow S' \text{ redus} + S \text{ oxidat}$	1-1 Acționând asupra grupării CH-OH	EC 1.1.1.1. Alcool-NAD oxidoreductază	Alcool dehidrogenază
2. Transferaze	Transferul unei grupări G de pe un substrat pe altul $SG + S' \rightarrow S + S'G$	2-7 Transfer de grupări fosfat (fosfo-transferaze)	EC 2.7.1.1. ATP-D-hexozo-6 -fosfotransferază	Hexokinază
3. Hidrolaze	Hidroliza legăturilor eter, ester, peptid, glicozil;	3-1 Acționând asupra legăturii ester	EC 3.1.1.8. Acilcolină acilhidrolază	Colinesterază
4. LIAZE	Îndepărtează grupări de pe substrat lăsând în loc duble legături	4-2 Carbon-oxigen-liază	EC 4.2.1.2. L-malat-hidroliază	Fumarază
5. Izomeraze	Interconversiunea izomerilor	5-3 Interconversiunea aldozelor și cetozelor	EC 5.3.1.1. D-glicerol-aldehid-3-fosfat-ketol-izomerază	Triozofosfat izomerază
6. Ligaze	Formarea legăturilor C-O, C-N, C-S în reacții cuplate cu degradare de ATP	6-3 Formarea legăturii C-N	EC 6.3.1.2. L-glutamat-amoniu-ligază	Glutaminsintetază

### 10.1.2 STRUCTURA ȘI MECANISMUL DE ACȚIUNE ALE ENZIMELOR

Perfecționarea tehnicilor de separare și purificare a enzimelor, alături de studii de difracție a razelor X de către un cristal de protein-enzimă, precum și stabilirea de corelații între activitatea unei enzime și eventualele modificări induse în compoziția în aminoacizi a enzimei au permis o mai bună înțelegere a structurii enzimelor și totodată a mecanismului de acțiune.

Orice enzimă prezintă un **centru activ** în care diverșii radicali aminoacidici sunt aranjați spațial în așa fel încât să permită fixarea și modificarea substratului. Așa de exemplu centrul activ al colinesterazei conține acid glutamic (radical acid  $\text{COO}^-$ ) de care se fixează gruparea bazică a colinei ( $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) și un radical serină prevăzută cu un oxidril prin care stabilește o legătură ester tranzitorie cu acidul gras din molecula de acilcolină (vezi Figura 10.1).

Alte zone din structura protein-enzimei pot fixa micromolecule care, diferă față de substrat, dar care modifică afinitatea enzimei față de substrat (crescând-o sau diminuând-o). Astfel de zone **alosterice** pot interveni astfel în reglarea activității enzimelor. Asupra activatorilor și inhibitorilor alosterici se va reveni.

Natura acizilor aminați din structura unei enzime are importanță și pentru **formarea unor complexe** cu rol în procesul de activare al enzimei respective. Așa de exemplu protrombina și factorii coagulării VII, IX și X, alcătuind așa zisele proteaze serinice dependente de vitamina

K, sunt dotați cu grupări gama-carboxiglutamice care nu intră în centrul activ al enzimelor menționate, dar prin intermediul cărora se stabilesc punți de calciu cu fosfolipidele și se formează complexe cu proteazele activatoare, ceea ce duce la activarea protrombinei și a celorlalți zimogeni, prin proteoliză limitată.

Modificările conformaționale induse, de exemplu, prin căldură sau prin agenți oxidanți, alterează structura proteinenzimei și duc la pierderea activității enzimatice.

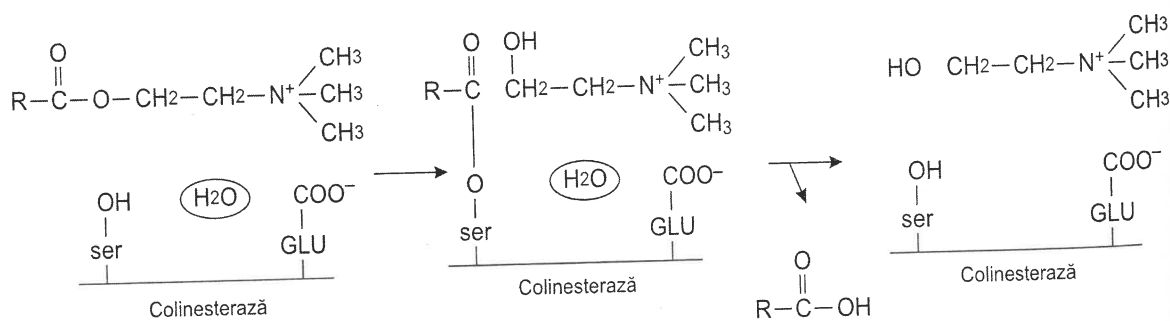
Așa cum se pot vedea din Figurile 10.1 și 10.2, reacția enzimatică poate fi concepută ca petrecându-se în două etape: formarea complexului enzimă-substrat, urmată de modificarea substratului și desprinderea de pe enzimă a produșilor rezultați.

Zona activă a unei enzime nu mai este astăzi concepută ca un tipar strict preformat și rigid, în care substratul se potrivește precum cheia în broască. Există de fapt dovezi pentru teoria lui Koshland conform căreia zona activă a enzimei este dotată cu o oarecare plasticitate, astfel încât substratul poate induce modificări conformaționale ale enzimei care devine mai receptivă față de substrat și ajunge "să se potrivească" mai bine cu acesta.

### 10.1.2.1 Specificitatea unei reacții enzimatice

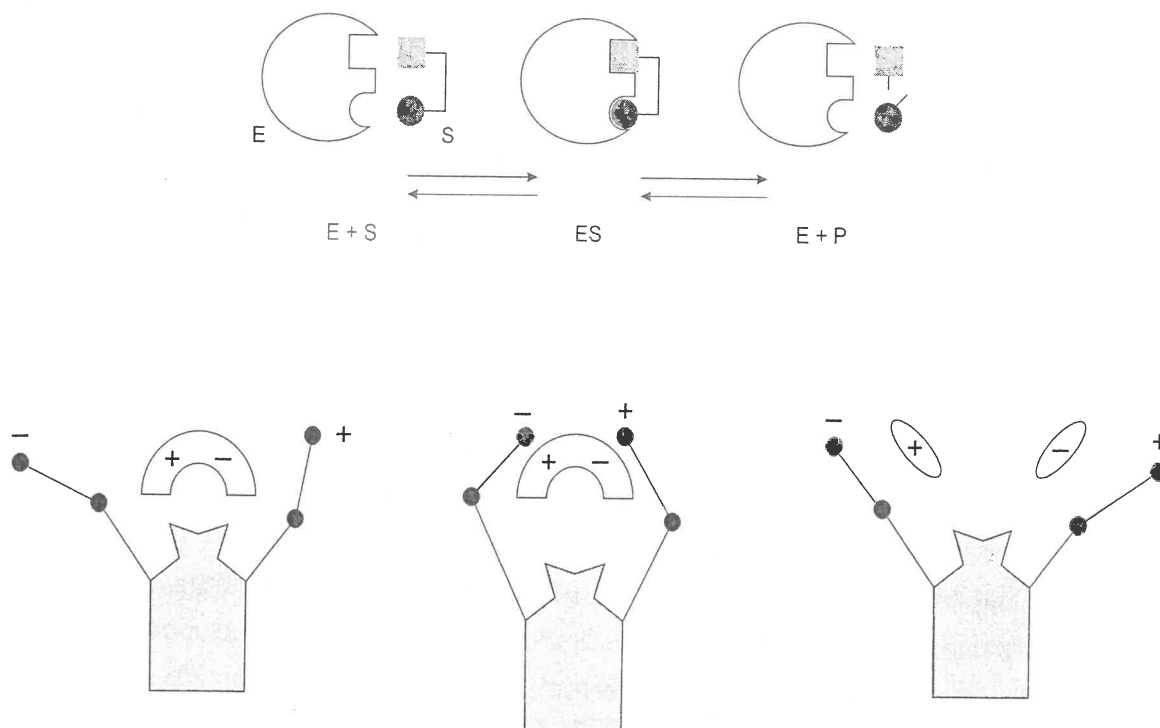
Spre deosebire de catalizatorii neproteici care pot cataliza o mare varietate de reacții chimice, enzimele prezintă **o specificitate de reacție și o specificitate de substrat**. Prin specificitatea de reacție se înțelege capacitatea enzimelor de a cataboliza doar un anumit tip de reacție (oxido-reducere, transfer, hidroliză etc.). Specificitatea de substrat este mai relativă, în sensul că majoritatea enzimelor pot cataliza o anumită reacție, acționând asupra unor substraturi înrudite structural. Așa de exemplu colinesteraza serică hidrolizează o serie de esteri ai colinei (acetilcolină, benzoil-colină, butirilcolină, acesta din urmă ester fiind hidrolizat mai rapid și reprezentând un așa-zis substrat preferențial).

De asemenea, plasmina scindează proteolitic nu numai fibrina ci și alte proteine, ca de exemplu cazeina, hemoglobina, factorii V și VIII ai coagulării precum și unii esteri sintetici



**Figura 10.1 Exemplu ilustrativ privind structura centrului activ al unei enzime.**

În cazul colinesterazei serice (CHE) principalii constituenți ai centrului activ sunt o grupare anionică (-COO<sup>-</sup>) și un radical serină. Reacția catalizată de CHE ar decurge în următoarele etape: 1) alinierea substratului acilcolină la centrul activ al enzimei; 2) desfacerea legăturii ester a acilcolinei și formarea unei legături ester trecătoare între acidul gras și radicalul serină din centrul activ al CHE; 3) adăugarea unei molecule de H<sub>2</sub>O și desfacerea legăturii tranzitorii dintre serină și acidul gras. Rezultatul final al acestei reacții de hidroliză este scindarea acilcolinei în acid gras și colină, care reprezintă produșii de reacție și care se desprind apoi de pe suprafața enzimei.



**Figura 10.2** Reprezentarea schematică a formării complexelor enzimă substrat.

E = enzimă; S = substrat; P = produs de reacție; A. ipoteza tiparului rigid conform căruia substratul se potrivește în centrul activ al enzimei “precum cheia în broască”; B. ipoteza modificărilor conformaționale suferite de enzimă în cursul fixării substratului.

ai argininei și lizinei. Având însă o afinitate deosebită față de fibrină, aceasta va constitui substratul preferențial.

Dacă specificitatea de substrat este oarecum relativă, **specificitatea de grup** este însă strictă, înțelegându-se prin aceasta că o anumită enzimă acționează numai asupra unor grăpări chimice particulare. Astfel chimotripsina hidrolizează doar legăturile peptidice în care gruparea carboxil este dată de un acid aminat aromatic (fenilalanină, tirozină), iar trombina acționează numai asupra legăturilor peptidice dintre arginină și glicocol.

Există și o **specificitate optică**, anumite enzime acționând doar asupra izomerilor D (de exemplu enzimele glicolitice) sau doar asupra izomerilor L (enzimele cu rol în metabolismul acizilor aminați). Se admite și o **specificitate de coenzimă**. Așa de exemplu oxidoreductazele acționând în procesele de biosinteză utilizează NADPH<sub>2</sub> ca reducător, în timp ce enzimele oxidoreductoare cu rol în procesele de degradare utilizează de preferință NAD ca acceptor de hidrogen.

### 10.1.2.2 Principii de determinare a unei activități enzimaticice

Dozarea enzimelor se bazează pe determinarea activității lor, adică pe capacitatea de a cataliza o anumită reacție. De fapt, în condiții optimizate, viteza unei astfel de reacții este proporțională cu cantitatea de enzimă prezentă în mediu. Ca urmare, exprimarea activității unei enzime se face pe baza vitezei reacției catalizate (respectiv cantitatea de substrat modificat pe unitatea de timp).

Conform definiției date de Uniunea Internațională de Biochimie, o unitate enzimatică (U) catalizează transformarea unui micromol de substrat în decurs de un minut în condițiile standard recomandate. În laboratoarele clinice se obișnuiește ca activitatea enzimatică să se raporteze la 1 litru sau la 1 mL ser sau plasmă. În consecință, exprimarea se poate face sub formă de U/L sau mU/mL, valorile fiind de altfel identice din punct de vedere numeric.

Se discută și adoptarea noțiunii de "Katal" care ar reprezenta activitatea enzimatică capabilă să transforme un mol de substrat în decurs de o secundă ( $\text{Kat} = \text{mol/sec}$ ) iar pentru a se evita utilizarea numerelor subunitare se recurge la subunități de Katal și anume microkatal ( $\mu\text{Kat}$ ) sau nanokatal (nKat). Transformarea din U/L în  $\mu\text{Kat/L}$  se face împărțind U/L la 60 (1 minut = 60 secunde). Așa de exemplu o activitate ASAT de 16 U/L devine 0,266  $\mu\text{Kat/L}$  sau 266 nKat/L. Acest mod de exprimare nu este însă unanim acceptat și în majoritatea revistelor de specialitate rezultatele sunt prezentate ca U/L.

În lipsa unor reactivi standard optimizați este însă iluzoriu să se vorbească de valori valabile pentru toate laboratoarele, întrucât mici modificări în tehnica de lucru produc mari variații ale valorilor activității enzimaticе. Așa de exemplu; valorile normale ale lactatdehidrogenazei (LDH) determinate la 25°C oscilează între 120-240 U/L, în timp ce la 37°C aceste valori se situează între 260-500 U/L. De asemenea, activitatea colinesterazei serice determinate ca substrat de acetilcolină se situează la normali între 160-260  $\mu\text{mol/L/oră}$  (2666-4333 U/L) în timp ce prin utilizarea ca substrat a butiriltiocolinei valorile normale oscilează între 4500 și 11000 U/L. În cazul transaminazelor (aminotransferazelor) limita superioară a valorilor determinată la 37°C cu reactivi optimizați se studiază la 42 U/L pentru ASAT și pentru ALAT, în timp ce cu reactivii preparați în majoritatea laboratoarelor din țară aceste valori normale nu trebuie să depășească 16 U/L. Și mai mari sunt diferențele între valorile normale ale fosfatazei alcaline, care cu metoda clasică Bessey-Lowry nu depășesc 48 U/L, iar cu reactivi având tampon de trietanolamină se situează până la 300 U/L la adult și până la 600 U/L la copii.

Din motivele arătate mai sus este recomandabil ca, până la introducerea de reactivi optimizați în toate laboratoarele din țară, fiecare laborator clinic să-și stabilească valorile normale în condițiile de lucru și cu reactivii care îi sunt accesibili.

Din aceleași motive, pe parcursul acestui capitol ne vom feri de a exprima variațiile patologice sub formă de unități/litru ci doar ca multipli ai limitei superioare a normalului sau ca procente din media valorilor normale, iar în cazul când se prezintă U/L se va preciza metoda utilizată și valorile normale ale metodei.

### 10.1.2.3 Factori de care depinde viteza unei reacții enzimaticе

Principalii factori de care depinde viteza unei reacții enzimaticе sunt temperatura, valoarea de pH, concentrația substratului și a coenzimelor precum și de eventuala intervenție a unor activatori sau inhibitori.

Efecte dependente de pH se datorează modificărilor stării de ionizare a moleculei de protein-enzimă și implicit asupra capacității de fixare a substratului în centrul activ al enzimei. Fiecare enzimă are un pH optim la care reacția catalizată decurge cu viteză maximă.

Pentru majoritatea enzimelor acest pH este apropiat de cel fiziologic, situându-se între 6,9 și 7,7. Dacă însă reacția catalizată decurge cu eliberarea de compuși acizi (de exemplu hidroliza trigliceridelor sau a acilcolinei) se recomandă tamponarea ionilor de hidrogen și deci folosirea unui tampon alcalin între pH8 și pH9. De menționat că activitatea fenoloxidază a ceruloplasminei decurge în condiții optime la pH 5,5, iar cea a pepsinei la un pH mult mai acid, corespunzând sucului gastric în perioada de stimulare a secreției.

Efectul temperaturii se vedește prin accelerarea reacțiilor enzimatiche odată cu creșterea temperaturii. Peste o anumită limită, denumită temperatură critică și care variază de la enzimă la enzimă, componenta proteică a sistemului enzimatic se denaturează și activitatea enzimatică încetează.

Efectul concentrației substratului este ilustrat în Figurile 10.3. și 10.4. Se poate vedea că șansele de formare a complexelor enzimă-substrat sunt reduse dacă concentrațiile de substrat sunt joase și că formarea complexelor amintite crește progresiv odată cu creșterea concentrației substratului respectiv. Implicit are loc o accelerare a reacției enzimatiche care decurge conform ecuației Michaelis-Menten:

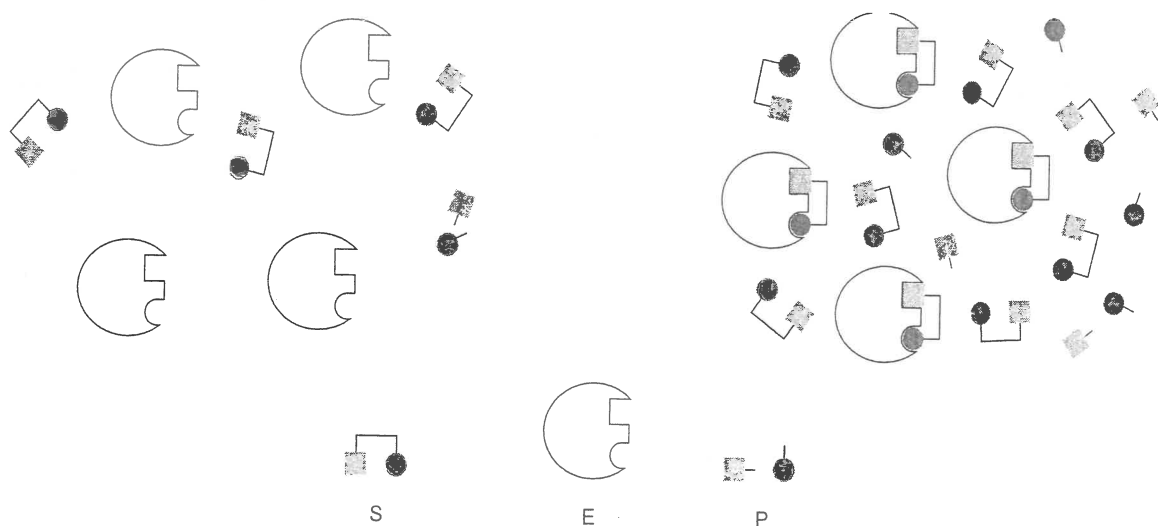
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

în care:  $v$  = viteza de reacție;

$V_{\max}$  = viteza maximă la care poate ajunge reacția;

$[S]$  = concentrația substratului;

$K_m$  = constanta Michaelis (Figura 10.4.)



**Figura 10.3** Reprezentare schematică a unor diferite raporturi între concentrația enzimei (E) și cea a substratului (S). A. La concentrații joase de substrat doar o parte a moleculelor de enzimă fixează substrat iar reacția enzimatică decurge neeconomic. B. La concentrații ridicate de substrat toate moleculele de enzimă sunt combinate cu substratul, reacția decurgând cu viteză maximală și rezultând cantități sporite de produși de reacție (P).

Pentru a transforma curba hiperbolică a relației dintre  $v$  și  $[S]$  într-o dreaptă s-a convenit ca acești parametri să fie exprimați prin valorile lor reciproce, adică  $1/v$  și  $1/[S]$  ajungându-se astfel la ecuația:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \text{ sau } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

care prin simplificare devine:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Avându-se în vedere că doar  $v$  și  $[S]$  sunt variabile, în timp ce  $K_m$  și  $V_{\max}$  sunt constante pentru o anumită pereche enzimă-substrat, ecuația de mai sus este de tipul  $Y = ax + b$  care dă o reprezentare grafică lineară, așa-zisa reprezentare dublu reciprocă imaginată de Lineweaver și Burk (Figura.10.5).

Pe baza acestei relații și efectuându-se doar 4-5 determinări ale activității enzimatice, la concentrații diferite de substrat, se poate calcula constanta Michaelis ( $K_m$ ), adică acea concentrație de substrat la care viteza reacției enzimatice decurge cu jumătate din viteza maximă ( $V_{\max}/2$ ). Pentru prepararea reactivilor utilizați la determinarea activităților enzimatice se recomandă o concentrație de substrat de cel puțin zece ori mai ridicată decât  $K_m$ . De notat că o valoare crescută a  $K_m$  indică o afinitate redusă a enzimei față de substrat sau prezența unui inhibitor competitiv (Figura 10.6).

**Rolul coenzimelor** devine evident în cazul unor enzime care își exercită efectul lor catalitic doar în prezența unor anumite molecule organice neproteice (termostabile și dializabile).

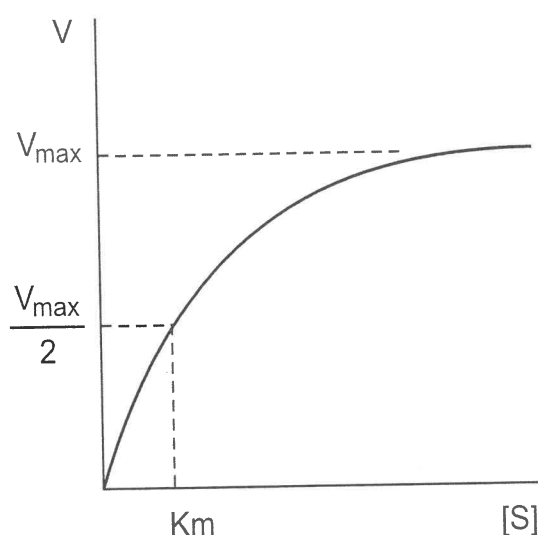


Figura 10.4 Relația dintre concentrația substratului ( $S$ ) pe abscisă și viteza reacției enzimatice ( $V$ ) pe ordonată. Concentrația substratului la care viteza de reacție este egală cu  $V_{\max}/2$  corespunde constantei Michaelis-Menten ( $K_m$ ) pentru enzima respectivă.

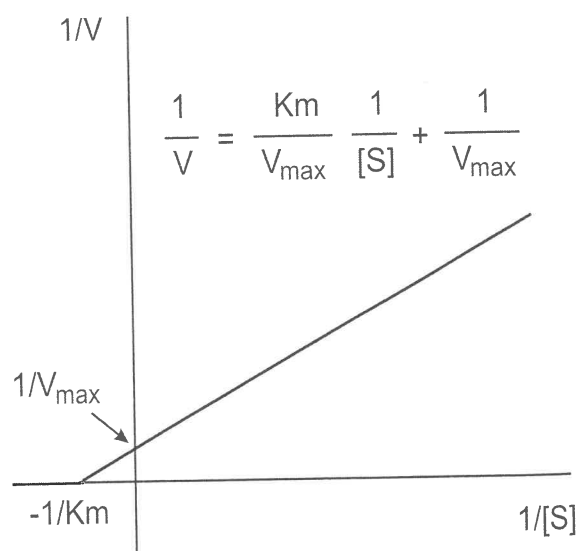
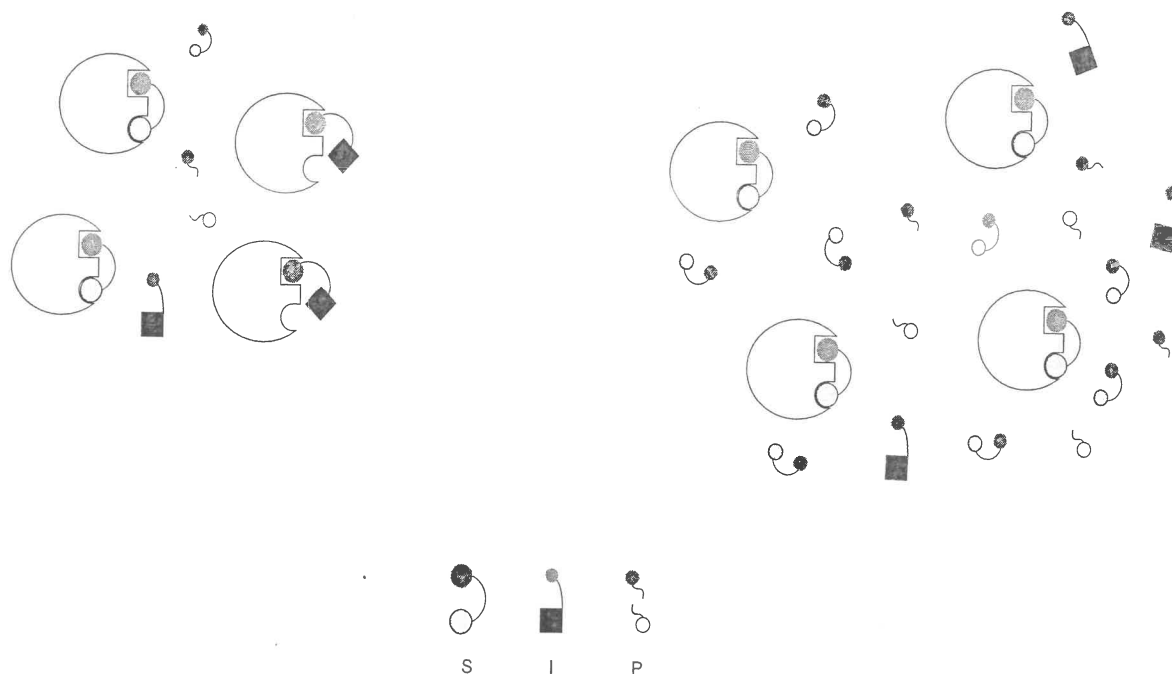


Figura 10.5 Reprezentarea Lineweaver-Burk a relației dintre  $1/[S]$  și  $1/V$ . Intersecția dreptei cu ordonata indică  $1/V_{\max}$ , iar intersecția cu abscisa reprezintă valoarea  $-1/K_m$ .



**Figura 10.6** Competiția dintre substrat (S) și inhibitorul competitiv (I) pentru centrul activ al enzimei (E). A. În cazul unei concentrații reduse de substrat, șansele inhibitorului (cu structură oarecum similară substratului) de a ocupa centrul activ al enzimei sunt mult facilitate. B. Șansele inhibitorului competitiv se reduc mult prin creșterea concentrației substratului astfel încât reacția enzimatică nu mai este frânată rezultând cantități importante de produși de reacție (P).

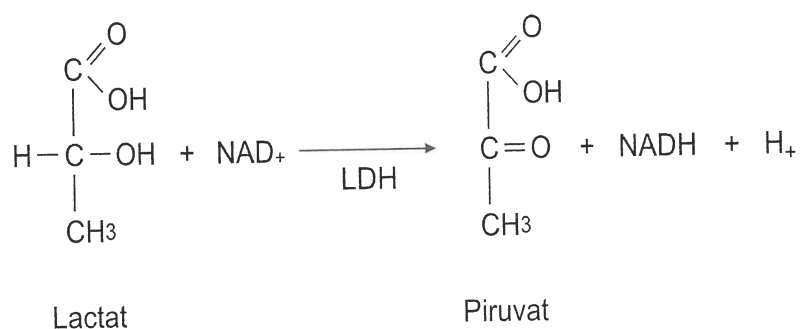
Aceste molecule denumite coenzime sunt necesare pentru activitatea oxido-reductazelor, transferazelor, izomerazelor și ligazelor (clasele 1, 2, 5, 6) în timp ce hidrolazele și liazele (clasele 3 și 4) nu necesită coenzime.

Coenzimele având, de cele mai multe ori, în compoziția lor vitamine din grupul B pot fi împărțite în două mari grupe:

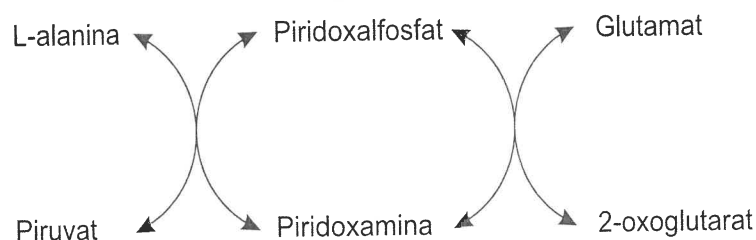
**1. Coenzime implicate în procesele de oxidoreducere** (transfer de  $H^+$ ), grupă în care se includ nicotin-adenin-dinucleotidul ( $NAD^+$ ) și o formă fosforilată a acestuia ( $NADP^+$ ) conținând în structura lor vitamina PP, flavin-mononucleotidul (FMN) și flavin-adenin-dinucleotidul (FAD), ambele conținând în structura lor riboflavină (vit. B2). Tot în această grupă se includ acidul lipoic (acid 6-8 di-tio-octanoic) care prin grupările SH poate deveni donator sau acceptor de protoni, precum și coenzima Q, o chinonă care intervine în procesele de fosforilare oxidativă.

**2. Coenzime implicate în transferul altor grupe decât  $H^+$** , această grupă incluzând coenzime cu rol în transferul de grupări fosfat (de ex. ATP), vitamina B1 cu rol în reacția de decarboxilare a acidului piruvic și vitamina B6 (piridoxalfosfat) cu rol în reacțiile de transfer a grupărilor amino (aminotransferaze). Tot în această grupă se includ coenzima A conținând în structura ei acidul pantotenic și intervenind în transferul de radicali acetil, precum și acidul folic și vitamina B12 cu rol în transferul de grupări cu un atom de carbon cum ar fi grupul formil ( $-CHO$ ), formiat ( $HCOOH$ ) sau hidroximetil ( $-CH_2OH$ ).

Pentru înțelegerea mecanismului de acțiune al coenzimelor este important de reamintit că aceste substanțe pot fi considerate ca un al doilea substrat, respectiv co-substrat, suferind modificări concomitente cu substratul. Așa de exemplu, în reacțiile de oxidoreducere o moleculă de substrat se oxidează (se dehidrogenează), în timp ce o moleculă de coenzimă se reduce (se hidrogenează):



Pe de altă parte, în reacțiile de aminotransferare, piridoxalfosfatul (vitamina B6) acționează ca un transportor intermediar de grupări amino între doi aminoacizi:



**Rolul unor metale** în desfășurarea reacțiilor enzimatică se evidențiază pe mai multe planuri. Așa de exemplu Fe, Cu și Mo participă în reacțiile de oxidoreducere, ionii de  $\text{Mg}^{2+}$  sunt necesari în reacțiile care asigură transferul grupării fosfat, ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  sunt necesari în procesele de activare a factorilor coagulării și în anumite procese de fosforilare, iar o serie de peptidaze sunt activate de  $\text{Mn}^{2+}$  sau  $\text{Ca}^{2+}$ .

S-au sugerat diferite mecanisme prin care metalele ar putea influența reacțiile enzimatică.

- Participarea directă a ionilor de metal în cataliza prin schimbări de valență în cursul reacției de oxidoreducere și a transportului de electroni (de ex. Fe în citocromi).
- Formarea de complexe cu substratul (de ex. complexe ale ATP cu ionii de magneziu în reacția de fosfotransferare).
- Formarea de complexe enzimă-metal-substrat (de ex., ionii de calciu) asigură formarea unui complex între fosfolipide, factorul Xa (enzima activatoare) și protrombina (zimogenul activabil), care în cazul de față joacă rol de substrat.
- Inducerea unor modificări conformaționale care duc la activarea enzimei sau îi mențin o structură activă (de ex. ionii de Zn în alcooldehidrogenaza hepatică).

Se pare deci că efectele carenței de oligoelemente, asupra cărora se insistă în literatura de specialitate din ultimii ani, se exercită tocmai prin anomalii în modularea reacțiilor enzimatică.

Metalele pot exercita însă și efecte negative asupra enzimelor. Așa de exemplu, grupările SH din centrul activ al transglutaminazei (factorul XIII al coagulării) pot fi blocate de către metale grele, cum ar fi Hg, ducând la inactivarea consecutivă a enzimei.

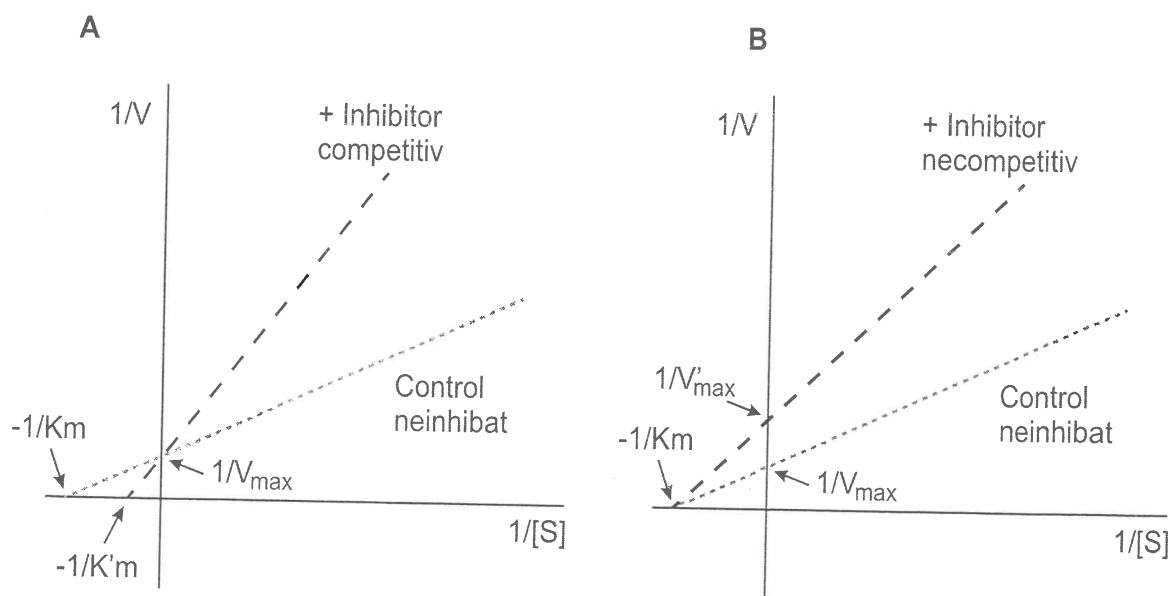
**Efectul inhibitorilor de enzime** constituie o problemă de o deosebită importanță pentru reglarea funcțiilor organismului și pentru înțelegerea mecanismului de acțiune al unor medicamente.

Din punct de vedere al mecanismului de acțiune toți inhibitorii (fiziologici și nefiziologici) pot fi împărțiți în două mari grupe: inhibitori competitivi și inhibitori necompetitivi.

O altă modalitate de clasificare a inhibitorilor de enzime se bazează pe locul de acțiune, distingându-se inhibitori care acționează asupra centrului activ al enzimei și inhibitori alos-terici, care afectează reacția enzimatică acționând într-o altă zonă a moleculei de enzimă.

**Inhibitorii competitivi** sunt substanțe cu structură chimică asemănătoare substratului (analogi chimici ai substratului) și concurează cu acesta pentru ocuparea centrului activ al enzimei (zona catalitică). Ca urmare a competiției între substrat și inhibitorul competitiv se formează complexe enzimă-inhibitor competitiv (EI) în dauna formării de complexe enzimă-substrat (ES), ceea ce duce la scăderea activității enzimatice. Crescându-se însă mult concentrația substratului (S) și menținându-se constant nivelul inhibitorului (I) se amplifică șansele formării complexelor ES, iar efectul inhibitorului scade (vezi Figura 10.6).

Așa cum se poate vedea din Figura 10.7 prezența unui inhibitor competitiv se exprimă din punct de vedere cantitativ prin creșterea valorii  $K_m$ , ceea ce înseamnă că pentru atingerea jumătății din viteza maximală ( $V_{max}/2$ ) a reacției enzimatică este nevoie de mai mult substrat decât în lipsa inhibitorului competitiv.



**Figura 10.7** Reprezentarea dublu reciprocă a relației dintre concentrația substratului și viteza unei reacții enzimatică în absența și în prezența unor inhibitori. A. Inhibitorul competitiv nu modifică viteza maximă de reacție, dar  $1/K_m$  are o valoare mai mică (respectiv  $K_m$  are o valoare mai mare) în prezența unui astfel de inhibitor. B. Inhibitorul necompetitiv nu modifică valoarea  $K_m$  dar reduce viteza maximală  $1/V'_{max} < 1/V_{max}$  (respectiv  $V'_{max} < V_{max}$ ). Cu alte cuvinte creșterea concentrației substratului nu diminuează efectele unui inhibitor necompetitiv.

Există numeroase exemple de inhibitori competitivi. Astfel, sulfamidele sunt analogi chimici ai acidului p-aminobenzoic (Figura 10.8) și inhibă sistemele enzimatice ale microbilor care utilizează p-aminobenzoat pentru formarea de acid folic. De asemenea, anticoagulantele orale de tip cumarinic au o structură analoagă vitaminei K și astfel inhibă sistemele enzimatice dependente de vitamina K (carboxilaza) și implicit reduc formarea de grupări gama-carboxilglutamice din factorii II, VII, IX și X ai coagulării. De notat că în lipsa grupărilor gama-carboxilglutamice fixatoare de calciu, factorii coagulării mai sus amintiți nu sunt activabili.

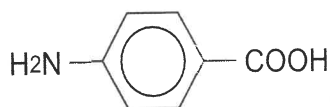
Așa cum s-a arătat în Capitolul 16, scăderea sintezei de colesterol în urma tratamentului cu inhibitori ai HMG-CoA reductazei se explică prin aceea că astfel de inhibitori (Lovastatin, Simvastatin) au o structură similară cu HMG-CoA, substratul HMG-CoA reductazei (enzima cheie pe calea sintezei de colesterol).

Lista inhibitorilor competitivi este destul de lungă și include preparate cu efect antitumoral și antiviral care interferează cu sinteza bazelor purinice și implicit a acizilor nucleici.

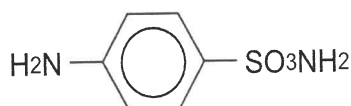
**Inhibitorii necompetitivi** nu au o structură similară substratului, iar efectul lor nu diminuează prin creșterea concentrației substratului. Ca urmare, valoarea  $K_m$  nu este influențată, în timp ce viteza maximală ( $V_{max}$ ) este mult diminuată (Figura 10.7). Se cunosc inhibitori necompetitivi reversibili care se pot desprinde de pe enzimă și inhibitori necompetitivi ireversibili care constituie adevărate "otrăvuri ale enzimelor". Între aceștia din urmă se numără iodoacetamida, săruri ale metalelor grele ( $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ) și o serie de agenți oxidanți. De notat că aspirina este un inhibitor necompetitiv ireversibil al ciclooxygenazei din plăcuțele sanguine.

**Inhibitorii alosterici** afectează reacțiile enzimatice fixându-se într-o altă zonă a enzimei, diferită de centrul activ. Ca urmare a fixării inhibitorului în așa-zisa zonă alosterică (*alos* = alt; *stereos* = spațiu) se produc modificări conformaționale ale enzimei care îi reduc afinitatea față de substrat (Figura 10.9) și implicit încetinesc reacția enzimatică.

Întrucât diverși modificatori ai reacțiilor enzimatice acționând pe zona alosterică pot duce nu doar la inhibarea enzimei dar și la activarea acesteia, crescându-i afinitatea față de substrat, este mai corect să se utilizeze termenul de efectori alosterici. Așa de exemplu citratul, rezultat din ciclul acizilor tricarboxilici inhibă alosteric fosfofructokinaza, limitând procesul de glicoliză dar totodată activează prin același mecanism alosteric acetil-CoA carboxilaza stimulând biosinteza de acizi grași.

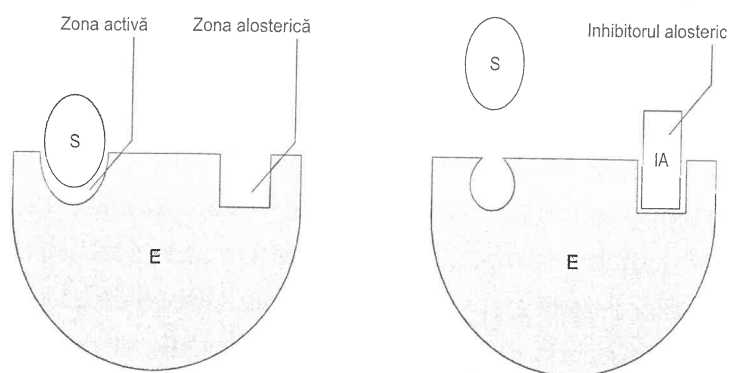


Acid p-aminobenzoic



Sulfamidă

**Figura 10.8** Analogia între structura chimică a acidului paraaminobenzoic și cea a unei sulfamide



**Figura 10.9 Reprezentare schematică a inhibiției alosterice.** Pătrunderea inhibitorului alosteric (IA) în zona alosterică produce modificări conformaționale ale enzimei reducându-i afinitatea față de substratul S.

**Importanța pentru medicină** a inhibitorilor de enzime prezintă aspecte multiple. Pe lângă exemplele arătate mai sus cu implicații farmacologice, este de subliniat rolul inhibitorilor de proteaze (antitrombina,  $\alpha$ 2-antiplasmina) care previn o activare intravasculară a coagulării sau o activitate fibrinolică scăpată de sub control. Asupra inhibitorilor plasmatici ai proteazelor s-a insistat în Capitolul 6.

Inhibitori ai proteazelor se găsesc și în parazitul intestinal *Ascaris* care astfel rezistă la acțiunea proteolitică a sucurilor digestive. Fasolea, soia și albușul de ou crud conțin, de asemenea, inhibitori de proteaze, ceea ce le diminuează digestibilitatea.

Administrare pe cale parenterală a enzimelor provenite de la o specie diferită duce la apariția de anticorpi, fenomen care limitează utilizarea L-asparaginazei în terapia leucemiilor sau a streptokinazei ca activator al sistemului fibrinolitic.

S-a descris și posibilitatea formării de **autoanticorpi față de unele enzime**. De exemplu modificări suferite de factorul XIII la pacienți tratați cu izoniazidă pot duce la apariția de anticorpi față de această transglutaminază, iar în cursul lupusului eritematos diseminat pot apare anticorpi față de complexe alcătuite din fosfolipide și factori ai coagulării cu activitate proteazică.

Anticorpilor dirijați față de citoplasma neutrofilelor (ANCA) reacționează de fapt cu anumite structuri din neutrofil care sunt dotate cu activități enzimatică cum sunt mieloperoxidaza, fosfataza alcalină leucocitară și elastaza. Relațiile între anomaliile mecanismelor imune și dereglarea sistemelor enzimatică sunt abia schițate la ora actuală dar se întrevade o participare a unor astfel de perturbări enzimatică mediate imun în patogeniza unor miopatii și cardiomiopatii.

## 10.2 ACTIVITATEA ENZIMATICĂ ÎN CELULELE VII

Activitatea enzimatică din celule prezintă o serie de particularități care diferă de activitatea enzimatică "in vitro". Astfel, starea de echilibru a unei reacții enzimatică urmărită "in vitro" și

reprezentată prin formula  $E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow E + P$  nu se poate aplica "in vivo", întrucât produsul de reacție P este mereu îndepărtat din jurul enzimei care poate astfel capta noi molecule de substrat (S). De multe ori produsul unei reacții enzimatică (P) devine substrat într-o altă reacție enzimatică și așa mai departe, datorită unei anumite orientări spațiale a enzimelor care asigură un proces metabolic cu mai multe secvențe. Pentru ilustrare este suficient de reamintit secvențele enzimatică ale sintezei de uree, etapele enzimatică ale glicolizei continuate cu ciclul acizilor tricarboxilici, complexe multienzimatică care intervin în sinteza și degradarea acizilor grași și etapele enzimatică ale sintezei de colesterol.

Este de asemenea important de precizat că reacțiile enzimatică din celulele vii pot fi modulate prin intervenția unor mecanisme de reglare dependente de hormoni sau sub acțiunea unor metaboliți celulari specifici, cu efecte locale (prostaglandinele, AMP-ciclic, derivați de fosfatidilinositol). Creșterea sau limitarea unei activități enzimatică intracelulare se poate realiza fie prin modificarea eficienței fiecărei molecule de enzimă, fie prin modificarea vitezei de sinteză sau de degradare a moleculei de enzimă cu implicații asupra numărului de enzime eficiente.

Pe baza acestor considerente este necesară o scurtă trecere în revistă a datelor din literatură privind distribuția intracelulară a enzimelor și a achizițiilor recente privind mecanismele de reglare a activităților enzimatică în organism.

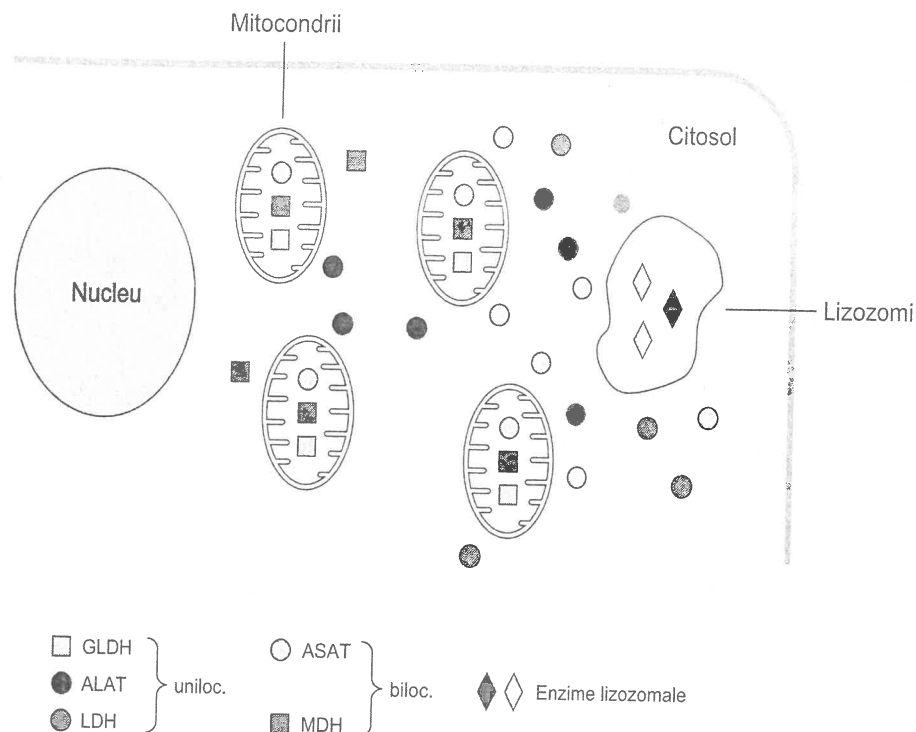
### 10.2.1 DISTRIBUȚIA INTRACELULARĂ A ENZIMELOR

Cunoașterea localizării enzimelor la nivelul diferitelor organite celulare este necesară nu numai pentru o mai bună înțelegere a modului în care sunt dirijate procesele metabolice dar și pentru interpretarea unor rezultate furnizate de laboratorul clinic. De fapt, creșterea în ser a unor enzime provenite din mitocondrii sugerează că leziunea celulară este mai severă decât în cazul în care creșterea se limitează la enzime citoplasmatică ieșite din celulă datorită creșterii permeabilității celulare. S-a putut demonstra că enzimele care intervin în glicoliză sunt localizate în citoplasmă, pe când enzimele cu rol în ciclul acizilor tricarboxilici, enzimele lanțului respirator și cele implicate în fosforilarea oxidativă se află la nivelul mitocondriilor. Tot în mitocondrii se găsește și glutamatdehidrogenaza (GLDH).

Pentru practica medicală este important de precizat că alanin-aminotransferaza (ALAT) se găsește doar în citoplasmă (enzimă uniloculară) pe când asparat-aminotransferaza (ASAT) și malat-dehidrogenaza (MDH) se află atât în citoplasmă cât și în mitocondrii. Tehnici imunochimice au putut chiar diferenția între ASAT citoplasmatic (cASAT) și enzima mitocondrială (mASAT) creșterea în ser a acesteia din urmă indicând o leziune mai severă a celulelor.

La nivelul lizozomilor se găsesc enzime cu rol în degradarea lipidelor, proteinelor și acizilor nucleici (colesteril-ester-hidrolază acidă, dezoxiribonuclează, fosfatază acidă, proteaze, collagenaze, beta-glicuronidază etc) (Figura 10.10).

Pentru interpretarea modificărilor survenite în privința activității serice a enzimelor, este important de precizat că echipamentul enzimatic al celulelor diferă de la organ la organ. Așa de exemplu ASAT se află mai ales în miocard și ficat precum și în cantități cu ceva mai reduse



**Figura 10.10** Reprezentarea schematică a localizărilor intracelulare ale enzimelor

În fibra musculară striată, în timp ce ALAT se găsește mai ales în ficat. Creatinkinaza (CK) provine din musculatura scheletică și din miocard, iar LDH poate proveni din ficat, miocard și musculatura scheletică. În aceeași ordine de idei trebuie arătat că amilaza serică poate avea ca sursă atât pancreasul cât și glandele salivare, iar fosfataza alcalină crește în ser atât în unele boli osoase cât și în afecțiuni hepatice. Proveniența unei activități enzimatică în ser poate fi însă precizată prin analizarea componenței izoenzimelor.

### 10.2.2 VARIANTE ALE ENZIMELOR. IZOENZIME

Izoenzimele sunt forme moleculare, distincte din punct de vedere fizic, cu aceeași activitate catalitică. Pe baza acestor proprietăți fizice diferite, izoenzimele pot fi diferențiate și eventual separate. Astfel de proprietăți sunt încărcarea electrică și implicit migrarea electroforetică, comportarea diferită la separări cromatografice și susceptibilitatea diferită la diverse procedee de inactivare (căldură, agenți chimici). În măsura în care izoenzimele diferă antigenic, separarea lor se poate obține prin metode imunologice.

Cel mai clasic exemplu de diferențiere a izoenzimelor se referă la lactatdehidrogenaza (LDH) din ser care la electroforeză se separă în cinci fracțiuni ( $LDH_1$ ,  $LDH_2$ ,  $LDH_3$ ,  $LDH_4$  și  $LDH_5$ ). Fracțiunile de migrare rapidă ( $LDH_1$ ,  $LDH_2$ ) sunt de proveniență miocardică și din elementele seriei roșii, iar fracțiunile lente ( $LDH_4$ ,  $LDH_5$ ) provin mai ales din ficat și din musculatura scheletică. Se știe că izoenzimele LDH rezultă din combinarea, sub formă de tetramer, a două subunități, și anume subunitatea H de origine miocardică (*heart*) și subunitatea M de origine musculară și hepatică. Cele cinci izoenzime LDH ar avea următoarea alcătuire:  $LDH_1$  (4H),  $LDH_2$  (3H + 1M),  $LDH_3$  (2H + 2M),  $LDH_4$  (1H + 3M) și  $LDH_5$  (4M). De notat că spre deosebire de cele-

alte izoenzime LDH, fracțiunea LDH1 prezintă o afinitate particulară pentru  $\alpha$ -oxobutirat fiind uneori prezentată în literatură sub denumirea de  $\alpha$ -hidroxibutirat dehidrogenază ( $\alpha$ HBDH).

Un alt exemplu de diferențiere în izoenzime cu importanță pentru diagnosticul de laborator este în cazul creatininei (CK sau CPK). Această enzimă este alcătuită din două subunități și anume B din creier (*brain*) și M din musculatură. Izoenzima CK-BB se află în creier, izoenzima CK-MM se găsește în musculatura striată și în miocard, iar izoenzima CK-MB provine doar din miocard fiind specifică acestui țesut și având deci o valoare deosebită în diagnosticul infarctului miocardic.

S-a reușit separarea de izoenzime și în cazul fosfatazei alcaline,  $\alpha$ -amilazei, fosfatazei acide, colinesterazei serice etc.

### 10.2.3 REGLAREA ACTIVITĂȚILOR ENZIMATICE

Se cunosc până în prezent trei mecanisme principale prin care activitatea enzimelor din organism poate fi modulată în funcție de necesități: un prim mecanism este cel alosteric menționat anterior, un al doilea mecanism general constă din posibilitatea trecerii din formă inactivă de zimogen în enzimă activă; cel de al treilea mecanism depinde de capacitatea celulelor de a regla numărul de molecule dotate cu proprietăți enzimatice, fie prin modificarea vitezei de sinteză a enzimelor, fie prin modificări ale gradului de inactivare sau degradare a acestora. La aceste mecanisme cu caracter general se mai poate adăuga posibilitatea de reglare a concentrației inhibitorilor proteazelor plasmatice implicate în coagulare și fibrinoliză, precum și de inhibare a elastazei provenite din leucocite .

#### 10.2.3.1 Efectorii alosterici

Acești reglatori sunt, de regulă, produși de metabolism care sunt în măsură să modifice afinitatea enzimelor față de substratele lor (vezi Figura 10.9). De multe ori efectorii alosterici intervin pe mai multe căi metabolice, fie inhibând, fie activând sistemele enzimatice. Așa de exemplu, în cazul unei utilizări sporite a hidraților de carbon pe calea glicolizei se formează un exces de citrat. Acest metabolit acționează printr-un mecanism de feed-back negativ, inhibând fosfofructokinaza și limitând glicoliza, astfel încât derivații glucozei sunt dirijați spre alte căi metabolice, ca de exemplu stocarea sub formă de glicogen. Totodată însă, citratul activează, prin același mecanism alosteric, acetil CoA carboxilaza, o enzimă cheie pe calea sintezei extramitocondriale de acizi grași. Ca urmare, fragmentele de acetil-CoA, în loc să pătrundă în ciclul acizilor tricarboxilici, iau calea sintezei de lipide. Efectul net al citratului, ca efector alosteric, este deci acela de a opri glicoliza și de a devia procesele metabolice spre stocarea de energie sub formă de glicogen și de lipide.

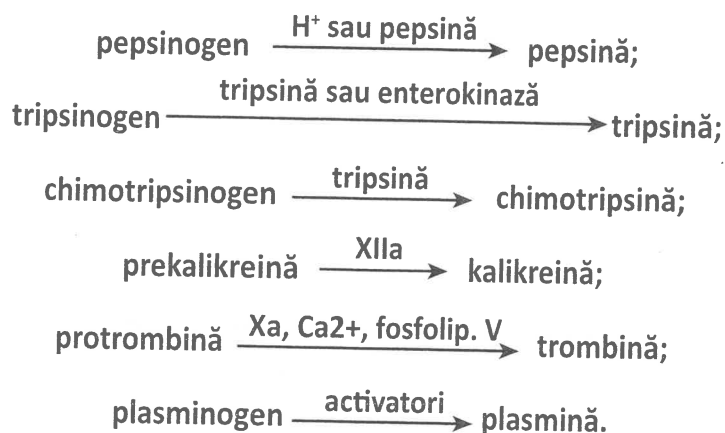
Un alt exemplu relevant este dat de o stare caracterizată printr-o carență de hidrați de carbon, urmată de o utilizare sporită a grăsimilor și de producerea unui exces de acetil-CoA. Acest metabolit devine un activator alosteric al piruvatcarboxilazei, o enzimă cheie pe calea gluconeogenezei având drept efect producerea de glucoză necesară sistemului nervos și compensând parțial carența alimentară de glucide.

### 10.2.3.2 Formarea de enzime active din precursori inactivi

Principalele mecanisme care asigură formarea de enzime active din precursori inactivi sunt reprezentate de proteoliza limitată și de procesele de fosforilare sau defosforilare.

**Proteoliza limitată** intervine în cazul anumitor enzime proteolitice cu rol în digestie sau implicate în hemostază. Astfel de enzime sunt produse și secretate sub formă de precursori inactivi (proenzime sau zimogeni) și poartă denumiri alcătuite din atașarea prefixelor *pre* sau *pro*, sau respectiv a sufixului *ogen*, la numele enzimei. Conversia zimogenilor în enzime active este catalizată de enzime proteolitice care prin clivarea unui fragment peptidic duc la "demascarea" centrului activ al enzimei. Este evident că prin îndepărtarea peptidelor clivate greutatea moleculară (GM) a enzimei este mai redusă decât a zimogenului precursor (Figura 10.11). Așa de exemplu pepsinogenul are o GM de 42 kDa în timp ce pepsina are abia 35,4 kDa, iar plasminogenul cu GM de 92 kDa trece sub acțiunea activatorilor săi în plasmină cu o greutate moleculară de 83 kDa.

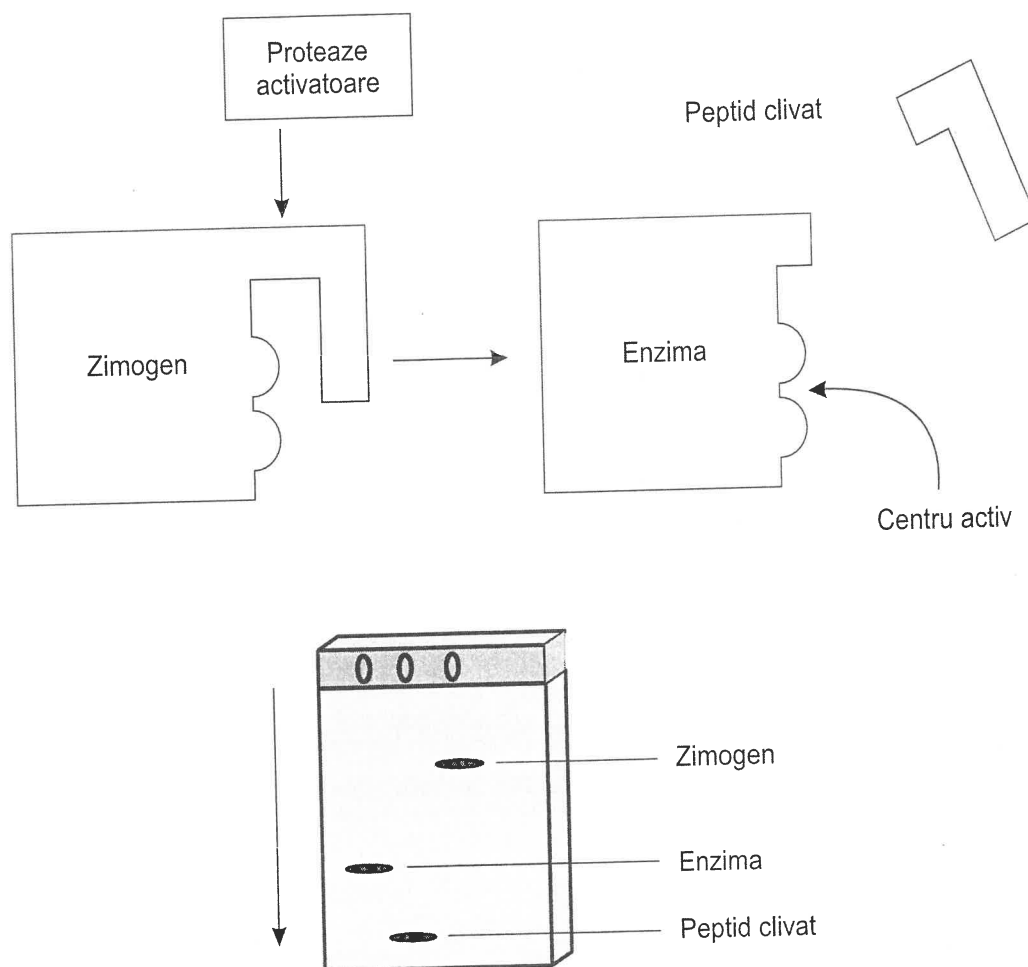
Redăm mai jos câteva exemple de activare prin proteoliză limitată:



Așa cum se poate vedea din exemplele de mai sus activarea unor zimogeni și în special a pepsinogenului și a tripsinogenului poate fi catalizată de către însăși forma activă a enzimei, iar un astfel de proces, denumit autocatalitic, decurge cu o viteză crescândă, pe măsură ce tot mai multe molecule de zimogen devin enzime cu capacitatea de a activa.

**Fosforilarea precursorilor inactivi** intervine în numeroase reacții enzimatice. Un exemplu clasic este acela al fosforilazei, enzima care inițiază procesul de glicogenoliză. Așa cum se vede din Figura 10.12 sub acțiunea unei fosforilazokinaze, o enzimă din grupa proteinkinazelor, forma inactivă de fosforilază b trece în formă fosforilată activă, denumită fosforilaza a (fosfofosforilaza).

De menționat că proteinkinazele acționează prin transferul de grupări fosfat pe diverse proteine (de regulă pe radicali serină, treonină sau tirozină ai acestor proteine) și că activitatea acestor enzime poate fi modulată de AMP ciclic, de complexul  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulină, de prostaglandine precum și de produșii rezultați din scindarea fosfatidil-inozitolilor din membranele celulare, de către fosfolipaza C. Modificările funcționale, declanșate sub acțiunea proteinkinazelor sunt tranzitorii, datorită defosforilării proteinelor sub acțiunea unor fosfoproteinfosfataze (Figura 10.12).



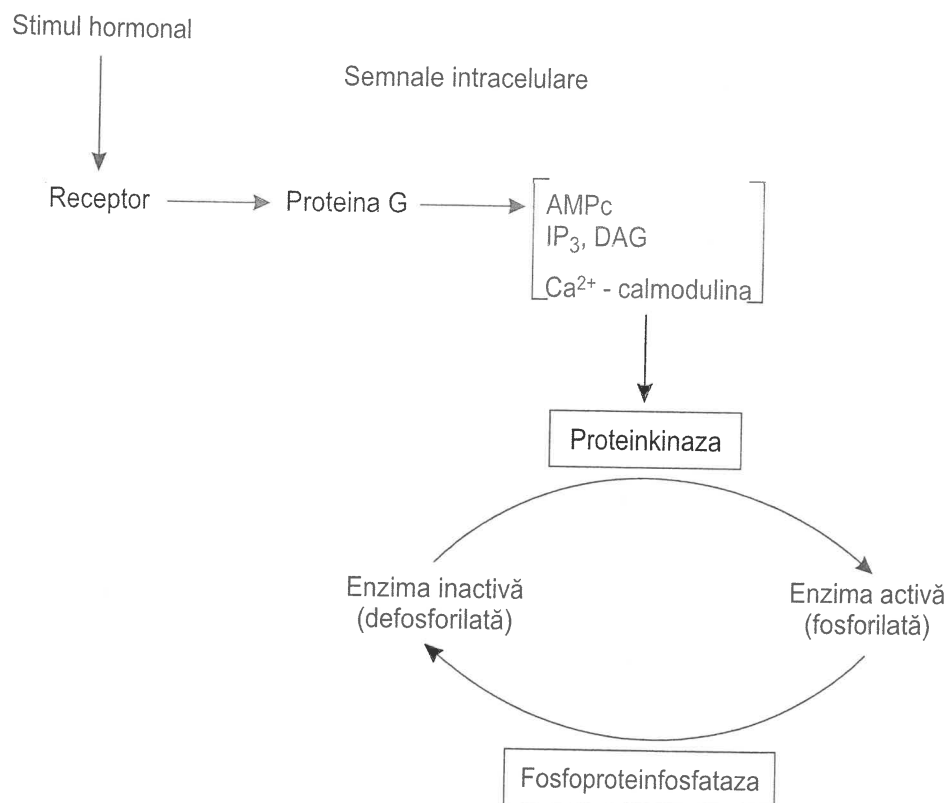
**Figura 10.11 Activarea zimogenilor prin proteoliză limitată.** A. Sub acțiunea unei proteaze activatoare are loc clivarea unui peptid din molecula de zimogen, "demascându-se" astfel centrul activ al enzimei și respectiv transformarea zimogenului în enzimă. B. Electroforeza în gel de poli-acrilamidă conținând dodecilsulfat de sodiu, permite separarea moleculelor proteice și peptidice în funcție de greutatea lor moleculară. Se poate astfel demonstra desprinderea peptidului de clivare și reducerea greutății moleculare a enzimei față de cea a zimogenului din care provine.

De notat însă că anumite enzime, ca de exemplu glicogensintetaza se inactivează prin fosforilare. Așa se face că în urma stimulării hepatocitelor cu glucagon, și a eliberării mesajului intracelular, reprezentat de AMPc, are loc activarea unei proteinkinaze care fosforilează atât fosforilaza b, trecându-o spre forma activă de fosforilază a, cât și glicogensintetaza care devine inactivă. Rezultanta finală a acestor procese este o creștere marcată a eliberării de glucoză din depozitele de glicogen.

Se știe astăzi că între stimulul hormonal și procesele enzimatice mai sus amintite se interpun receptori celulari pentru hormoni precum și așa-zisele proteine G. Descrierea detaliată a transmiterii stimulilor la efectori se va face în Capitolul 18.

### 10.2.3.3 Reglarea sintezei de enzime

Reglarea unei anumite reacții enzimatice se poate realiza și prin modificarea numărului de molecule dotate cu proprietatea catalitică respectivă. Această reglare se află sub controlul



**Figura 10.12 Activarea enzimelor prin fosforilarea precursorilor inactivi**

aparaturii genetice al celulei și se efectuează prin procesele de inducere, represie și derepresie.

**Inducerea de enzime** constă dintr-o creștere adaptativă a numărului de molecule ale unei anumite enzime, fie ca urmare a unei accelerări a vitezei de sinteză, fie prin reducerea vitezei de degradare. Procesul este declanșat de prezența în mediu a unei substanțe denumită inductor și care, de multe ori, este chiar substratul enzimei. De exemplu, lactoza induce sinteza de betagalactozidază în anumite bacterii.

**Represia** constă din reducerea numărului de molecule de enzimă ca urmare a prezenței în mediu a unei substanțe specifice denumită corepresor, iar **derepresia** este termenul folosit pentru a indica creșterea moleculelor de enzimă ca urmare a scoaterii din mediu a corepresorului. Adeseori produșii reacției catalizate de o anumită enzimă acționează în calitate de corepresori, limitând sinteza respectivei enzime sau accelerând degradarea ei. De exemplu, sinteza de triptofansintetază de către *E.Coli* este reprimată de prezența în mediu a triptofanului, adică a produsului reacției catalizate de enzima amintită mai sus. Pe de altă parte, absența din mediu a triptofanului cu rol de corepresor duce la derepresia triptofansintetazei și respectiv la creșterea numărului de enzime dotate cu proprietatea de a produce triptofan.

Deși inducerea, represia și derepresia de enzime au fost inițial descrise la microorganisme, aceste mecanisme intervin și la animalele superioare, având un rol esențial în reglarea metabolismelor. S-a putut demonstra că un anumit inductor poate stimula sinteza mai multor enzime înrudite, respectiv implicate în același lanț metabolic și că nu numai diversele substraturi specifice dar și o serie de hormoni pot îndeplini funcția de inducitori. Așa de exemplu glucoza și insulina induc sinteza enzimelor implicate în utilizarea glucozei (glucokinaza, fos-

Acumularea de ARNm la nivelul ribozomilor duce ulterior la stimularea sintezei de protein-ezimă prin procesul de translație după modelul oferit de ARNm. Ca în orice sinteză de proteine, sinteza enzimei la nivelul ribozomal implică o inițiere a procesului, urmată de elongare progresivă și de terminare la nivelul adecvat a lanțului peptidic. Există dovezi că procesul de inducere poate fi influențat la nivel posttranscripțional fie în sensul unei stabilizări a ARNm, fie în sensul unei degradări sau inactivări a acestuia.

Mecanismele care pot interveni în modificările postranscripționale ale ARNm implică clivări, metilări, poliadenilări și fixări ale ARNm pe anumite proteine. În cazul proceselor de inducere mediate de hormoni, de exemplu cortizol, inițial este necesară o fixare a hormonului pe receptori specifici ai celulei țintă, urmată de internalizarea complexului receptor-hormon, care acționează la diverse nivele stimulând transcrierea, influențând fenomenele posttranscripționale și în anumite situații inactivând represorul. Complexitatea acestor mecanisme care implică mai multe etape, fiecare etapă supusă unui control specific, ar putea explica spectrul larg de acțiune al glucocorticoizilor care include atât efecte anabolice cât și catabolice în funcție de țesutul țintă. Așa de exemplu cortizolul stimulează sinteza de proteine în ficat, dar exercită un efect catabolic asupra țesutului limfoid, deși induce sinteza de amino-transferaze în ambele țesuturi.

#### 10.2.3.3.2 Implicații medicale ale inducerii de enzime microsomiale

Pe lângă efectele mai sus menționate privind rolul proceselor de inducere și derepresie în controlul metabolismelor, există suficiente dovezi că inducerea de enzime joacă un rol important în metabolizarea medicamentelor și în răspunsul organismului la diverse medicamente. Pe de altă parte, o serie de medicamente acționează ca inductori, iar efectele lor de sporire a activității anumitor sisteme enzimatică se repercutează nu numai asupra metabolizării respectivelor medicamente ci și asupra altor metabolisme.

Lista agenților inductori este lungă și în continuă proliferare. Ea include medicamente anticonvulsivante (fenobarbital, fenitoină), antifungice (griseofulvină), antibiotice (rifampicina), antiinflamatorii (aminopirina, fenilbutazona), anticoagulante (warfarina), agenți de adicție (alcool și marijuana), contraceptive orale (progesteron), pesticide (DDT), hidrocarburi policiclice (din fumul de țigară, din carnea de grătar).

Ficatul este principalul organ în care au loc procesele de inducere sub acțiunea agenților mai sus amintiți, dar astfel de mecanisme de inducere enzimatică au putut fi demonstrate în placentă, în intestin și în limfocite.

Literatura medicală insistă asupra **sistemului microsomal de hidroxilare a medicamentelor** cunoscut și sub denumirea de **sistem al oxidoreductazelor microsomale cu funcții mixte**. Reacțiile catalizate de aceste enzime includ hidroxilări ale unor structuri alifatică sau aromatică, demetilări, dehalogenări precum și glicuronoconjugări. Efectele esențiale ale acestor reacții constau în transformarea unor substanțe străine organismului (xenobiotice) din forma liposolubilă în forme hidrosolubile mai ușor de eliminat pe cale renală sau biliară. Ca urmare, sistemele enzimatică mai sus amintite necesită prezența de O<sub>2</sub>, din care un

atom este utilizat pentru hidroxilarea xenobioticului iar celălalt pentru generarea de  $H_2O$  împreună cu hidrogenul cedat de  $NADPH_2$  sau  $NADH_2$ . Totodată, la asigurarea fluxului de electroni necesari pentru reducerea atomului de oxigen contribuie citocromoxidoreductaza (EC 1.6.99.3) și un grup de citocromi, dintre care mai bine caracterizați sunt citocromii  $P_{450}$  și  $P448$  (denumiți astfel după lungimea de unde de 450 nm și respectiv 448 nm la care prezintă un maxim de absorbție).

Există o serie de implicații cu importanță pentru medicină a inducerii oxidoreductazelor microsomale cu funcții mixte.

1. În primul rând sporirea accentuată a capacității de hidroxilare, are drept urmare o metabolizare și implicit o eliminare mai rapidă atât a medicamentului care a indus sistemul enzimatic și a altor xenobiotice. Astfel subiecții tratați cronic cu fenobarbital metabolizează mai rapid anticoagulantele cumarinice, tolbutamida, aminopirina, fenilbutazona, clorpromazina, fenitonina și digitoxina.

2. Inducerea prin fenobarbital a bilirubinglicuronil-transferazei accelerează procesul de glicuronconjugare a bilirubinei și are efecte favorabile asupra hiperbilirubinemiilor indirecte (neonatale, boala Gilbert, sindrom Crigler-Najjar tip II). Totodată inducerea enzimelor care intervin în hidroxilarea acizilor biliari duce la creșterea solubilității în apă a acestora și implicit la creșterea fluxului biliar apos, cu repercusiuni favorabile asupra fenomenelor de colestază intrahepatică.

3. Pe de altă parte, inducerea cauzată de fenobarbital poate avea efecte nedorite cum sunt metabolizarea accelerată a vitaminei D și a metaboliților biologic activi ai acesteia, ceea ce favorizează dezvoltarea rahitismului și osteomalaciei sau accentuarea osteoporozei. Inducerea oxidoreductazelor accelerează și hidroxilarea hormonilor steroizi (androgeni, estrogeni, progestativi precum și a glucocorticoizilor) dar importanța acestor procese pentru eventuale disfuncții hormonale nu a fost încă dovedită.

4. Agravarea porfiriilor în urma consumului de barbiturice s-ar putea explica prin inducerea de către fenobarbital a citocromului  $P_{450}$  cu structură hemică. Se ajunge astfel la o dirijare sporită a moleculelor de hem spre formarea de citocrom  $P_{450}$  și la o scădere a rezervelor intracelulare de hem care acționează totodată, în calitate de corepresor al delta-aminolevulinic-sintetazei, la frânarea porfirogenezei. Cu alte cuvinte, inducerea prin fenobarbital a citocromului  $P_{450}$  duce la o derepresie a sintezei de porfirine și la fenomenele neurologice date de agravarea porfiriilor acute.

5. S-a arătat că o serie de hidrocarburi policiclice își sporesc efectul cancerigen prin hidroxilare, în timp ce hidrocarburile aromatice devin mai puțin carcinogene în urma hidroxilării. S-ar părea deci că inducerea sistemului microsomal hidroxilant poate fie accelera, fie încetini creșterea tumorală în funcție de carcinogenul implicat.

6. Consumul cronic de alcool are un efect inductor asupra oxidoreductazelor microsomale cu funcții mixte ceea ce duce nu numai la creșterea propriei sale metabolizări dar și la accelerarea metabolizării tolbutamidei, antivitaminelor K, barbituricelor și fenitoinei, ceea ce ar putea explica toleranța crescută a alcoolicii față de sedative. O singură doză mare

de alcool inhibă însă metabolizarea substanțelor amintite, ceea ce explică efectele toxice cumulative ale ingestiei unor doze masive de alcool împreună cu barbiturice. Consumul cronic de alcool duce la creșterea  $\gamma$ -glutamil-transferazei în ser iar sevrajul duce la scăderea activității serice a acestei enzime.

7. Adaptarea nou-născuților la viața extrauterină depinde în mare măsură de maturarea funcțiilor biochimice și fiziologice în cursul dezvoltării fetale și există dovezi că hormonii cum sunt glucocorticoizii și tiroxina contribuie la maturarea funcțiilor biochimice prin inducerea sintezei de enzime. Chiar și producerea de surfactant la nivelul alveolelor pulmonare și respectiv maturarea plămânilor implică inducerea enzimei colinofototransferază sub acțiunea glucocorticoizilor.

8. Capacitatea sistemelor enzimatică de a răspunde la agenți inductori scade la vârstnici, ceea ce ar putea explica reducerea posibilităților de adaptare a metabolismelor la solicitări sporite.

9. Se ridică și problema unei posibile intervenții a unor mecanisme de inducere enzimatică în cazul subiecților obezi și hipertrigliceridemici. De fapt, injectarea intraperitoneală repetată de fenobarbital la iepuri duce la creșterea trigliceridelor serice și hepatice, iar acest procedeu ca și alimentația bogată în fructoză induce sinteza de fosfatidat-fosfohidrolază, o enzimă cu rol în producerea trigliceridelor. Pe de altă parte, subiecții obezi și hipertrigliceridemici prezintă o accelerare a procesului de clearance al antipirinei ceea ce sugerează o amplificare a reticulului endoplasmatic și o activitate sporită a enzimelor microsomale cu rol în metabolizarea medicamentelor.

10. Detectarea unui proces de inducere a enzimelor microsomale cu mijloacele laboratorului clinic se bazează pe detectarea creșterilor urinare de 6- $\beta$ -hidroxicortisol și de acid D-glucaric, pe creșterea activității  $\gamma$ -glutamil-transferazei (o enzimă inductibilă) și pe accelerarea eliminării din organism a antipirinei administrate.

### 10.3 BAZELE FIZIOPATOLOGICE ALE DIAGNOSTICULUI ENZIMATIC

Așa cum s-a arătat mai sus, majoritatea reacțiilor enzimatică ca și reglarea acestor procese au loc la nivelul celulelor, iar laboratorul clinic încearcă să contribuie la diagnostic și la stabilirea prognosticului pe baza determinărilor de enzime în umori și mai ales în serul bolnavilor. Din acest motiv, este important de stabilit prin ce mecanisme se ajunge la modificarea activităților enzimatică în ser, respectiv în plasmă.

#### 10.3.1 PROVENIENȚA ENZIMELOR PLASMATICE

Din punct de vedere al mecanismului prin care enzimele ajung în plasmă, se pot distinge următoarele categorii:

**a. Enzime secretate activ în plasmă.** Astfel de enzime sunt secretate mai ales de ficat și acționează de regulă asupra unor substrate din plasmă îndeplinind la acest nivel un rol fiziologic. În această grupă se includ o serie de factori ai coagulării (protrombina, factorii VII, IX, X, XIII) lecitin-colesterol aciltransferaza (LCAT) cu rol în esterificarea colesterolului din

plasmă și colinesteraza. Insuficiența funcțională a celulelor care produc astfel de enzime se asociază cu scăderea activității plasmatice a enzimelor respective.

**b. Enzime ale secrețiilor exocrine.** Cea mai mare parte a unor astfel de enzime cum sunt amilaza pancreatică și salivară, lipaza pancreatică, pepsinogenul gastric și fosfataza acidă prostatică se varsă în canalele excretoare și doar o mică fracțiune scapă în limfă și de acolo în plasmă. Așa de exemplu, în condiții fiziologice, 98% din  $\alpha$ -amilaza produsă în acinii glandulari ai pancreasului ajunge în duoden. Ca urmare, activitatea acestei enzime este de 500-800 ori mai mare în duoden decât în ser. În caz de leziuni ale celulelor secretoare sau de obstrucții acute ale canalelor excretoare, partiția exo-endocrină amintită se alterează și un procent mai mare de enzime trece în limfă și de acolo în plasmă.

În principiu, atrofia organului producător de enzime ar trebui să ducă la o scădere a activității serice a enzimelor din această categorie, dar insuficiența funcțională a celulelor producătoare poate fi mai bine evaluată în produsul de secreție (respectiv în suc duodenal în cazul  $\alpha$ -amilazei pancreatice).

**c. Enzime celulare.** Astfel de enzime acționează exclusiv intracelular, iar creșterea lor în ser denotă o alterare a membranei celulare, permițându-se astfel "scurgerea" lor în lichidul interstițial, limfă și plasmă.

Principalele enzime celulare (enzime plasmatice de leziune) utilizate în scop de diagnostic sunt lactat-dehidrogenaza (LDH), alanin-aminotransferaza (ALAT) aspartat-amino-transferaza (ASAT) creatin-kinaza (CK, notată și CPK) și glutamat-dehidrogenaza (GLDH).

Natura enzimei celulare, a cărei activitate crește în ser, precum și gradul unei astfel de creșteri depind de:

1. Echipamentul enzimatic al organului lezat. Această noțiune nu trebuie însă absolutizată. Astfel, rinichiul este organul cel mai bogat în GGT, dar în majoritatea cazurilor leziunile renale nu duc la creșteri ale acestei enzime în ser deoarece enzima scursă din tubii renali trece în urină. În schimb ficatul, cu un conținut mai redus de GGT este principala sursă a creșterilor de enzimă în ser.
2. Localizarea intracelulară a enzimelor și permeabilitatea membranelor celulare și mitocondriale (Figura 10.10).
3. Gradul de vascularizație a organului lezat și viteza de circulație la nivelul zonelor lezate, de care depinde "spălarea" enzimelor ieșite din celule în lichidul interstițial și trecerea lor în plasmă.
4. Prezența sau absența unei bariere inflamatorii.
5. Solubilitatea enzimei în lichidul extracelular și măsura în care celulele lezate vin în contact direct cu plasma. Astfel, datorită contactului intim al hepatocitelor cu sângele circulant, leziunile hepatice permit o deversare rapidă a enzimelor celulare în plasmă. În cazul altor organe, trecerea din celule în sânge decurge mai lent prin intermediul lichidului interstițial și al limfei.
6. Viteza de degradare și de eliminare a enzimei celulare ajunsă în plasmă.
7. Numărul de celule lezate și gradul de afectare al fiecărei celule precum și viteza cu care s-au produs leziunile.

Pe lângă cele trei categorii de mecanisme care duc la modificări ale activității enzimelor serice, sunt de menționat enzimele indicatoare ale colestazei și cele care reflectă un proces de inducere.

### 10.3.2 ELIMINAREA DIN PLASMĂ A ENZIMELOR

Se recunosc mai multe mecanisme prin care se ajunge la scăderea activității enzimelor ajunse în plasmă.

În cazul enzimelor cu greutate moleculară relativ mică, ca de exemplu  $\alpha$ -amilaza, îndepărtarea se face pe cale urinară. Există de asemenea, indicii că cel puțin o parte a fosfatazei alcaline hepatice se elimină prin bilă.

Scăderea activității creatinkinazei se datorează într-o primă etapă unui proces de oxidare a grupărilor SH din centrul activ al enzimei, procesul fiind însă parțial reversibil printr-o "reactivare" ce poate fi obținută prin adaosul de compuși conținând grupări SH.

Cea mai mare parte a enzimelor celulare sunt însă îndepărtate din plasmă printr-un proces de captare și degradare în macrofage. Viteza cu care se produce această îndepărtare variază de la enzimă la enzimă și prezintă o deosebită importanță diagnostică, întrucât recoltările de sânge efectuate la un timp prea lung de la evenimentul patologic, pot da rezultate negative. Astfel timpul de înjumătățire ( $T/2$ ) în plasmă este de circa 24-36 ore în cazul ASAT și de 40-68 ore pentru ALAT. De menționat că izoenzimele LDH1 și LDH2 (tipul miocardic) persistă în plasmă un timp suficient de lung ( $T/2 = 60-180$  ore) spre a avea o valoare diagnostică, pe când izoenzima LDH5 (tipul muscular și hepatic) se elimină extrem de rapid ( $T/2 = 8-12$  ore) și din acest motiv are valoarea diagnostică doar în caz de leziuni supraacute și deosebit de extinse ale ficatului și ale musculaturii.

Enzimele de secreție hepatică (colinesteraza, LCAT și factorii coagulării cu activitate enzimatică) sunt și ele degradate în organism, iar timpul lor de înjumătățire variază între 10-14 zile, în cazul colinesterazei și 6-8 ore în cazul factorului VII al coagulării.

### 10.3.3 ACTIVITĂȚI ENZIMATICE ÎN URINĂ

Activitățile enzimatice detectabile în urină pot proveni, în principiu, din următoarele surse:

1. filtrare glomerulară a enzimelor din plasmă;
2. remanierea permanentă a celulelor renale, ureterale și vezicale;
3. creșterea tranzitorie a permeabilității membranei celulelor tubulare renale (de exemplu în cursul unei hipoxii severe);
4. secreții genitale (de exemplu fosfataza acidă din lichidul prostatic);
5. celule sanguine (hematii, leucocite);
6. bacterii.

Cu excepția amilazei pancreatice și salivare și a pepsinogenului gastric (uropepsinogen), filtrarea glomerulară a enzimelor din plasmă este limitată de greutatea moleculară ridicată. Ca urmare, valori crescute ale ASAT, ALAT, CK, LDH, GGT și GLDH în urină pledează pentru leziuni ale celulelor tubulare renale. De fapt creșteri importante ale LDH1, LDH2 și ale GGT

se detectează în boli renale acute și mai ales în caz de rejet al unui transplant renal. Dozările de enzime urinare se practică însă rareori, astfel de determinări nefiind suficient de bine standardizate, respectiv fiind dependente de gradul de diluție al urinei, de variații ale pH urinar și de eventuala prezență a unor peptide urinare cu efect inhibitor. O importanță mai mare se atribuie creșterii  $\beta$ -N-acetil-glucozo-aminidazei în serul și mai ales în urina bolnavilor la care se produce o rejecție a rinichiului grefat.

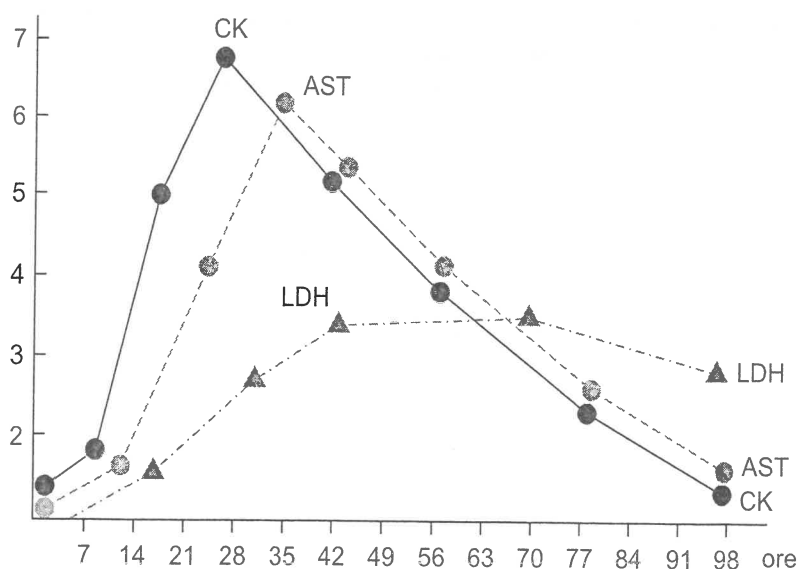
#### 10.4 Valoarea diagnostică a determinărilor de enzime

În Tabelul 10.III se prezintă o sinteză privind semiologia principalelor enzime utilizate în scop diagnostic. Detalii privind interpretarea rezultatelor obținute în contextul datelor clinice sunt prezentate în cele ce urmează.

##### 10.4.1 Enzimele serice în infarctul miocardic

Principalele enzime cu valoare diagnostică, în cazul unei ischemii acute a miocardului care poate ajunge până la necroză, sunt CK (CPK) ASAT și LDH. În interpretarea creșterilor în ser a activității acestor enzime trebuie ținut cont de anumite particularități ale procesului patologic și anume: debutul leziunii survine acut; intervalul de timp în care se instalează leziunile este relativ scurt; zona afectată este relativ limitată și localizată; leziunile suferite de fiecare celulă sunt de regulă severe.

Intervalul de timp de la debutul manifestărilor clinice și electrocardiografice pe de-o parte și creșterea semnificativă a activității serice a enzimelor menționate, depinde de decalajul între producerea obstrucției și modificările suferite de celulele ischemiate, ieșirea enzimelor din aceste celule și trecerea lor din lichidul interstițial în circulația sanguină. Ca urmare, așa cum reiese din Figura 10.14 și Tabelul 10.IV, creșterile activităților serice ale CK, ASAT și LDH prezintă o anumită dinamică, CK fiind prima enzimă care crește, iar LDH ultima dar cea mai



**Figura 10.14** Dinamica creșterii activităților CK, AST și LDH în cursul infarctului miocardic. Pe abscisă - timpul în ore. Pe ordonată - activitatea enzimelor în ser exprimată sub forma de multiplii ai limitei superioare a normalului.

**Tabelul 10.III Semiologia principalelor enzime în diagnosticul de laborator.**  
În paranteză se dau prescurtările utilizate în mod uzual.

Enzima	Proveniență	Modificări patologice	Observații
Aspartat aminotransferază (AST, ASAT)	ficat, miocard, mușchi, mici cantități în plămâni, rinichi, pancreas, eritrocite	Creșteri marcate: infarct miocardic, hepatită acută, leziuni toxice ale ficatului Creșteri moderate: hepatite cronice, mononucleoză infecțioasă, colici biliare	În ficat: 60% în citosol; 40% în mitocondrii
Alanin-aminotransferază (ALT, ALAT)	citosolul hepatocitelor, mici cantități în rinichi, pancreas, miocard, mușchi	Creșteri marcate: hepatită acută și leziuni toxice ale ficatului Creșteri moderate: hepatite cronice, mononucleoză infecțioasă, colici biliare	Localizată mai ales în hepatocitele de la periferia lobului hepatic
Lactat dehidrogenază (LDH)	musculatură, ficat, miocard, rinichi, eritrocite	Creșteri marcate: infarct miocardic, leziuni toxice ale ficatului, anemie megaloblastică, cancer testicular Creșteri moderate: boli musculare, hemoliză, limfoame maligne, sindrom mieloproliferativ	Se disting 5 izoenzime: LDH1, LDH2 cresc în infarct miocardic și anemie megaloblastică LDH4, LDH5 cresc în boli musculare și leziuni acute ale ficatului
Creatinkinaza (CK, CPK)	musculatură, miocard, creier	Creșteri importante: infarct miocardic, distrofie musculară progresivă, dermatomiozite, rabdomioliză Creșteri moderate: injecții intramusculare cu diazepam, tetraciline; hipotiroidism	S-au evidențiat 3 izoenzime: dimerice CKMM - musculară CKMB - specifică miocardului CKBB - din creier
Glutamat dehidrogenază	ficat, mici cantități în rinichi, plămâni, miocard	Creșteri în leziuni severe (necrotizante) ale hepatocitelor	Enzimă mitocondrială (unilobulară)
$\alpha$ -amilaza	glande salivare, pancreas	Creșteri importante: pancreatita acută Creșteri moderate: parotidită, ulcer perforat, insuficiență renală, opioace, colici biliare, macroamilazemie	S-au evidențiat izoenzime pancreatice și salivare. Amilaza se elimină prin urină
Fosfataza alcalină (ALP)	ficat, oase, duoden, rinichi	Creșteri: coleastăză, boli osoase asociate cu reacție osteoblastică Scăderi: hipofosfatazie genetică, mixedem, acondroplazie	Se disting izoenzime osoase, hepatice, intestinale
Fosfataza acidă (AcP)	prostată, eritrocite, plăcuțe, rinichi, ficat	Creșteri: carcinom de prostată cu depășirea capsulei; uneori în carcinoame mamare cu metastaze osoase	Enzima este instabilă. Izoenzima prostatică este tartrat inhibabilă
$\gamma$ -glutamil-transferaza ( $\gamma$ GT, GGT)	rinichi, pancreas, ficat	Creșteri importante: coleastăză, alcoolism, tumori hepatice Creșteri moderate: hepatite cronice, pancreatite, tratament cronic cu barbiturice	Enzimă inductibilă
Colinesteraza (CHE)	secretată activ de către hepatocite	Scăderi importante: ciroză hepatică, intoxicații cu organofosforice Scăderi moderate: denutriție, hipotiroidism, anemii severe, reacție de fază acută Creșteri: sindrom nefrotic, obezitate androidă, diabet tip 2.	S-au descris mutații care afectează activitatea CHE și mai ales deficit de hidroliză a succinilcolinei

**Tabelul 10.IV Comportarea în dinamică a activităților CK, AST și LDH în infarctul miocardic. Modificat după Schmidt și Schmidt (27).**

Enzimă serică	Interval de timp de la debut			Creștere maximă (multiplii ai limitei superioare a normalului)	Observații
	până la detectarea unor creșteri cu valoare diagnostică	până la atingerea valorilor maxime	până la normalizarea valorilor		
CK (CPK)	4-8 ore	16-36 ore	3-6 zile	7 (2-25)	Izoenzima CKMB este mai specifică pentru miocard
AST (ASAT)	6-10 ore	18-48 ore	3-6 zile	6 (2-14)	AST (dar nu și CK) poate crește în infarctul pulmonar
LDH	8-14 ore	24-60 ore	7-15 zile	3,3 (2-8)	Izoenzimele LDH1 și LDH2 sunt mai specifice pentru miocard

persistentă. Alături de această dinamică diferită, diversele enzime utilizate în diagnosticul infarctului miocardic diferă și în privința specificității, respectiv prin posibilitatea de a prezenta creșteri și în alte stări patologice.

#### 10.4.1.1 Valoarea diagnostică și limitele determinărilor de CK

Avându-se în vedere că musculatura striată este deosebit de bogată în CK, leziunile acestui țesut duc la creșteri ale CK care, în anumite situații, pot preta la confuzii cu modificările cauzate de un infarct miocardic. Așa de exemplu creșteri ale activității serice a CK se pot întâlni în: a) efort fizic excesiv efectuat de persoane neantrenate; b) aplicarea șocurilor electrice în cursul tratamentelor de conversie a unei aritmii, survenită uneori ca o complicație a infarctului miocardic, poate duce, prin contracturi ale musculaturii striate, la creșteri mult mai mari ale CK, decât cele explicabile prin leziunea miocardică; c) hipoxia severă a musculaturii, survenită în stări de șoc (șoc cardiogen în cursul unui infarct miocardic sau șoc hemoragic) poate duce la creșteri accentuate ale CK; d) traumatisme ale musculaturii și chiar anumite injecții intramusculare (tetraciline, peniciline, diazepam și unele antiaritmice) se pot însoți de creșteri moderate ale CK; e) leziunile toxice ale musculaturii (miopatia alcoolică), miopatiile degenerative, hipertermia malignă și dermatomiozitele se asociază de regulă cu valori mult crescute ale CK; f) hipotiroidismul sever se însoțește adeseori de valori crescute ale CK, care revin la normal după tratamentul hormonal substitutiv.

Astfel de confuzii pot fi însă evitate dacă modificările activității serice ale CK sunt interpretate în lumina datelor clinice și mai ales dacă se recurge la determinarea izoenzimei specifice miocardului (CKMB). Așa cum s-a mai arătat (vezi tabel 10.III), se disting trei izoenzime ale CK și anume: CKMM (tipul muscular), CKBB aflată în creier (fără importanță diagnostică) și CKMB de proveniență miocardică. De precizat că miocardul conține atât izoenzima CKMM (aproape 80%) cât și izoenzima CKMB (cu ceva peste 20%) și care este oarecum specifică

miocardului. De fapt, o creștere a activității CK la peste dublul limitei superioare a normalului și o valoare a CKMB de peste 50% din activitatea totală a CK sunt sugestive pentru infarctul miocardic (vezi și capitolul 17.3).

#### **10.4.1.2 Utilitatea determinărilor de ASAT**

Deși activitatea serică a acestei enzime crește în mai mică măsură decât CK, explorarea comportării ASAT nu și-a pierdut utilitatea. De fapt, spre deosebire de CK, ASAT crește mai puțin în afecțiunile musculaturii. Se consideră astfel utilă stabilirea raportului CK/ASAT care, în cazul unui infarct miocardic este în medie de 5 (de exemplu CK = 500 U/L; ASAT = 100 U/L) pe când într-o leziune a musculaturii striate acest raport depășește valoarea de 10, fiind în medie de 27. trebuie însă avut în vedere că ASAT poate crește în infarctul pulmonar, precum și în boli hepatice. În astfel de situații nu se ajunge însă la creșteri de CK.

#### **10.4.1.3 Rolul determinărilor de LDH**

Creșterile LDH survin mai târziu decât în cazul CK și ASAT dar persistă mai mult timp (Figura 10.14). Din acest motiv determinările de LDH (în special izoenzimele LDH1 și LDH2) își găsesc utilitate în cazurile care, din diverse motive, ajung să fie investigate doar după câteva zile de la instalarea leziunilor miocardice. De notat importante creșteri ale LDH1 și LDH2 survenite la bolnavii cu anemie megaloblastică.

#### **10.4.1.4 Rolul determinărilor de enzime în diagnosticul complicațiilor infarctului miocardic**

Determinările de enzime pot furniza și relații cu privire la o eventuală insuficiență acută a inimii drepte survenită ca o complicație a infarctului miocardic sau în caz de embolie pulmonară. De fapt, congestia hepatică, instalată rapid într-o astfel de situație, duce la creșterea în ser a unor enzime care indică o leziune hepatică (ALAT, LDH4-5) și care pot fi greșit interpretate ca fiind cauzate de o hepatită acută virală. Totodată, staza hepatică ca și modificările proteosintezei hepatice, consecutive reacției de fază acută explică și scăderea moderată a activității colinesterazei serice, constatată adeseori în zilele și chiar săptămânile care urmează unui infarct miocardic sever.

De asemenea, în cazul instalării șocului cardiogen și implicit a unei hipoxii generalizate, care interesează și musculatura striată, se ajunge la o creștere exprimată a CK (izoenzima CKMM) și a LDH4-5.

#### **10.4.1.5 Evaluarea critică a comportării enzimelor serice în infarctul miocardic și în alte boli ale miocardului**

De regulă, modificările ECG preced creșterea enzimelor de leziune, astfel încât determinările de CK (CPK), ASAT și LDH vin doar să confirme diagnosticul și eventual să evalueze extinderea leziunii. Există însă și situații în care semnele clinice și electrocardiografice nu sunt suficient de concludente. Astfel de condiții pot surveni în cazul microinfarctelor diseminate, în caz de preexistență a unei hipertrofii miocardice, în caz de persistență pe ECG a unor sechele ale unui infarct anterior, în bloc de ramură sau sindrom Wolf-Parkinson-White. De subliniat că

o reinfarctare poate fi ușor decelată de CPK, ASAT și LDH, pe când recunoașterea unui astfel de proces prin examinări ECG întâmpină dificultăți. O situație particulară constă din așa-zisul infarct silențios, adică survenit în absența fenomenelor dureroase. În vederea depistării unor astfel de cazuri se recomandă investigațiile ECG și dozări de enzime ori de câte ori se constată instalarea bruscă a unei insuficiențe cardiace, episoade de dispnee acută, aritmii sau edem pulmonar.

O problemă mult dezbătută este aceea a posibilității de a evalua extinderea leziunii miocardice și implicit prognosticul unui infarct miocardic pe baza determinărilor de enzime. De fapt, prin determinări seriate de CKMB se pot face aprecieri asupra extinderii leziunii și implicit asupra riscului instalării unei insuficiențe de pompă. Nu trebuie însă uitat că gravitatea și prognosticul unui infarct miocardic depind nu numai de extinderea leziunii dar și de localizarea ei. De fapt, infarcte cu extinderea relativ redusă dar afectând sistemul excitocoducător se pot solda cu deces încă din primele ore de la debut, când nivelul activității enzimelor din ser nu a ajuns încă la valori semnificativ crescute.

Pe de altă parte, terapia trombolitică care asigură o repermeabilizare a coronarei trombozate și o reperfuzie a miocardului, se însoțește de o creștere deosebit de exprimată a enzimelor menționate, datorită "spălării" acestora din zona de leziune și a trecerii lor în cantitate sporită și în ritm accelerat în torentul circulator. În astfel de situații, creșterea deosebit de accentuată a CK și ASAT contrastează cu evoluția, de regulă, favorabilă.

În așa-zisa "angină instabilă" cauzată de procese trombotice parietale, care nu produc o ocluzie completă a unei ramuri a arterelor coronare, creșterile de CK și ASAT sunt puțin exprimate. Determinările acestor enzime trebuie însă efectuate seriat spre a se putea surprinde o eventuală trecere spre un infarct miocardic.

**Miocarditele** duc la creșteri ale CK, ASAT și LDH doar atunci când au o evoluție deosebit de acută și evoluează cu procese necrotice diseminate. De notat că apariția bruscă a unei insuficiențe cardiace, în contextul unei miocardite, se poate solda cu eliberarea de ALAT și LDH4-5 din ficatul brusc congestionat. Este de precizat că hepatocitele din centrul lobului hepatic, adică cele aflate în jurul venei centrolobulare, sunt deosebit de bogate în LDH și totodată sunt cele mai afectate de o congestie hepatică rapid instalată.

**Insuficiența cardiacă** dezvoltată lent și progresiv nu se însoțește de modificări apreciabile ale ASAT, ALAT și LDH. S-a constatat însă o scădere progresivă a activității colinesterazei serice (CHE), denotând o reducere a capacității proteosintetice a ficatului ca urmare a stazei și hipoxiei, iar enzimele indicatoare ale colestazei (fosfataza alcalină și  $\gamma$ -glutamil-transferaza) prezintă o tendință la creștere.

**Intervențiile chirurgicale pe cord** se însoțesc, conform așteptărilor, de o creștere în ser a enzimelor de proveniență miocardică.

#### 10.4.2 MODIFICĂRI ALE ENZIMELOR SERICE ÎN BOLILE MUSCULATURII

O treime din masa corporală este reprezentată de musculatură, care conține cantități importante de CK-MM, LDH4-5, aldolază (ALD) și cantități relativ mai reduse de ASAT. Ar trebui deci ca orice leziune musculară să se însoțească de creșteri marcate ale acestor enzime în ser.

Gradul de modificare a activității serice a enzimelor menționate depinde însă în mare măsură de activitatea musculaturii și implicit de fluxul sanguin capabil să antreneze în torentul circulator enzimele scurse din musculatura lezată. Așa se explică faptul că, după contuzii sau chiar după intervenții chirurgicale, care produc leziuni limitate ale musculaturii, creșterile activităților serice ale CK și LDH nu sunt deosebit de accentuate, musculatura lezată fiind pusă în repaus și având o circulație sanguină restrânsă.

Pe de altă parte, efortul fizic intens, care antrenează o creștere importantă a fluxului sanguin în musculatură, poate duce la creșteri semnificative ale CK (izoenzima CK-MM), cauzate probabil de o hipoxie trecătoare. De altfel, așa cum s-a arătat anterior, hipoxia severă și generalizată a musculaturii, survenită în stările de șoc, se însoțește de creșteri importante ale enzimelor provenite din musculatură. Creșteri ale CKMM de peste 10 ori limita superioară a normalului se întâlnesc în sindromul de strivire (*crush syndrome*).

Creșteri moderate, dar semnificative ale CK-MM se pot decela și după injecții intramusculare cu tetraciclină, penicilină, diazepam și antiaritmice, fapt care atrage atenția asupra importante naturii chimice a substanței injectate. De altfel leziunile toxice ale musculaturii între care și o intoxicație acută cu alcool, pot duce în unele cazuri la o așa zisă **rabdomioliză** și la creșteri extrem de accentuate ale CK (izoenzima CKMM).

Distrofiile musculare reprezintă însă principalul domeniu în care determinările de enzime își găsesc valoare diagnostică. De fapt, creșteri extrem de accentuate ale CK (izoenzima CKMM) care pot depăși de 10-30 de ori limita superioară a normalului se întâlnesc în distrofia musculară progresivă, mai ales în tipul Duchenne.

Modificările survenite în tipul rizomelic, tipul facio-scapulo-umeral, distrofia miotonică și în bolile neuromusculare sunt mai puțin exprimate. Important este faptul că cele mai importante creșteri ale CK se constată în fazele de debut ale unei distrofii musculare progresive, când manifestările clinice locomotorii sunt relativ mai puțin exprimate, iar pierderile de masă musculară sunt încă relativ reduse. Pe măsură însă ce boala progresează și musculatura este înlocuită cu țesut conjunctiv și grăsos, activitatea CK scade, astfel încât la bolnavii imobilizați activitatea enzimelor serice ajunge adeseori la valori în limite normale.

Dacă, pe lângă creșterea izoenzimei CKMM se constată și valori crescute ale izoenzimei CKMB se poate bănuși că procesul distrofic interesează și miocardul.

Determinările de CK și ALD pot fi utile și pentru stabilirea mecanismului genetic de transmitere a acestei anomalii cu caracter familial, care se transmite prin gena patologică legată de cromozomul X și care dă manifestări clinice doar la subiecții de sex masculin născuți din mame care prezintă o alelă mutantă. De fapt femeile purtătoare ale alelei mutante și care transmit anomalia, prezintă, de regulă, nivele serice de CK și ALD situate deasupra limitei superioare a normalului.

**Dermatomiozitele** se însoțesc și ele de creșteri evidente ale CK, LDH și ALD, mai ales în cursul puseelor acute, iar tratamentul cu cortizon normalizează nivelul seric al acestor enzime, rămânând însă fără efect în cazurile de distrofie musculară progresivă.

**Hipertermia malignă** este o formă particulară de miopatie, care survine în cursul anesteziilor (un caz la 20.000-50.000 anestezii) și care se însoțește de o creștere masivă a CK, ASAT și LDH.

Cei mai cunoscuți agenți declanșatori sunt halotanul și succinilcolina, dar au fost incriminate și eterul, tricloretilena, ciclopropanul, xilina, diazepamul și chiar barbituricele. Se consideră că astfel de agenți anestezici și miorelaxanți depolarizanți ar declanșa la anumiți subiecți cu o susceptibilitate particulară un flux rapid de calciu din depozitele intracelulare spre mioplasmă. Ca urmare, se produce o excesivă exacerbare a oxidărilor, evoluând cu decuplarea fosforilărilor oxidative și acidoză. Aceste fenomene sunt în măsură să explice atât leziunile fibrelor musculare și implicit creșterea în ser a enzimelor amintite mai sus cât și febra instalată brusc.

De fapt, la scurt timp de la administrarea unuia din agenții mai sus amintiți, subiectul susceptibil dezvoltă subit tahicardie, tahipnee, rigiditate musculară (debutată de regulă ca trismus), și o creștere extrem de accentuată a temperaturii (uneori 41°C-42°C). Determinările de CK, AST și LDH vin să confirme diagnosticul. Această "explozie metabolică" prezintă o deosebită gravitate (deces în aproximativ 60% din cazuri) de unde și denumirea de hipertermie malignă.

#### 10.4.2.1 Alți parametri de laborator utilizați în diagnosticul bolilor miocardului și ale musculaturii striate

Pe lângă determinările enzimelor și izoenzimelor mai sus amintite, diagnosticul și monitorizarea leziunilor miocardului și ale musculaturii striate mai beneficiază de pe urma dozărilor imunochimice ale unor proteine specifice acestor țesuturi și trecute în ser. Așa de exemplu, orice leziune acută a țesuturilor musculare și a miocardului duce la eliberarea de **mioglobină**, care având o greutate moleculară relativ redusă (în jur de 17 kDa) se elimină prin urină și poate fi detectată și în acest produs de excreție.

O importanță mai mare se acordă dozărilor serice de **troponina T (TnT)**. Această proteină din structura musculaturii striate și din miocard contribuie împreună cu actina și tropomiozina la formarea miofibrilelor. Metode imunochimice bazate pe utilizarea anticorpilor monoclonali au reușit să identifice și să dozeze diferențiat o troponină T de origine musculară și o TnT specifică miocardului. Se consideră că determinările de TnT miocardică ar fi mai specifice pentru leziunile miocardului decât dozările de enzime, că TnT ar crește mai rapid decât CK și că această creștere ar fi mai persistentă chiar decât creșterea activității LDH (vezi și Capitolul 17).

Tehnicile CLIA și LIA permit actualmente obținerea rezultatului pentru concentrația TnT, în 20 minute.

#### 10.4.3 ROLUL DOZĂRILOR DE ENZIME SERICE ÎN HEMATOLOGIA CLINICĂ ȘI ONCOLOGIE

**Anemiile megaloblastice** constituie un exemplu tipic despre utilitatea determinărilor de enzime serice pentru stabilirea diagnosticului și evaluarea eficacității terapiei în hematolo-

gia clinică. De fapt, în astfel de cazuri creșterile activității serice a LDH (în special izoenzima LDH1) depășesc de 4-20 ori limita superioară a normalului, iar tratamentul cu vitamina B12 duce la normalizarea acestei activități în decurs de 10-14 zile. De notat că tendința de revenire spre normal a activității serice a LDH începe și devine evidentă înainte de apariția crizei reticulocitare (Figura 10.15). Merită semnalate observațiile conform cărora activitatea serică a LDH este întotdeauna crescută în anemiile megaloblastice cu nivel sanguin scăzut de vitamina B12 și/sau acid folic și cu răspuns favorabil la terapia substitutivă, în timp ce, în anemiile cu aspect megaloblastic al măduvei, dar refractare la tratamentul cu vitamina B12 sau cu acid folic, activitatea LDH nu este modificată în ser.

Astfel de cazuri de "anemie megaloblastică refractară" publicate de Simon și colab. în 1978 ar putea fi doar aspecte particulare ale sindromului mielodisplazic. De fapt, în toate cazurile de sindrom mielodisplazic urmărite în laboratorul nostru, activitatea serică a LDH nu a depășit limita superioară a normalului.

Valori normale ale activității serice a LDH s-au găsit în anemiile feriprive, anemiile sideroblastice, în cazurile de aplazie medulară și în majoritatea cazurilor de anemie hemolitică cu evoluție cronică.

De notat totuși că în anemiile hemolitice creșteri ale LDH1 și LDH2 pot surveni în cursul crizelor de deglobulizare acută, dar chiar și în astfel de cazuri activitatea serică a LDH se situează sub media valorilor întâlnite în anemiile megaloblastice. Dacă însă, la un bolnav cu anemie hemolitică, se constată o creștere importantă și persistentă a activității serice a

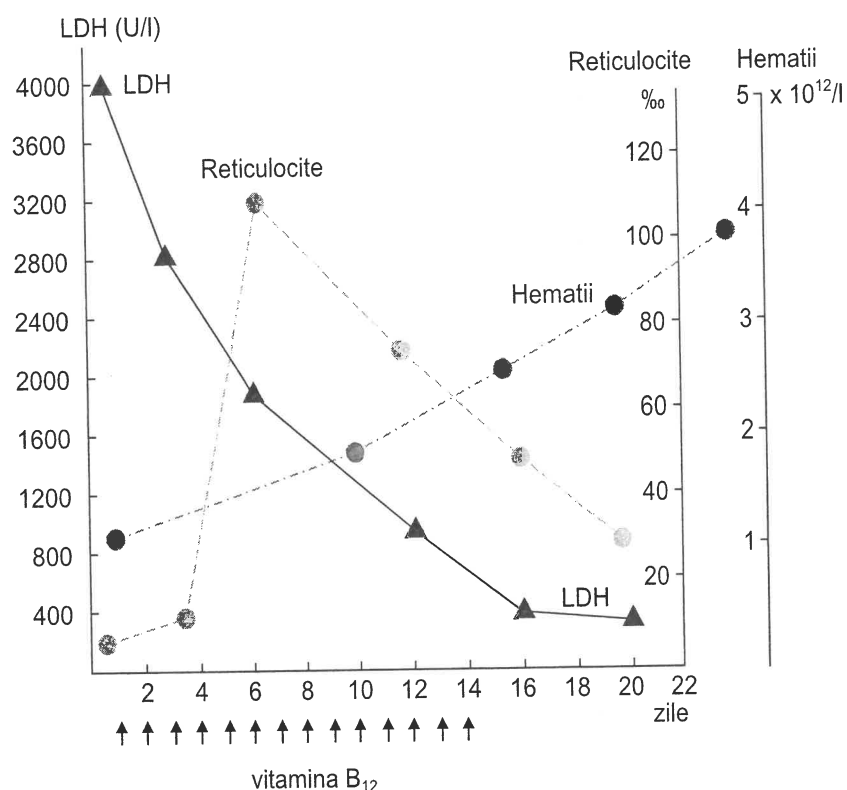


Figura 10.15 Exemplu ilustrativ privind comportarea LDH1 a reticulocitelor și a numărului de hematii în cursul tratamentului cu vitamina B12 a unui bolnav cu anemie megaloblastică și răspuns postterapeutic adecvat. De notat scăderea promptă a LDH încă din primele zile de tratament substitutiv.

LDH, se poate bănuși că a intervenit o carență secundară de acid folic. O astfel de carență poate surveni ca urmare a unei exacerbari cu caracter compensator a eritropoiezei și implicit consumului excesiv a rezervelor de acid folic de către eritronul hiperplaziat (mai ales când acest consum exagerat nu este corectat de un aport adecvat). Întrucât în situația mai sus menționată elementele seriei roșii capătă un caracter macrocitar sau chiar megaloblastic, mecanismul creșterii activității serice a LDH este mai probabil similar cu cel care intervine în anemiile de tip Biermer.

Deși acest mecanism nu este încă pe deplin elucidat, se consideră că o degradare intra-medulară a elementelor imature ale eritronului și un turnover accelerat al acestor celule s-ar solda cu o eliberare masivă de LDH care trece în sângele circulant.

Pentru un astfel de concept pledează și observațiile care au evidențiat valori de 2-3 ori mai ridicate ale activității LDH în serul sângelui medular al bolnavilor cu anemie megaloblastică, comparativ cu activitatea acestei enzime în serul obținut din sângele recoltat din vena cubitală, la aceiași bolnavi. Pe de altă parte, activitatea LDH este relativ mult redusă atât în serul sângelui medular cât și în serul sângelui periferic al bolnavilor cu leucemie limfoidă cronică, o stare patologică în care nu survine o proliferare a elementelor mieloide. De notat însă, că în sindromul mielodisplazic, activitatea LDH din serul sângelui medular este disproporționat crescută față de valorile normale găsite în serul sângelui periferic al acestor bolnavi, ceea ce pretează la o analogie cu discordanța între celularitatea relativ bogată a măduvei și pancitopenia din sângele periferic (Figura 10.16).

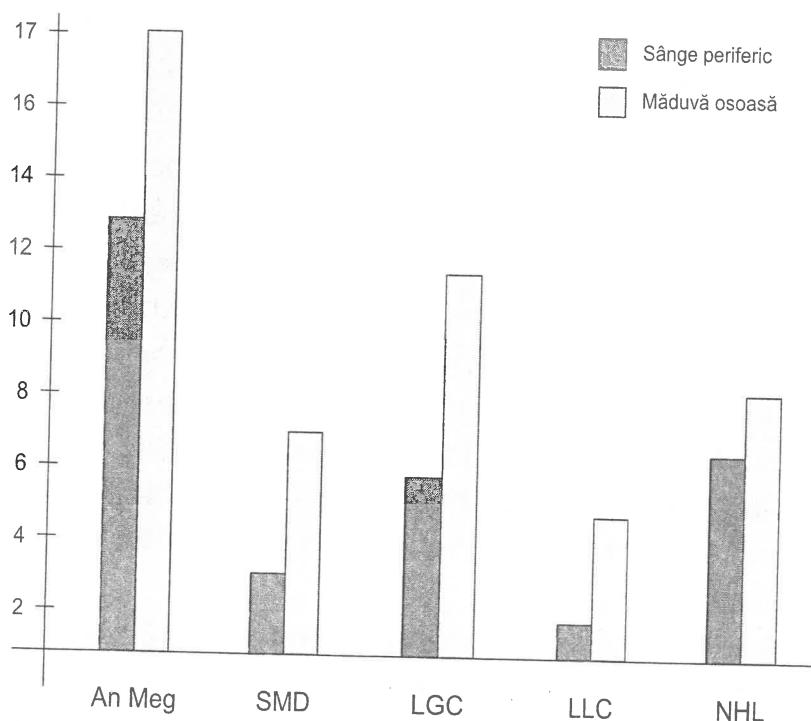


Figura 10.16 Comportarea activității LDH în serul sângelui recoltat din vena cubitală (coloane albe) și în serul sângelui medular (coloane hașurate) la bolnavi cu anemie megaloblastică (An.Meg.) la bolnavi cu sindrom mielodisplazic (SMD) în leucemia granulocitară cronică (LGC), leucemie limfoidă cronică (LLC) și la bolnavi cu limfom non Hodgkin (NHL). Pe ordonată - activitatea în multipli ai limitei superioare a normalului din serul sângelui periferic. Coloanele reprezintă mediana valorilor obținute.

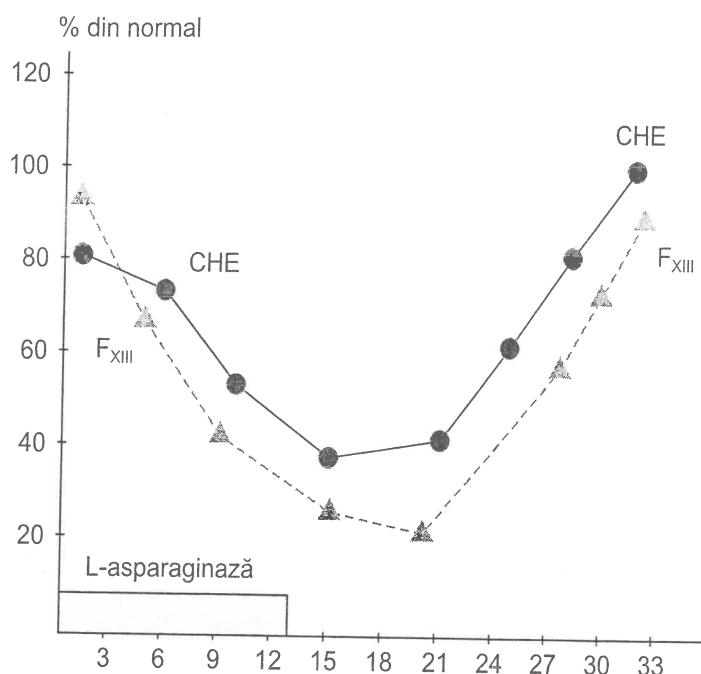
În ciuda dificultăților privind standardizarea probelor de sânge medular, apare evident că activitatea fosfatazei alcaline din serul sângelui medular este mult crescută față de cea din serul sângelui periferic, acest fenomen fiind mai pregnant în stările patologice caracterizate printr-o măduvă osoasă proliferată. Deși fosfataza alcalină din măduva osoasă s-a dovedit a fi mai susceptibilă la inactivare prin căldură, o caracteristică a fosfatazei alcaline de origine osoasă, nu se poate afirma cu certitudine la ora actuală, dacă activitatea crescută a fosfatazei alcaline, în serul sanguin al unei măduve proliferate, reprezintă o expresie a remodelării osteoblastice a traveelor osoase, consecutivă proliferării elementelor mieloide, sau este doar o consecință a eliberării nespecifice a acestei enzime din celulele hematopoietice sau stromale ale măduvei.

Pentru practica medicală este însă important că o creștere marcată a LDH în serul sanguin, alături de scăderea colesterolemiei, sunt considerate ca factori de prognostic rezervat în leucemii și în limfoame. Creșteri deosebite de exprimate ale LDH serice se constată în cancerele testiculare (tumori cu celule germinale), iar alături de unii markeri tumorali relativ specifici cum sunt  $\alpha$ -fetoproteina ( $\alpha$ FP) și gonadotrofina corionică umană (hCG), valorile LDH orientează asupra extinderii procesului malign precum și asupra eficacității chimioterapiei (scăderi postterapeutice).

Un fenomen particular este reprezentat de "falsa creștere" a LDH și a fosfatazei acide în serul bolnavilor cu trombocitemie. Se consideră că în astfel de cazuri, enzimele menționate se eliberează din plăcuțele sanguine excesiv crescute, în cursul coagulării sângelui recoltat pentru laborator. De fapt există o oarecare proporționalitate între numărul de plăcuțe din sânge și activitatea LDH a serului. Degradarea plăcuțelor sanguine aflate în exces la bolnavii cu trombocitemie explică și creșterea concentrației de potasiu în serul dar nu și în plasma acestor bolnavi.

Tratamentul cu L-asparaginază al bolnavilor cu leucemie limfoidă acută ridică o problemă interesantă, cel puțin din punct de vedere teoretic. De fapt, depleția în asparagină cauzată de acest gen de terapie, afectează nu numai celulele leucemice, dar și hepatocitele a căror capacitate de a sintetiza proteine este sever redusă, fapt evidențiat prin scăderea accentuată în plasma a unor enzime de secreție hepatică cum sunt colinesteraza și factorul stabilizator al fibrinei (Figura 10.17). Se consideră că susceptibilitatea particulară a hepatocitelor la depleția în asparagină se datorează faptului că aceste celule nu sunt dotate cu asparagino-sintetază și nu pot compensa, prin sinteză, lipsa acestei amide care a fost degradată de către L-asparaginază. Întrucât asparagina intră în structura lanțurilor peptidice a multor proteine, sinteza acestora este compromisă.

Determinările unor enzime serice orientează și asupra metastazării. Astfel, creșterea  $\gamma$ -GT și a fosfatazei alcaline sugerează apariția unor metastaze hepatice, iar o creștere izolată a fosfatazei alcaline (izoenzima termolabilă) pledează pentru metastaze osoase ale anumitor tumori osteogene. S-au semnalat creșteri ale activităților unor enzime ca sialil-transferaza, galactoziltransferaza II și fucozil-transferaza în serul (sau plasma) bolnavilor cu diverse forme extinse de cancer, dar aceste examinări nu și-au găsit locul în practica de uz curent.



**Figura 10.17** Comportarea colinesterazei serice (CHE) și a factorului XIII stabilizator al fibrinei în cursul terapiei cu L-asparaginază la un bolnav cu leucemie limfoblastică. Pe abscisă - timpul în zile, pe ordonată - activitatea enzimelor în procente din media valorilor normale. De notat scăderea paralelă a activităților CHE și a factorului XIII în urma acestei terapii care perturbă sinteza hepatică de proteine. La oprirea terapiei activitățile CHE și a factorului XIII tind să revină la normal.

#### 10.4.4 DETERMINĂRI DE ENZIME SERICE ÎN BOLI ALE OASELOR

Fosfataza alcalină, secretată de osteoblaste și catalizând hidroliza unor esteri organici ai acidului fosforic, este la ora actuală singura enzimă cu importanță practică pentru patologia țesutului osos. De notat că izoenzima de origine osoasă diferă de fosfataza alcalină hepatică printr-o mai mare susceptibilitate la inactivarea prin căldură și printr-o migrare electroforică mai lentă.

Activitatea fosfatazei alcaline de origine osoasă crește în ser ori de câte ori are loc o reacție osteoblastică asociată cu formarea sau repararea țesutului osos. Așa se explică și faptul că la vârsta copilăriei și, în general în perioada de creștere (până la 15-17 ani) activitatea serică a fosfatazei alcaline (ALP) prezintă valori duble sau chiar triple față de cele întâlnite la adulți.

**Rahitismul** evoluează cu creșteri importante ale fosfatazei alcaline serice, iar tratamentul adecvat cu vitamina D reduce activitatea enzimei la valori normale corespunzătoare vârstei. Se consideră că această creștere a ALP este o consecință a reacției osteoblastice ineficiente, din cauza deficitului de calciu și de fosfați.

**Hiperparatiroidismul** se însoțește de creșteri deosebit de exprimate ale ALP, mai ales atunci când sub acțiunea hormonului paratiroidian în exces se ajunge la decalcifieri osoase și la o reacție osteoblastică compensatorie. În hiperparatiroidismul primar (adenom al paratiroidelor) se ajunge la o importantă hipercalcemie și hipofosfatemie (cu hiperfosfaturie) care alături de creșterea ALP contribuie la stabilirea diagnosticului

**Boala Paget (osteodistrofia deformantă)** se caracterizează printr-un oarecare paralelism între procesele de osteoliză și osteogeneză și respectiv o alternare pe diverse zone a acestor procese, astfel încât calciul resorbit dintr-o zonă de liză a osului este utilizat într-o altă zonă. Ca urmare modificările suferite de calciul și fosfatul seric sunt ne semnificative, iar valorile mult crescute ale ALP sunt de o reală utilitate în diagnosticul de laborator al acestei afecțiuni osoase.

Procesele tumorale primare sau secundare ale scheletului se însoțesc de creșteri ale ALP, în măsura în care dau naștere la o reacție osteoblastică. Așa de exemplu, tumorile primare osteogene evoluează cu valori ridicate ale activității serice a ALP, în timp ce în sarcoamele osteolitice (sarcom Ewing, reticulosarcoame ale oaselor) activitatea enzimei se situează în limite normale.

Reacții osteoplastice și implicit creșteri ale activității ALP se constată în metastazele pornite dintr-un carcinom de prostată și doar în mai mică măsură în caz de metastaze pornite din carcinoame mamare sau alte procese tumorale. De notat însă că valori normale ale ALP la un bolnav cu o afecțiune neoplazică nu pot exclude prezența metastazelor osoase care pot evolua uneori doar osteolitic, nefiind însoțite de o reacție osteoblastică. În acest sens este de menționat că leziunile osoase din mielomul multiplu nu se însoțesc de creșteri ale activității ALP în ser.

**Osteoporoza** constituie la ora actuală o importantă problemă de sănătate cauzatoare de invaliditate. Afecțiunea care afectează persoanele în vârstă avansată și în special femeile după vârsta menopauzei se traduce prin pierderea progresivă și lentă de țesut osos. Din păcate laboratorul contribuie încă în mică măsură la diagnosticul osteoporozei, iar valorile fosfatazei alcaline nu sunt semnificativ modificate.

**Scăderi ale activității fosfatazei alcaline** au fost semnalate în afecțiuni evoluând cu o încetinire a osificării și neînsoțite de reacții osteoplastice, ca de exemplu în deficitul sever de vitamină C, hipotiroidism sever instalat încă din copilărie, precum și în caz de inhibare a enzimei ca urmare a perfuziilor cu EDTA administrate în scop terapeutic la subiecții intoxicați cu plumb. Cele mai importante scăderi ale ALP de origine osoasă se întâlnesc însă în hipofosfatazie, o afecțiune genetică evoluând cu fenomene de rahitism rezistent la terapia cu vitamina D.

Atunci când contextul clinic nu permite o orientare asupra provenienței ALP serice și când nu sunt condiții pentru diferențierea izoenzimei osoase față de cea hepatică se recomandă explorarea activității serice a  $\gamma$ -glutamil-transferazei (GGT). Astfel, creșterile concomitente ale ALP și GGT atrag atenția spre o origine hepatică a ALP în cadrul unei colestaze, pe când o creștere izolată a ALP poate sugera izoenzima de proveniență osoasă.

#### 10.4.5 DOZĂRILE DE FOSFATAZĂ ACIDĂ ȘI CARCINOMUL PROSTATEI

Investigarea activității serice a fosfatazei acide (AcP) este indicată în suspiciunea de carcinom al prostatei. Din păcate creșteri evidente ale acestei enzime survin doar în stadiile relativ avansate, atunci când tumora a depășit capsula și mai ales atunci când a produs metastaze osoase. Ca urmare, o creștere concomitentă și exprimată a ALP și AcP sugerează metastaze

osoase ale carcinomului de prostată și poate diferenția o astfel de situație de alte afecțiuni ale osului. De notat că o creștere moderată, uneori abia schițată, a activității serice a AcP poate surveni și în unele boli osoase cum sunt osteopetroza (boala Albers-Schönberg), afectarea osului în boala Gaucher și în unele cazuri de metastaze osoase ale unui cancer mamar, iar "creșteri false" ale AcP în ser se pot constata în trombocitemii. Originea prostatică a fosfatazei acide poate fi detectată pe baza proprietății izoenzimei prostatice de a fi rapid inhibată de tartrat (izoenzima prostatică tartrat inhibabilă). Astfel, activitatea AcP prostatică = activitatea AcP - activitatea AcP + tartrat.

Determinările de fosfatază acidă și-au pierdut însă mult din valoarea lor diagnostică, de când se poate practica dozarea imunochimică (ELISA) a așa-zisului antigen specific al prostatei (prostatic specific antigen, PSA) care crește mai precoce și mai evident în caz de carcinom al prostatei decât fosfataza acidă.

#### 10.4.6 DOZĂRI DE ENZIME ÎN BOLILE PANCREASULUI

Suferințele acute sau cronice ale pancreasului survin de cele mai multe ori în asociere cu alte îmbolnăviri, între care pe primul plan se situează litiaza biliară și alcoolismul. Hipertrigliceridemiile severe (v. Capitolul 8) predispun și ele la dezvoltarea leziunilor pancreasului. Din acest motiv, este important de a se face o diferențiere între testele de laborator consecutive leziunilor pancreatice și cele cauzate de suferința altor organe, survenite concomitent și în strânsă legătură cu afectarea pancreasului. Astfel, deși țesutul pancreatic este bogat în GGT, creșterea activității serice a acestei enzime, la un bolnav cu pancreatită acută, poate fi mai degrabă considerată ca fiind expresia unei suferințe hepato-biliare și a alcoolismului. Hepatopatia cu caracter colestatic poate explica și nivelele crescute ale ALP, ASAT și ALAT care cresc în cadrul unei colici biliare precedând sau evoluând concomitent cu o pancreatită acută. Creșterea concentrației serice a acizilor biliari în numeroase astfel de cazuri constituie de altfel o dovadă a intervenției unui reflux biliar. Pe de altă parte, o creștere a LDH (izoenzimele LDH4 și LDH5) și a CK (izoenzima CKMM), survenită la un bolnav cu o formă deosebit de severă de pancreatită acută, se explică în cadrul stării de șoc și respectiv a hipoxiei musculaturii.

Principalele enzime, a căror creștere poate fi pusă în legătură directă cu lezarea pancreasului și care sunt utilizate în mod curent în scop de diagnostic sunt alfa-amilaza și lipaza. Aceste enzime trec în ser ca urmare a unei alterări a partiției exo-endocrine, dar interpretarea variațiilor suferite de activitatea lor implică o serie de dificultăți care sunt analizate în cele de urmează.

##### 10.4.6.1 Pancreatita acută

Formele severe ale acestei boli sunt o consecință a autodigestiei țesutului pancreatic și a necrozei consecutive a parenchimului. Există însă și numeroase cazuri în care leziunile nu ajung până la forme necrotice-hemoragice și se limitează la modificări de membrană și la edem.

Atât în formele grave cât și în cele mai atenuate se constată o creștere a activității  $\alpha$ -amilazei serice care, la 4-5 ore de la debutul durerilor abdominale, poate ajunge la valori de 5 ori

superioare celor normale, iar în decurs de 24 ore poate depăși de 10 ori limita superioară a normalului. Gradul de creștere al  $\alpha$ -amilazei este însă variabil de la caz la caz și nu s-a putut stabili o legătură certă între gradul acestei creșteri și gravitatea fenomenelor clinice sau evoluția ulterioară a bolii.

Datorită eliminărilor urinare ale  $\alpha$ -amilazei, valorile anormal crescute ale acestei enzime tind să revină spre normal deja din ziua a doua de la debutul fenomenelor acute și doar în rare cazuri persistă mai mult de 72 de ore. Ca urmare, determinarea activității  $\alpha$ -amilazei în urina colectată pe o perioadă de 24 de ore poate detecta retrospectiv eliberări ale enzimei din acinii pancreasului.

Valorile amilazuriei trebuie însă întotdeauna raportate la volumul pe 24 de ore al urinei. De notat că în cazurile evoluând cu stare de șoc și oligurie eliminările urinare de  $\alpha$ -amilază se reduc, iar creșterea activității enzimei în ser persistă mai mult de 72 ore.

Valoarea diagnostică a determinărilor de  $\alpha$ -amilază este limitată și datorită faptului că activitatea serică a acestei enzime depinde nu numai de izoenzima pancreatică, dar și de cea provenită din glandele salivare, iar parotiditele se însoțesc de creșteri importante ale amilazei serice. Există însă posibilitatea de a diferenția cele două izoenzime prin separări electroforetice, prin rezistența la diverși inhibitori și prin adsorbția pe schimbători de ioni.

Alte stări patologice care pot duce la creșteri ale  $\alpha$ -amilazei serice sunt ulcerul duodenal penetrant în pancreas, ocluziile intestinale, infarctul mezenteric, colecistita acută precum și administrările de opiacee, care adeseori produc un spasm tranzitoriu al sfincterului Oddi. O suferință pancreatică cu caracter trecător nu poate fi însă exclusă în situațiile mai sus menționate.

Pe de altă parte, perturbări în procesul de eliminare pe cale urinară a  $\alpha$ -amilazei se însoțesc de creșteri ale activității enzimei în ser, fenomen constatat în boli renale, evoluând cu reducerea filtrării glomerulare. O situație particulară este reprezentată de așa-zisa macroamilazemie când, în urma formării unor complexe cu greutate moleculară ridicată formate de enzimă cu imunoglobulinele (mai ales IgA), se previne filtrarea glomerulară a acestor complexe și implicit a  $\alpha$ -amilazei a cărei activitate crește în ser. Acest fenomen nu pare a avea însă consecințe patologice și este lipsit de semnificație clinică.

Surprinzătoare sunt însă creșterile activității serice ale  $\alpha$ -amilazei în sarcina extrauterină, tumori ovariene, salpingite, precum și în sindromul paraneoplazic întovărășind, de exemplu, unele carcinoame bronșiale. Mecanismele care duc la astfel de creșteri nu sunt încă pe deplin elucidate, incriminându-se în unele cazuri prezența de țesut pancreatic ectopic.

Determinările de lipază serică, o enzimă considerată a fi mai specifică țesuturilor pancreatice și care persistă mai mult timp în ser, nu înlătură decât în parte inconvenientele determinărilor de  $\alpha$ -amilază (Tabelul 10.V).

În schimb, dozările de tripsinogen prin metode radioimunologice sau prin ELISA sunt considerate a fi deosebit de specifice, acest zimogen fiind produs doar de acinii pancreatici.

Observațiile clinice seriate au relevat că în cazurile în care factorii de risc ai pancreatitei acute (de exemplu litiaza biliară, alcoolismul, hipetrigliceridemiile excesive) persistă, atacu-

rile de pancreatită pot căpăta un caracter recurențial, iar suferința pancreatică trece spre o formă cronică.

#### 10.4.6.2 Pancreatita cronică

Cea mai mare parte a bolnavilor de pancreatită cronică sunt alcoolici, iar în cazuri mai rare se pot incrimina alți factori toxici sau hepatopatiile colestatice evoluând cu creșteri ale nivelului plasmatic de acizi biliari. Boala are un caracter lent progresiv și ajunge cu timpul la insuficiență pancreatică. Diagnosticul pancreatitei cronice întâmpină însă dificultăți deoarece manifestările clinice sunt necaracteristice, iar creșterile activității  $\alpha$ -amilazei din ser sau din urină survin doar în cursul eventualelor atacuri recurente, fiind de altfel din ce în ce mai puțin exprimate pe măsură ce parenchimul pancreatic este înlocuit de țesut scleros.

Avându-se în vedere că pancreasul sintetizează zilnic câteva grame de enzime pe care le secretă în duoden, este firesc ca o insuficiență a acestui organ să ducă la scăderea  $\alpha$ -amilazei și a lipazei în sucii duodenali. Datorită însă partiției exo-endocrine mai sus amintite, ar fi de așteptat ca activitatea acestor enzime să scadă și în ser. În realitate, scăderea activității serice a  $\alpha$ -amilazei în cazurile de insuficiență pancreatică este puțin exprimată. Nu trebuie uitat că, în lipsa unui proces acut de pancreatită, mai bine de două treimi din activitatea  $\alpha$ -amilazei serice este dată de izoenzima salivară, astfel încât o eventuală scădere a componentei pancreatice are efect minor asupra activității enzimice globale din ser. Dozările selective ale izoenzimei pancreatice, determinările de lipază serică sau dozarea radioimunologică a tripsinogenului ar putea detecta însă și stările de hipoenzimie cauzate de reducerea parenchimului pancreatic.

De fapt, insuficiența secretorie a pancreasului poate fi mai obiectiv evaluată prin dozarea enzimelor secretate în sucii duodenali pe unitatea de timp în urma stimulării maxime cu secretină-pancreozimină, sau prin dozări de chimotripsină în materiile fecale.

În scopul evitării intubării duodenului, s-a imaginat un test bazat pe administrarea orală a unui peptid sintetic (acid N-benzoil-L-tirozil-p-aminobenzoic). Acest peptid este clivat de

**Tabelul 10.V Cauze extrapancreatice ale creșterii activităților serice ale amilazei și lipazei**

	$\alpha$ -amilaza	Lipaza
Ulcer perforat*	+	+
Ileus*	+	+
Infarct mezenteric*	+	+
Colecistită*	+	+
Parotidită acută**	+	-
Insuficiență renală	+	-
Macroamilazemie	+	-
Sarcină extrauterină	+	-
Sindrom paraneoplazic	+	-

+ = activitate crescută; - = activitate normală; \* = afectarea pancreasului nu poate fi exclusă; \*\* = asocierea unei pancreatite secundare duce și la creșterea lipazei.

chimotripsină în sucul duodenal, eliberând acid p-aminobenzoic (PABA) care se absoarbe din intestin în circulație, și se elimină prin urină unde poate fi dozat. La bolnavii cu insuficiență pancreatică recuperarea în urină a PABA este de aproximativ 50% față de normali. Acest test este însă influențat de eventuale perturbări renale, intestinale sau hepatice.

Insuficiența pancreatică poate fi cauzată nu numai de o pancreatită dar și de alte procese patologice, ca de exemplu, fibroza chistică a pancreasului, carența severă de proteine (Kwashiokor), hemocromatoza, carcinoame ale pancreasului sau ale regiunii ampulare, precum și deficite cu caracter genetic afectând sinteza diferitelor enzime pancreatice.

#### 10.4.6.3 Enzimele serice în carcinomul pancreasului

Atunci când carcinomul interesează capul pancreasului și obstruează ductul biliar principal determinând astfel o colestază extrahepatică, sau în caz de metastaze hepatice ale unui astfel de carcinom se ajunge la creșterea enzimelor indicatoare ale colestazei, ca de exemplu ALP și GGT, această creștere accentuându-se progresiv în cursul evoluției. Activitatea serică a enzimelor provenite din pancreas, respectiv  $\alpha$ -amilaza și lipaza nu se modifică însă în mod semnificativ în carcinoamele pancreasului, chiar și atunci când neoplasmul duce la obstrucția ductului pancreatic.

Astfel de rezultate negative privind comportarea  $\alpha$ -amilazei și lipazei se datoresc probabil caracterului lent și progresiv cu care se instalează obstrucția și mai ales atrofiei țesutului pancreatic.

#### 10.4.7 ENZIMELE SERICE ÎN BOLILE FICATULUI

Dozările de enzime serice își găsesc o largă aplicabilitate în bolile ficatului. În esență, astfel de determinări pot oferi informații cu privire la următoarele aspecte ale patologiei hepatice:

1. Detectarea unei creșteri patologice a permeabilității membranei hepatocitului (de ex. ASAT, ALAT, GLDH, LDH4-5).
2. Depistarea unei insuficiențe a sintezei de proteine în hepatocite (de ex. colinesteraza serică și enzime cu rol în coagularea sângelui).
3. Indicii cu privire la existența unui proces de colestază (de ex. ALP și GGT).
4. Indicii cu privire la o eventuală inducere de enzime (ca exemplu tipic GGT).

Dozările de enzime serice își găsesc o largă aplicabilitate în bolile ficatului. În esență, astfel de determinări pot oferi informații cu privire la următoarele aspecte ale patologiei hepatice:

1. detectarea unei creșteri patologice a permeabilității membranei hepatocitului, (de ex.: ASAT, ALAT, GLDH, LDH4-5);
2. depistarea unei insuficiențe a sintezei de proteine în hepatocite (de ex. colinesteraza serică și enzime cu rol în coagularea sângelui);
3. indicii cu privire la existența unui proces de colestază (de ex. ALP și GGT);
4. indicii cu privire la o eventuală inducere de enzime (ca exemplu tipic, GGT).

Asupra patochimiei ficatului se va reveni în capitolul 12.

#### 10.4.8 ANOMALII ENZIMATICE CU REPERCUSIUNI ASUPRA ACTIVITĂȚILOR NEUROPSIHICE

Sinteza neurotransmițătorilor și a mielinei, precum și menținerea proceselor neuropsihice consumatoare de energie se bazează pe procese metabolice catalizate de către enzime.

Pe de altă parte, explorarea activităților enzimatice din creier întâmpină reale dificultăți. Bariera hematoencefalică limitează trecerea în circulație a diferitelor enzime și proteine provenite din neuroni, chiar și atunci când neuronii sunt lezați, iar efectuarea unor biopsii din creier nu intră în discuție. Evaluări aproximative și indirecte ale unor eventuale anomalii enzimatice în sistemul nervos central s-au făcut prin examinări biochimice postmortem și prin observții referitoare la scăderea concentrației în LCR a produșilor de reacție care ar fi trebuit să rezulte din activitatea unei anumite enzime (de exemplu, scăderea dopaminei și noradrenalinei în deficitul de tirozinhidroxilază, sau scăderea serotoninei și mai ales a produsului său de degradare 5 HIAA în deficitul de triptofan 5 hidroxilază).

Un progres substanțial s-a obținut prin metodele biologiei moleculare, când după descifrarea genomului uman s-au putut detecta mutații în genele unor anumite enzime, făcându-se apoi corelații cu manifestările clinice și de laborator accesibile laboratorului.

Mult mai facilă apare investigarea atunci când o enzimă se exprimă în organe accesibile explorării bioptice, iar deficitul metabolic se repercutează asupra funcțiilor neuropsihice.

Nu este deci întâmplător că stabilirea legăturii între o anomalie enzimatică și retardarea dezvoltării intelectuale s-a stabilit în cazul hiperfenilalaninemiei (fenilcetonuria, PKU), o boală cauzată de un deficit al enzimei fenilalaninhidroxilază (PAH) din ficat (accesibil biopsiei), iar perturbarea metabolică, respectiv excesul de fenilalanină din circulație afectează dezvoltarea psihică, în timp ce un regim sărac în acest aminoacid atenuează efectele negative ale deficitului enzimatic. De notat că în aceste anomalii, deficitul poate fi detectat relativ ușor și precoce prin teste screening cum este testul Guthrie. S-a constatat însă că aproximativ 1-3% din cazurile de hiperfenilalaninemie nu răspund favorabil la restricția de fenilalanină din dietă, iar astfel de copii au avut o evoluție clinică mai nefavorabilă, cu progresiunea fenomenelor neurologice, manifestate prin distonie și dificultăți la deglutiție.

Activitatea fenil-alanin-hidroxilazei fiind dependentă de cofactorul tetrahidrobiopterină (BH4) s-a încercat o terapie cu acest cofactor în acele cazuri care nu beneficiau de o dietă limitată (săracă) în fenilalanină cu obținerea de rezultate favorabile în multe cazuri, prin scăderea nivelului plasmatic de fenilalanină. Ulterior s-a demonstrat că deficitul de BH4 se repercutează nefavorabil și asupra activității altor enzime cu acțiune asupra aminoacizilor aromatici, așa cum sunt tirozinhidroxilaza (TH) și triptofanhidroxilaza 2 (TPH2 izoenzima neuron-specifică), ambele aceste enzime exercitându-și acțiunea în creier.

Relația între sinteza și metabolismul BH4 și activitatea enzimelor PAH, TH și TPH este ilustrată în Figura 10.18, preluată după Hyland cu mici modificări.

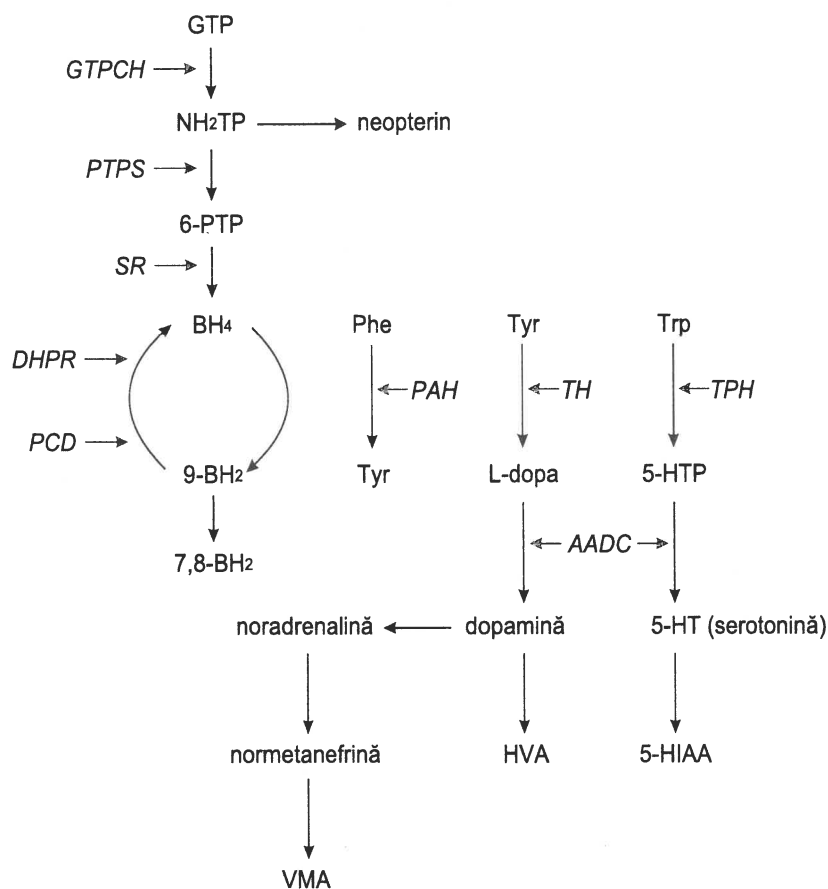
**Biosinteza BH4** pornește de la guanozin-trifosfat (GTP), trecând prin stadiile de dihidro-neopterin-trifosfat (NH<sub>2</sub>TP) și 6 piruvoil-tetrahidropterin (6 PTP) sub acțiunea enzimelor GTP ciclohidrolază (GTPCH), 6 piruvoil-tetrahidropterin-sintetază (PTPS), sepiapterin-reductază (SR).

Reciclarea BH4 din forma oxidată (BH2) decurge sub acțiunea enzimelor pterin  $\alpha$  carbinolamindehidratază (PCD) și dehidropteridin reductază (DHPR) (v. Figura 10.18).

Scăderea activității enzimelor PAH, TH și TPH s-ar putea datora fie unei mutații în gena responsabilă pentru sinteza enzimei, fie unui deficit de cofactor BH4. Important este faptul că o activitate insuficientă a TH se soldează cu reducerea concentrației de dopa și implicit de dopamină în nucleii striati și locus niger de pe calea motorie extrapiramidală, anomalia traducându-se pe plan clinic prin distonie evoluând cu mișcări involuntare repetitive, contorsiuni, stări posturale anormale date de contracții ale unor grupuri musculare și dificultăți la deglutiție. Toate aceste manifestări se reduc dramatic după administrarea de L-dopa.

Dacă anomaliile menționate sus de datorează deficitului de GTP-ciclohidroxilază (GTPCH), și implicit lipsei de BH4 și insuficienței secundare a enzimei TH, această entitate nozologică constituie boala Segawa, denumită astfel după numele neurologului pediatru japonez care a descris-o încă din 1972. Boala Segawa poate fi definită ca fiind o distonie autosomal dominantă cu răspuns bun la L-dopa și cauzată de o mutație în enzima GTPCH cu rol cheie în sinteza de BH4.

S-au detectat și cazuri cu mecanism de transmitere autosomal recesiv la care manifestările de distonie la homozigoții cu mutații de tirozinhidroxilază (TH) sau în sepiapterinreductază



**Figura 10.18** Reprezentare schematică și sintetică a mecanismului de sinteză a 5, 6, 7, 8 tetrahidrobiopterinei (BH4) și a rolului său de cofactor în activitatea enzimelor PAH, TH și TPH2. AADC – decarboxilaza acizilor aminați; HVA-acid homovanilic; VMA - acid vanilmandelic; 5HIAA - acid 5 hidroxiindolacetic

(SR), iar pentru astfel de cazuri se utilizează termenul de sindrom Segawa spre a se sublinia diferența genetică față de boala Segawa. Examinările de laborator relevă o scădere a concentrației de acid homovanilic (HVA), un produs de degradare a L-dopa și dopaminei, atât în cazurile de boală Segawa, cât și în cele compatibile cu diagnosticul de sindrom Segawa, dar nivelele de neopterin și biopterin din LCR sunt scăzute doar în deficitul de GTPCH, respectiv în cazurile de boală Segawa.

**Triptofanhidroxilaza (TPH2)** inițiază formarea serotoninei (5HT) conform secvenței reacțiilor prezentate schematic în Figura 10.19. Deficitul de TPH2 condiționat genetic de mutația G1463A în gena care codifică această enzimă ducând la înlocuirea argininei din poziția 411 cu histidină în molecula enzimei, are drept efect oprirea sintezei de 5 hidroxitriptofan (5HTP), și ca urmare oprirea secreției de serotonină (5HT), neurotransmițător cu rol în prevenirea sau măcar atenuarea stărilor depresive și a tendinței la suicid. Aceste date obținute prin investigații bazate pe tehnici de biologie moleculară concordă cu observații mai vechi conform cărora administrarea prelungită de clorfenilalanină, un inhibitor al TPH utilizat în terapia sindromului carcinoid se soldează cu apariția fenomenelor de depresie la pacienții astfel tratați.

Este însă important să se precizeze că anomaliiile în neurotransmiterea serotoninergică și apariția stărilor depresive și de anxietate majoră se pot datora nu doar unui deficit de sinteză a 5HT, ci și unei depleții a acestei monoamine din veziculele de la nivelul terminațiilor sinaptice, unei recaptări accelerate din fanta sinaptică, unei degradări oxidative exagerate a 5HT sub acțiunea monoaminoxidazei (MAO), sau unor defecte cantitative sau calitative ale receptorilor postsinaptici pentru 5HT.

**Deficitul decarboxilazei cetoacizilor cu catenă ramificată** proveniți din dezaminarea (transaminarea) leucinei, izoleucinei și valinei se soldează cu creșterea concentrației plasmatice a acestor cetoacizi care se elimină prin urină, imprimându-i un miros particular asemănător mirosului dat de siropul de arțar. De aici și numele dat anomaliei ca fiind boala urinelor cu miros de sirop de arțar (BUMSA, iar în engleză maple syrup urine disease). Decarboxilarea oxidativă a acizilor aminați cu catenă ramificată este un proces complex decurgând în cinci etape și implicând legarea coenzimei A (CoA). Din acest motiv complexul enzimatic mai sus amintit a purtat și denumirea de  $\beta$ -cetotiolază, iar mai nou s-a adoptat notația prescurtată BC-KADH (branched chain ketoacid dehydrogenase). O reprezentare mult simplificată a primelor două etape din metabolismul aminoacizilor cu catenă ramificată este redată în Figura 10.19.

În caz de blocare a decarboxilării (deficit de BCKADH) se ajunge la acumularea în plasmă atât a cetoacizilor cât și a aminoacizilor cu catenă ramificată. Defectul metabolic are loc în ficat, dar excesul de cetoacizi cu catenă ramificată își exercită efectul nociv în creier. De fapt, demielinizarea care afectează sistemul nervos al copiilor cu deficit genetic în procesul de decarboxilare a cetoacizilor cu catenă ramificată prezintă o semnificație patogenică mult mai importantă decât mirosul urinelor emise de aceștia.

Studii axate pe histochimia sistemului nervos central au demonstrat că mielina, sintetizată de oligodendrocitele satelit atașate neuronilor este alcătuită din proteine (20-30%) și din

lipide (70-80%), iar proteinele din mielină sunt bogate în leucină (leucine-rich repeats LRR). Aceasta, datorită catenei ramificate lipsită de grupări polare conferă proteinei un caracter hidrofob, având însă proprietatea de a lega componenta lipidică alcătuită din colesterol, fosfolipide și glicolipide. Sinteza lanțurilor peptidice și respectiv sinteza proteinei precede și orientează aderarea și fixarea lipidelor în mielină.

Se presupune că excesul de cetoacizi cu catenă ramificată ar interfera competitiv cu leucina pentru fixarea în proteinele din mielină. Acționând în calitate de „analog chimic”, cetoacidul cu catenă ramificată s-ar fixa prin gruparea carboxil la nivelul unui lanț peptidic în curs de formare, dar fiind lipsit de grupare amino va opri elongarea lanțului peptidic și implicit sinteza proteinei și mielinizarea. Lipsite de teaca de mielină cu rol izolator, expansiunile neuronale vor produce descărcări haotice ale impulsurilor electrice, ducând la perturbarea conexiunilor interneuronale și la dezorganizarea activităților neuropsihice.

**Deficitul de glutamat decarboxilază** și implicit scăderea producerii de acid  $\gamma$  aminobutiric (GABA) în nucelii bazali din creier a fost incriminată în patogeneza coreei Huntington, o boală cu transmitere autosomal dominantă. Manifestările clinice apar însă abia în jurul vârstei de 36-50 de ani, constând în mișcări coreiforme și progresiunea inexorabilă spre demență.

La scăderea concentrației de GABA contribuie nu doar deficitul de glutamat decarboxilază ci și o metabolizare accelerată a acestui aminoacid, așa cum se poate vedea în Figura 10.20.

Prin scăderea concentrației de GABA cu efect de atenuare a excitației și prin creșterea concentrației de acid glutamic cu efect excitator se poate ajunge la fenomene excitotoxice. De notat că administrarea unui analog chimic al GABA, Vigabatrin, având efect de inhibare ireversibilă a GABA transaminazei s-a soldat cu o creștere a concentrației intracelulare a acestui neurotransmițător și cu oprirea spasmelor și convulsiilor infantile, fiind util în co-

A. aminoacid cu catenă ramificată  $\longrightarrow$   $\alpha$  cetoacid cu catenă ramificată

B.  $\alpha$  cetoacid cu catenă ramificată + NAD + CoASH  $\xrightarrow{\text{BCKADH}}$  compus decarboxilat și cuplat cu CoA + NADH +  $\text{H}^+$  +  $\text{CO}_2$

**Figura 10.19** Reprezentare schematică și mult simplificată a primelor două etape din metabolismul aminoacizilor cu catenă ramificată, aceste etape fiind comune leucinei, izoleucinei și valinei: prin transaminare se ajunge la cetoacizi cu catenă ramificată; sub acțiunea complexului enzimatic al BCKADH se ajunge la decarboxilarea acestor cetoacizi în continuare, catabolismul decurge conform celui aplicat acizilor grași.

A. Acid glutamic  $\xrightarrow{1}$  acid gama aminobutiric +  $\text{CO}_2$

B. Acid gama aminobutiric + acid  $\alpha$  cetoglutaric  $\xrightarrow{2}$  semialdehida succinică + acid glutamic

**Figura 10.20** Formarea și degradarea acidului gama aminobutiric (GABA). Formarea GABA din acid glutamic sub acțiunea glutamat decarboxilazei (1) degradarea GABA prin transaminare cu acidul  $\alpha$  cetoglutaric sub acțiunea GABA transaminazei (2), rezultând semialdehidă succinică și acid glutamic

reea Huntington. Pe de altă parte, mutația Q951X în gena receptorului pentru GABA notat GABRG2 s-a soldat cu epilepsie generalizată și convulsii febrile.

Cele câteva anomalii enzimatice cu repercusiuni asupra funcțiilor neuropsihice sunt doar exemple ilustrative pentru o astfel de asociere patogenă.

S-au constatat numeroase alte situații în care diverse anomalii psihice (boala Alzheimer, schizofrenia, coreea Huntington) evoluau cu modificări asociate ale neurotransmițătorilor (GABA, serotonină, acid glutamic, dopamină) dar în care nu se putea face legătura certă între o anumită anomalie enzimatică și o bine precizată disfuncție neuropsihică. De fapt, în cazuri în care anomalia enzimatică duce la acumulări de metaboliți în lizozomii din diferite organe, inclusiv din creier, dezvoltându-se tezaurismoze (sfingolipidoze, mucopolizaharidoze, leucodistrofii), infiltrația afectează mai multe organe, iar leziunile cerebrale sunt difuze; prezentarea diferitelor forme de manifestare ale acestor anomalii ar depăși însă cadrul acestui subcapitol.

### Bibliografie selectivă

1. Adolph L., Lorenz R. Enzyme diagnosis in diseases of the heart, liver and pancreas. S.Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, 1982.
2. Annoni G., Chirillo R., Swanie D. Prognostic value of mitochondrial aspartate aminotransferase in acute myocardial infarction. *Clinical Biochemistry*, 1986, 19, 235-238.
3. Arvanitakis C., Greenberger N.J. Diagnosis of pancreatic disease by syntetic peptide. A new test of exocrine pancreatic function. *Lancet*, 1976, 1: 663-666.
4. Banaie D. A., Sarbaz Y., Gharibzadeh S., Towhidkhah F. Huntington disease: modeling the gait disorder and proposing novel treatments. *J Theor Biol* 2008, 254(2):361-367
5. Bosi G, Bajorin DF, Sheinfeld J, Metzger AJ. Cancer of the testis. in DeVita Helmmann Rosenberg (Eds) *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. 5th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1997, pp 1397-1425.
6. Chapman J. F., Woodard L.L., Silverman L.M. Alkaline phosphatase izoenzymes in Kaplan and Pesce (Editors). *Clinical chemistry C.V.Comp*. St.Louis, Toronto, Princenton, 1984, 1098-1101.
7. Chen Y., Aulia S., Li L., Tang B.L. et al. An emerging family of brain-enriched neuronal growth modulation type I transmembrane proteins with leucine rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. *Brain Research Reviews* 2006, 56: 265-274
8. Cucuianu A., Trif I., Cucuianu M., Petrov L., Pațiu M., Basarab C. Serum lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase activities and serum cholesterol level in bone marrow blood. *Rev.Roum.Med. Int.*, 1996, 34, 173-182.
9. Cucuianu M., Bornuz F., Macavei I. Effect of L-asparaginase upon serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin levels in patients with acute leukemia. *Clin.Chim.Acta*, 1972, 38, 97-102.
10. Cucuianu M., Deac M., Bornuz F., Macavei I. Effect of L-asparaginase therapy upon some indices of protein metabolism in leukemic patients. *Rev.Roum.Med.Int.*, 1973, 10, 121-131.
11. Cucuianu M., Dosan L., Hoinărescu E., Pinteș L., Fischer S. Comportarea lacticodehidrogenazei,

- colinesterazei și g-glutamyltransferazei în sindroamele anemice. Clujul Medical, 1984, 57, 103-109.
12. Cucuianu M., Trif I., Cucuianu A. Hemostaza. Biochimie, Fiziopatologie, Clinică. Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1994.
13. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. Pharmacol Ther 1999, 81:163-221
14. Dubach D.C. Enzymes in urine and kidney. Ed. Hans huber Bern-Stuttgart, 1968.
15. Elias E., Redshaw M., Wood T. Diagnostic importance of changes in circulating concentrations of immunoreactive trypsin. Lancet 1977, 11, 66-68.
16. Fernstrom J.D., Fernstrom MH. Phenylalanine and catecholamine synthesis and function. J Nutr 2007, 137: 1539S-1547S
17. Ferraris A.M., Giuntini P., Gaetani G.P. Serum lactic dehydrogenase activity as a prognostic tool for Non-Hodgkin Lymphoma. Blood, 1979, 54, 928-932.
18. Frayn K.N. Metabolic regulation. A human perspective. Blackwell Science Ltd 2003
19. Gelehrter T.D. Enzyme induction. New Eng. J. Med., 1976, 924, 522-526, 589-595, 646-651.
20. Goldberg D.M. The expanding role of microsomal enzyme induction, and its implications for clinical chemistry. Clinical chemistry, 1980, 26, 691-699.
21. Gordon N. Segawa's disease: dopa-responsive dystonia. J Clin Pract 2008, 62(6): 943-946
22. Hyland K. Inherited disorders affecting dopamine and serotonin, critical neurotransmitters derived from aromatic acids. J Nutr 2007, 137: 1568S-1572S
23. Kamrowska A. Association between the TPH2 gene and suicidal behavior. Pol Merkur Lekarski 2007, 23(136):315-316
24. Kang J. Q., Shen W., MacDonald R.L. the GABRG2 mutation Q351X, associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus, has both loss of function and dominant - negative suppression. Neurosci 2009, 29 (9): 2845-2856
25. Khalife A., Cebotaru C, Cucuianu M. Excesively increased serum lactate dehydrogenase in a patient with germ-cell tumor. Clujul Medical 1999, 72: 82-84.
26. Kluge A., Hang H. Durch Thrombocyten bedingte Enzymaktivitätserhöhung. Med. Welt, 1970, 21/46, 1981-1984.
27. Kornberg A., Polliak A. Serum lactate dehydrogenase levels in acute leukemia. Marked elevations in lymphoblastik leukemia. Blood, 1980, 56, 351-355.
28. Linder M.E., Gilma A.G. G Proteins Scientific American, 1992, 267, 56-65.
29. Lúdecke B., Dworniczak B., Bartholome K.A. A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. Hum Genet 1995, 95(1): 123-125
30. Meyer-Bertenrath J.G. Enzym diagnostik Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/ Lahn, 1976.
31. Mitchell C.J., Humphrey C.S., Bullen A.W., Kelleher J. The diagnostic value of the oral pancreatic function test. Scand.J.Gastroenteral, 1979, 14, 183-187.
32. Muller C.P., Wagner A.V., Mancher C., Steinke B. Hypcholesterolemia, an unfavorable feature of prognostic value in chronic myelogenous leukemia. Eur.J.Haematol.1989,43, 235-239.
33. Neville B.G.R., Parascandelo R., Ferrugia R., Felice A. Sepiapterin reductase deficiency: a congenital dopa responsive motor and cognitive disorder. Brain 2005, 128:2291-2296

34. Oosting J.D., Derksen R.H.W.M., Bobbink I.W.G., Hackeng T.M., Bouma B.N., de Groot P.G. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S. An explanation for their pathogenic mechanism ? *Blood*, 1993, 81, 2618-2625.
35. Pfaff G., Beyer A. Maligne Hyperthermie. *Anaesthesiologie und Intensivmedizin*, 1981, 22, 67-74.
36. Preti HA, Logothetis JL. Testicular tumors. in Pazdur (editor). *Medical Oncology. A comprehensive review*. PRR Huncntinton. New York, 1993, pp.295-311.
37. Puschendorf B., Dienstl F. Kardiales Troponin T-ein hochspezifischer Laborparameter für den akuten Myokardschaden. *Labor Aktuell*, 1995, 5, 5-9.
38. Richterich R. *Enzymopathologie*. Ed.Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958.
39. Rodwell V. *Enzymes in Harper (Editors). Review of Physiological Chemistry ed.14 Lange Med.Publ.Los Altos, Calif. 1973.*
40. Rodwell V.W. Maple syrup disease (Branched chain-ketoneuria) in Murray, Granner, Mayes, Rodwell (Editors). *Harpers Biochemistry Appleton and Lange*, 1996:329-330
41. Schmidt E., Schmidt F.W. *Enzym Fibel Boehringer Mannheim GmbH*, 1971.
42. Schmidt E., Schmidt F.W. *Klinische Pathophysiologie 3rd Edition Ed.Thieme, Stuttgart*, 1975.
43. Segawa M., Nomura Y., Nishiyama N. Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease). *Ann Neurol* 2003, 54 (suppl 6): 532-545
44. Shapiro S.S., Siegel J.E. Hemorrhagic disorders associated with circulating inhibitors in Ratnoff and Forbes (Editors). *Disorders of Hemostasis*, 1991, 245-266.
45. Shaw D. M. The role of the laboratory in some psychiatric illnesses. In Williams and Marks (Editors). *Biochemistry in Clinical Practice William Heinemann Medical Books London* 1983, 523-558.
46. Sherman D.L., Brophy P.C. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 2005, 6: 683-690
47. Shipp M. A predictive model for aggressive non-Hodgkin lymphoma. The non-Hodgkin Lymphoma prognostic factors project. *N.Eng.J.Med*, 1993, 329, 987-992.
48. Simon, S.D., Kim H.C., Wu H.V., Saidi P. Serum lactic dehydrogenase activity in refractory megaloblastic anemia. *Blood*, 1978, 52, suppl.1, Abstr. 46 pag.90.
49. Sjoerdsma A., Lowenberg W., Engelman K et al. Serotonin now: clinical implication of inhibiting its synthesis by parachlorophenylalanine. *Ann Int Med*, 1970,73:607-629
50. Statland BB, Winkel P. Neoplasia in Kaplan and Pesce (Editors) *Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation*. St.Louis-Toronto-Princeton, 1984, pp. 882-896.
51. Stern I. Hereditary and acquired mental deficiency. In Williams and Marks (Editors). *Biochemistry in Clinical Practice. William Heinemann Medical Books London* 1983, 489-523
52. Sunder-Plassmann G. ANCA - Neue diagnostische Aspekte in der Nephrologie. *Labor Aktuell*, 1991, 3, 10-13.
53. Swan H.J.C., Ganz W. Thrombolysis in acute myocardial infarction in Sobel, Collen, Grossbard (Editors). *Tissue plasminogen activator in thrombolytic therapy*. Marcel Dekker, inc.New-York and Basel 1987, 57-74.
54. Tan I.K., Chio L.E., Teow-Suak L. Heat stability of serum alkaline phosphatase in bone and liver diseases. *Clin.Chim.Acta*, 1972, 41, 329-334.

55. Wewalka, F. Enzyme bei Knochenerkrankungen und Cholestase in F.W. Schidt (Editor) *Praktische Enzymologie* Ed. Hans Huber Bern, Stuttgart, 1968, 319-354.
56. Williams D.L., Marks V. *Biochemistry in clinical practice*. William Heineman Medical Books Limited, London 1983, pp. 273-274.
57. Willmore L. J., Abelson M. B., Ben-Menachem E., Pellock I.M., Schiells W.D. Vigabatrin: 2008 update. *Epilepsia* 2009, 50 (2):163-173
58. Zhang X., Gainetdinov R.R., Beaulieu J. M. et al. Function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 2005, 57(3):246-251.

# 11

## Biochimia, fiziologia și patologia hemostazei

Ioana Brudașcă

### 11.1 HEMOSTAZA – NOȚIUNI INTRODUCTIVE

Hemostaza reprezintă ansamblul proceselor fiziologice care concură la prevenirea sângerărilor spontane și la oprirea hemoragiei în caz de leziune vasculară. Ea participă la repararea breșei vasculare și contribuie la menținerea integrității sistemului vascular. Totodată hemostaza previne extinderea intravasculară a fibrinoformării și obturarea vaselor.

Etapile hemostazei sunt reprezentate de:

- Hemostaza primară
  - timp vascular
  - timp plachetar (plachete și factor von Willebrand)
- Coagulare – factori activatori și inhibitori
- Fibrinoliză

În hemostaza primară intervine peretele vascular, care participă prin vasoconstricție și prin intervenția activă a celulelor endoteliale și a componentelor structurale subendoteliale.

Plachetele sangvine migrează la sediul leziunii și în urma unei succesiuni de procese aderă de subendoteliu și se leagă între ele prin punți de fibrinogen, fenomen denumit agregare plachetară. Legarea plachetelor de subendoteliu precum și agregarea lor sunt mediate de un factor plasmatic denumit factorul von Willebrand. Etapa hemostazei primare se finalizează prin formarea unui tromb plachetar.

În procesul coagulării intervin proteine care circulă în formă inactivă, de zimogeni, și care sunt activate în cascadă. Coagularea este inițiată de factorul VIIa (singurul factor care circulă în proporție- substanțială în formă activată), care se leagă de factorul tisular de pe suprafața celulelor endoteliale și a monocitelor, la nivelul leziunii vasculare. Complexul factor tisular factor - VIIa activează factorul X și factorul IX (Figura 11.1). Forma activă a factorului X (Xa), în prezența factorului Va activează proteolitic protrombina în trombină (IIa), enzima cheie a coagulării. Trombina clivează fibrinogenul solubil transformându-l în fibrină, care consolidează dopul hemostatic. Trombina activează de asemenea:

- factorul XIII, care leagă covalent monomerii de fibrină între ei
- plachetele, prin intermediul unui receptor de suprafață pe care trombina îl clivează
- factorii XI, V și VIII, precum și inhibitorul fibrinolizei activabil de către trombină (TAFI), toate aceste efecte ale trombinei fiind protrombotice.

Trombina are și un efect anticoagulant prin legarea ei de trombomodulină (o proteină endotelială), acest complex activând proteina C.

Generarea necontrolată de trombină este limitată de o serie de proteine reglatoare. Complexul factor VII/factor tisular este inactivat prompt de inhibitorul căii mediate de factorul tisular (TFPI). Antitrombina III inactivează trombina și factorii Xa, IXa și XIa, proces accelerat de 1000 de ori în prezența heparan sulfatului endotelial sau a heparinei. Proteina C activată în prezența cofactorului ei, proteina S, inactivează proteolitic factorii Va și VIIIa, limitând astfel generarea de trombină. Factorul Xa este inhibat de un complex format din inhibitorul de proteaze dependent de proteina Z (ZPI) și proteina Z (dependentă de vitamina K).

Prin formarea trombului fibrinoplachetar breșa vasculară este obturată iar extravazarea sângelui este stopată. După regenerarea endoteliului vascular trombul este îndepărtat prin procesul de fibrinoliză, care constă în degradarea proteolitică a fibrinei de către plasmină.

Formarea plasminei din precursorul său inactiv - plasminogenul, este asigurată de activatorii fibrinolizei. Aceștia sunt activatorul tisular al plaminogenului (t-PA) sintetizat și eliberat de către endoteliile vasculare, urokinaza (u-PA), care se găsește în special la nivelul epiteliilor mucoase, precum și de sistemul de activare intrinsec (factorul XII, HMWK și kalikreina).

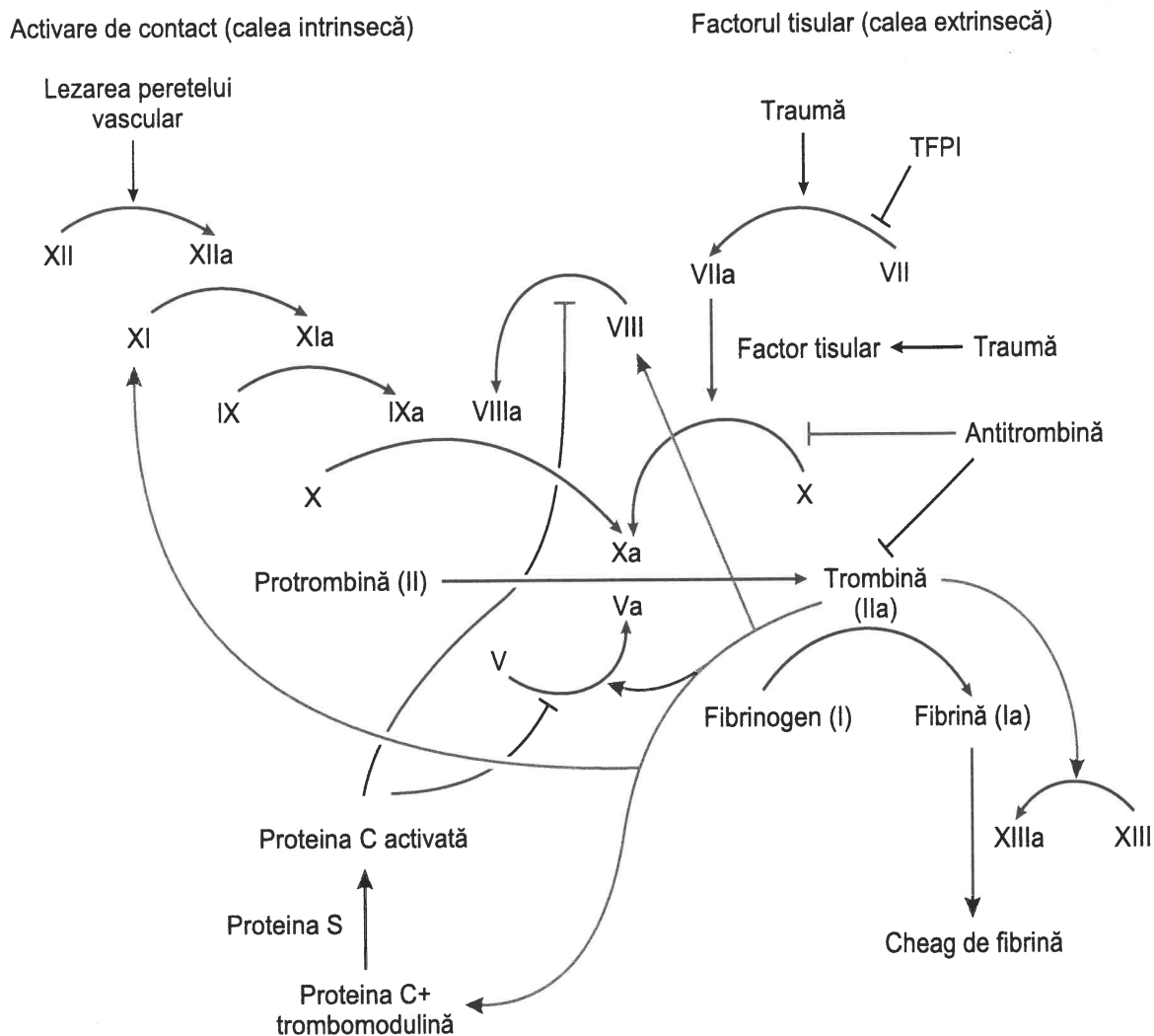


Figura 11.1 Reprezentare schematică a procesului de hemostază

Fibrinoliza se găsește sub controlul unor mecanisme care previn îndepărtarea prematură a trombului, precum și declanșarea unei fibrinolize sistemice. Acești inhibitori sunt reprezentați de inhibitorul activatorului plasminogenului (PAI), care inhibă acțiunea t-PA, de  $\alpha_2$  antiplasmină, un inhibitor de proteaze care neutralizează plasmina și de TAFI (*Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*), care limitează degradarea fibrinei de către plasmină.

Echilibrul între activarea factorilor coagulării și mecanismele anticoagulante și fibrinolitice asigură un status normal al hemostazei, iar perturbările acestui echilibru conduc la apariția hemoragiilor sau trombozelor.

## 11.2 HEMOSTAZA PRIMARĂ

### 11.2.1 INTERVENȚIA COMPONENTEI VASCULARE

Peretele vascular intervine în hemostază prin vasoconstricție și prin implicarea endoteliului.

#### 11.2.1.1 Rolul vasoconstricției

În economia generală a hemostazei vasoconstricția are un efect tranzitoriu și cu importanță relativ redusă. Ea se datorează contracției celulelor musculare netede ale vaselor mici. La nivelul capilarelor (care nu sunt contractile) leziunea endotelială poate fi obturată prin aderarea celulelor endoteliale între ele.

Vasoconstricția oprește temporar extravazarea sângelui și favorizează etapele ulterioare ale hemostazei, prin acumularea de plachete la nivelul leziunii vasculare.

Printre mecanismele care produc și întrețin vasoconstricția se numără secreția de serotonină și de tromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) din plachetele activate, precum și eliberarea unui puternic vasoconstrictor endotelial - endotelina.

#### 11.2.1.2 Rolul endoteliilor vasculare

Endoteliile vasculare integre morfologic și neperturbate funcțional au proprietăți antitrombotice, datorită sintezei unor compuși cu rol antiplachetar, anticoagulant și profibrinolitic, care sunt prezentați în tabelul 11.1.

**Tabel 11. I Compuși care conferă proprietăți antitrombotice endoteliilor**

<b>Compuși cu rol antiplachetar</b>
• PGI <sub>2</sub> , EDRF, ADP-ază – rol vasodilatator și în inhibarea plachetelor
<b>Compuși cu rol anticoagulant</b>
• Heparansulfat (activează antitrombina III) și dermatansulfat (activează cofactorul II al heparinei)
• Trombomodulina – activează sistemul proteinei C
• TFPI – limitează acțiunea complexului factor tisular/factor VII
<b>Compuși cu rol profibrinolitic</b>
• t-PA (activator al fibrinolizei)

În cazul leziunilor endoteliale cauzate de endotoxine, radicali superoxid sau prin stimularea de către citokinele proinflamatorii, în endotelii predomină mecanismele protrombo-

tice: eliberare de factor von Willebrand, expunere de factor tisular (cu rol în declanșarea coagulării pe cale extrinsecă), reducerea activității fibrinolitice prin eliberare crescută de PAI, expunerea unor molecule de adeziune care favorizează activarea locală a plăcuțelor și leucocitelor (VCAM, ELAM).

Chiar în absența expunerii la stimuli, endoteliile intacte sintetizează și secretă și componente protrombotice, cum ar fi factorul von Willebrand cu rol în aderarea și agregarea plachetară, factorul VIII cu rol în coagulare și PAI cu rol în inhibarea fibrinolizei. Totuși, în endoteliile intacte predomină mecanismele antitrombotice.

### 11.2.1.3 Rolul structurilor subendoteliale

Prin producerea unei leziuni vasculare se expun fibre de collagen, microfibrile de elastină și membrana bazală, elemente de care aderă plachetele fie direct, fie prin intermediul vWF. Contactul plasmei cu structurile subendoteliale duce la activarea coagulării pe cale intrinsecă, prin activarea factorului XII.

### 11.2.1.4 Aspecte patologice ale hemostazei care interesează peretele vascular

Afectarea vasculară se traduce din punct de vedere clinic prin leziuni diseminate, de obicei de dimensiuni mici (peteșii), mai rar sub formă de echimoze.

În tabelul 11.II sunt prezentate principalele anomalii vasculare asociate cu perturbări ale hemostazei.

**Tabel 11.II Anomalii vasculare asociate cu perturbări ale hemostazei**

#### Anomalii cu caracter genetic

- anomalii ale peretelui vascular (teleangiectazia hemoragică ereditară, ataxia teleangiectasia, hemangiomul cavernos, boala Fabry)
- anomalii ale țesutului conjunctiv perivascular (sindromul Ehlers Danlos, sindromul Marfan, osteogeneza imperfectă, pseudoxantomul elastic)

#### Anomalii cu caracter dobândit

- purpura mecanice (posttraumatice, creșterea presiunii venoase retrograde)
- purpura prin atrofia țesutului de susținere (purpura senilă, scorbut, amiloidoză, exces de corticosteroizi)
- purpura medicamentoase
- purpura în context infecțios
- vasculite (purpura Henoch Schonlein)
- purpura prin obstrucții vasculare (paraproteinemii, crioglobulinemii, embolii grăsoase)
- purpura idiopatice (autosensibilizare față de eritrocite, autosensibilizare față de ADN, purpura pigmentată progresivă)

## 11.2.2 PLACHETELE SANGVINE (TROMBOCITELE)

Plachetele sangvine intervin în oprirea hemoragiei prin aderarea lor la peretele vascular și prin formarea de agregate, generând trombul plachetar, care ulterior va fi consolidat de fibrină.

Plachetele sangvine își au originea în măduva hematopoetică și provin din fragmentarea citoplasmei megacariocitelor. Controlul producerii și eliberării plachetelor din măduvă se

exercită prin intermediul a două tipuri de trombopoetină: una care stimulează diferențierea în direcție megacariocitară a celulei stem pluripotente și cealaltă care influențează maturarea seriei megacariocitare.

În arborele vascular numărul de plachete este de 150 000- 400 000/mm<sup>3</sup>, circa o treime din totalul acestora fiind însă sechestrată în sinusurile venoase din splină și ficat. Durata de viață a plachetelor este de 8-10 zile.

### 11.2.2.1 Structură

Plachetele sunt fragmente celulare anucleate, cu formă discoidală în stare de repaus și având diametrul maxim de 5-7μ.

**Membrana.** Plachetele sunt delimitate de o membrană formată dintr-un dublu strat fosfolipidic, care se invaginează în unele regiuni, putând suferi rearanjări în condițiile activării plachetare, expunând fosfolipide cu rol în coagulare (factorul plachetar 3, PF3). În structura membranei sunt înglobate glicoproteine cu rol de receptor, care intervin în procesele de aderare și agregare plachetară. Rolul acestor glicoproteine este prezentat în tabelul 11.III.

**Tabel 11.III Glicoproteine ale membranei plachetare**

Glicoproteine	Semnificație funcțională
GpIa	Împreună cu GpIIa formează un receptor pentru collagen și intervine în aderarea plăcuțelor la structurile subendoteliale
GpIb	Împreună cu GpIX constituie un receptor pentru vWF prin intermediul căruia plăcuțele se leagă de peretele vascular. Este receptor pentru trombină
GpIIb/IIIa	Leagă fibrinogenul, vWF și fibronectina, asigurând agregarea plachetelor activate
GpIV	Este receptor pentru trombospondină și collagen

**Citoscheletul și proteinele contractile.** Aceste proteine asigură modificările de formă ale plachetelor și emiterea de prelungiri (filipode) și sunt reprezentate de actină și miozină. Citoscheletul conține și un sistem circumferențial microtubular, cu rol în schimburile de substanțe cu mediul extern și în menținerea formei discoidale.

**Sistemul de granule.** Granulele α conțin proteine specifice plachetelor, cum ar fi factorul plachetar 4 (PF4), cu efect de inhibare a heparinei, β tromboglobulina (β TG) și factorul de creștere endotelial derivat din plăcuțe (PDGF). PF4 și β TG sunt considerați markeri ai activării in vivo a plachetelor sangvine. Prin acțiunea sa mitogenă, PDGF intervine în condiții fiziologice în procesul de reparare a leziunilor, iar în mod patologic contribuie la progresiunea plăcilor ateromatoase (prin stimularea proliferării celulelor musculare netede și a fibroblastelor). Granulele α conțin și fibrinogen, factor V și vWF, care se eliberează în plasmă în urma activării plachetelor, precum și trombospondină, o proteină cu rol în consolidarea agregatului plachetar.

Granulele dense conțin ATP, ADP (fiind un rezervor de stocare a nucleotidelor), serotonină (care prin eliberare exercită un efect vasoconstrictor) și calciu. Calciul este stocat și la nivelul unui sistem tubular dens, similar cu reticulul sarcoplasmic muscular (Figura 11.2).

### 11.2.2.2 Răspunsul plachetelor la stimuli

Stimulii fiziologici ai plachetelor sunt reprezentați de trombină (în concentrații mult mai scăzute decât cele necesare coagulării), collagen, ADP, acid arahidonic și adrenalină. În condiții patologice, plachetele pot fi stimulate de către complexe antigen-anticorp, unele virusuri și de către factorul activator plachetar (PAF) eliberat de leucocitele activate. De notat că efectele diferiților stimuli se pot suma.

Secvența de procese în cazul existenței unei leziuni vasculare se traduce prin aderarea plachetară de straturile subendoteliale, activarea lor (implicând modificări de formă și secreția conținutului granulelor) și agregarea plachetelor între ele.

**Aderarea** plachetară se produce în condițiile expunerii collagenului și microfibrilelor subendoteliale, de care plachetele se leagă fie direct prin intermediul Gpl $\alpha$ /Ila, fie prin intermediul vWF, care se leagă de complexul Gplb/IX. Aderarea este influențată de regimul de curgere al sângelui, de forțele de frecare care împing plachetele spre peretele vascular și le desprind pe cele care nu au fost bine fixate, precum și de eliberarea de ADP (cu efect de favorizare a adezivității) din hematii.

**Activarea** plachetelor se produce în urma cuplării stimulilor cu receptorii membranari. Ea implică procese de transducție a semnalului prin intermediul proteinelor G și a unor mesageri secundari (cAMP, diacilglicerol și inozitoltrifosfat) care acționează prin modificarea conținutului în ioni de calciu al citoplasmei, respectiv contracția proteinelor din citoschelet. Aceasta va antrena modificări de formă ale plachetelor, care devin sferice, emit prelungiri, se expun glicoproteinele membranare, iar granulele se concentrează spre centrul plachetei. Conținutul granulelor  $\alpha$  și al granulelor dense este expulzat, iar secreția conținutului granulelor dense duce la eliberarea de ADP, stimul al agregării plachetare. De fapt, secreția plachetară survine în strânsă legătură și concomitent cu agregarea plachetelor, influențând cinetica și amplitudinea acesteia.

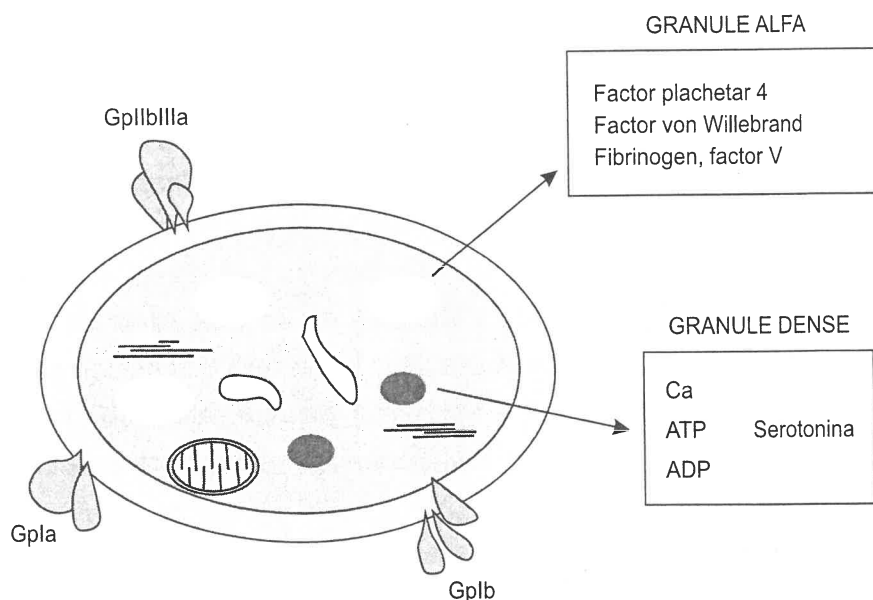


Figura 11.2 Structura plachetelor sanguine

Prin transformarea acidului arahidonic citoplasmatic sub acțiunea ciclooxygenazei se formează endoperoxizi, care sub acțiunea tromboxan sintetazei generează tromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>); acesta odată eliberat la exterior are un puternic efect agregant asupra plachetelor și un efect vasoconstrictor. De menționat că la nivelul endoteliilor, aceeași cale metabolică conduce la formarea din endoperoxizi a prostacilinei (PGI<sub>2</sub>), cu efect antiagregant și vasodilatator, sub acțiunea prostacilin sintetazei.

**Agregarea** plachetară se realizează prin legarea plachetelor între ele prin intermediul moleculelor de fibrinogen.

În urma activării pe suprafața fiecărei plachete se expun circa 50 000 de receptori GpIIb/IIIa, la care se fixează fibrinogenul prin punți de ioni de calciu. Fibrinogenul necesar agregării se eliberează chiar din granulele  $\alpha$  prin stimularea de către trombină sau collagen, iar ADP-ul eliberat din granulele dense amplifică efectul agregant al stimulului primar. Un efect amplificator asupra agregării îl are și TxA<sub>2</sub>, generat prin transformarea endoperoxizilor (Figura 11.3).

### 11.2.2.3 Rolul plachetelor în coagulare

Intervenția plachetelor în coagulare se exercită la multiple nivele. Astfel, ele intervin în activarea prin contact a factorului XII, care aderă la suprafața plachetelor împreună cu kalikreina, fiind favorizată acțiunea activatoare a acestuia asupra zimogenului factorului XII.

Plachetele contribuie la activarea factorului XI de către kalikreină în prezența kininogenului cu masă moleculară mare (HMWK) printr-un mecanism independent de factorul XII.

Prin furnizarea de suprafețe fosfolipidice, plachetele favorizează interacțiunea dintre factorul IXa și zimogenul factorului X, în prezența factorului VIII, precum și generarea trombinei sub acțiunea factorului Xa în prezența factorului V. Fosfolipidele plachetare intervin și în activarea sistemului proteinei C.

Studii experimentale recente au demonstrat însă că și după îndepărtarea plachetelor de la sediul injuriei vasculare nu s-au înregistrat scăderi semnificative ale formării complexului

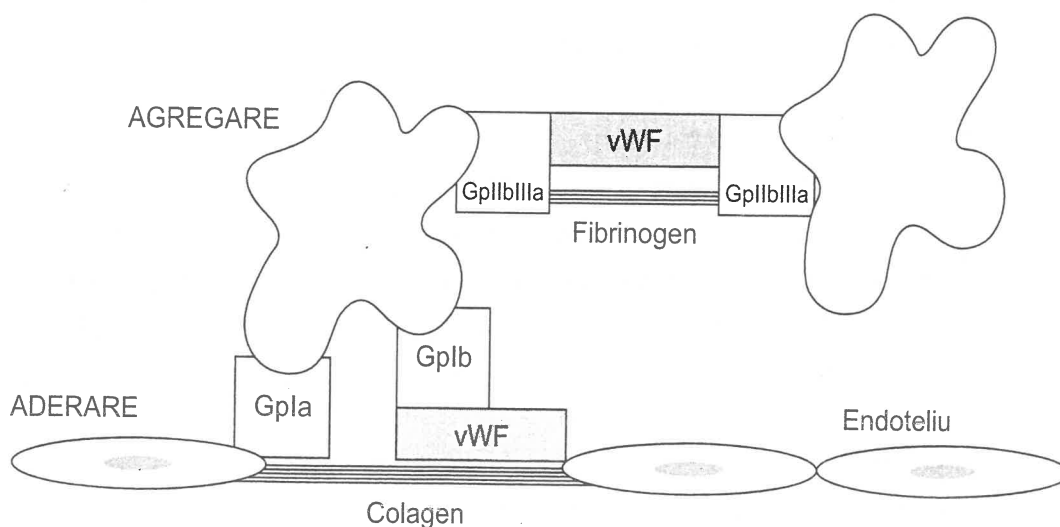


Figura 11.3 Aderarea și agregarea plachetară

protrombinazei, nici ale fibrinoformării. Aceasta sugerează că plachetele ar avea o contribuție mai mică decât se credea în inițierea coagulării, și că endoteliul activat/lezat din zona injuriei vasculare precum și posibil alte celule sangvine ar avea un rol important în furnizarea unor suprafețe membranare procoagulante in vivo.

O contribuție importantă a trombocitelor la procesul de coagulare este reprezentată de microparticulele plachetare (MP). Microparticulele sunt fragmente de membrană/citoplasmă (cu dimensiuni sub-micronice) eliberate de pe suprafața celulelor. Inițial considerate detritusuri celulare, microparticulele se produc prin activarea celulară chimică sau fizică (agoniști sau stres de forfecare), prin apoptoză sau prin diferențiere celulară.

Microparticulele plachetare pot conține proteine de adeziune specifice (P-selectin, integrine – GPIIb/IIIa), dar pot transporta și factor tisular (FT), care are un efect procoagulant, precum și alți efectori funcționali (E-selectin, factor von Willebrand, acid arahidonic, tromboxan A<sub>2</sub>), care pot regla agregarea, exprimarea moleculelor de adeziune, proliferarea celulară, apoptoza și migrarea endotelială.

MP plachetare funcționează ca un sistem de transport și eliberare pentru molecule bioactive, participând la hemostază și tromboză, inflamație, angiogeneză și imunitate.

#### 11.2.2.4 Rolul plachetelor în fibrinoliză

Interrelația dintre plachete și fibrinoliză este extrem de complexă. La suprafața plachetelor este favorizată interacțiunea dintre plasminogen și activatori, iar prin retracția cheagului, rețeaua de fibrină de care s-au legat plasminogenul și t-PA este îndepărtată de mediul plasmatic bogat în inhibitori ai fibrinolizei. Pe de altă parte, în cursul secreției plachetare se eliberează PAI-1 cu efect inhibitor, iar factorul XIII de origine plachetară intervine și el la limitarea fibrinolizei, datorită efectului de încorporare a  $\alpha_2$  antiplasminei în rețeaua de fibrină.

#### 11.2.2.5 Anomalii cantitative ale plachetelor

**Scăderea numărului de plachete (trombocitopeniile).** Trombocitopenia se definește ca fiind scăderea numărului de plachete sub 100.000/mm<sup>3</sup>. Trombocitopeniile constituie cea mai frecventă cauză a sindroamelor hemoragipare. Din punct de vedere clinic, trombocitopeniile se manifestă prin purpură la nivelul tegumentelor și mucoaselor și prin hemoragii de la nivelul mucoaselor (epistaxis, gingivoragii, metroragii, hematurie). Nu se poate stabili o corelație clară între severitatea trombocitopeniei și intensitatea manifestărilor hemoragice, ținând cont că aportul plachetelor la hemostază este dat atât de număr cât și de funcționalitatea lor.

Principalele mecanisme care pot duce la trombocitopenie sunt prezentate în tabelul 11.IV.

**Creșterea numărului de plachete (trombocitoze și trombocitemii).** Trombocitozele reprezintă creșteri reactive și tranzitorii ale numărului de plachete și survin în diferite stări fiziologice (prin mobilizarea plachetelor de la nivel splenic) sau patologice (având ca mecanism creșterea producției de plachete).

Trombocitemiile apar în contextul unor hemopatii maligne și în sindroamele mielodisplazice. Principalele cauze ale creșterii numărului de trombocite sunt prezentate sintetic în tabelul 11.V.

**Tabel 11.IV Etiopatogenia trombocitopeniilor****I. SCĂDEREA PRODUCȚIEI DE PLACHETE***1. Reducerea megacariocitelor la nivel medular*

- a. invadare medulară în neoplazii (leucemii, limfoame, metastaze tumorale), mielofibroză, granulomatoze
- b. hipoplazie medulară (iradiere, toxice, medicamente, viroze, anemie aplastică, hemoglobinurie paroxistică nocturnă)
- c. congenitale (sindrom Fanconi, trombocitopenie autosomal recesivă, trombocitopenia cu absența radiusului)

*2. Trombocitopoeză inefficientă*

- a. hemopatii maligne, sindrom mielodisplazic
- b. anemie megaloblastică

*3. Sindroame ereditare (trombopoeză inefficientă asociată cu anomalii funcționale plachetare și cu diverse malformații)*

- a. sindromul Bernard Soulier
- b. sindromul plachetelor cenușii (deficit de granule  $\alpha$ )
- c. anomalia May Hegglin
- d. sindromul Wiskott- Aldrich

**II. SCĂDEREA DURATEI DE VIAȚĂ A PLACHETELOR***1. Distrucție prin mecanism imun*

- a. trombocitopenia medicamentoasă (heparină, săruri de aur, chinină și chinidină)
- b. purpura posttransfuzională
- c. purpura neonatală autoimună
- d. infecția cu HIV
- e. purpura trombocitopenică idiopatică

*2. Consum excesiv de plachete*

- a. purpură trombotică trombocitopenică
- b. sindromul hemolitic uremic
- c. coagularea intravasculară diseminată
- d. stări septice
- e. circulație extracorporeală, proteze valvulare mecanice
- f. hemangiom cavernos (sindrom Kasabach-Merritt)

**III. SECHESTRARE ÎN SPLINĂ****IV. TROMBOCITOPENIE DILUȚIONALĂ****11.2.2.6 Anomalii calitative ale plachetelor sangvine (trombocitopatii)****Anomalii dobândite**

Aceste anomalii funcționale survin în boli renale, hepatice, colagenoze, hiperimunglobulinemii monoclonale, neoplazii, sindrom de coagulare intravasculară diseminată și se asociază cu perturbări complexe ale coagulării și fibrinolizei (aceste aspecte sunt discutate în legătură cu particularitățile hemostazei în diferite stări patologice).

De asemenea, numeroase medicamente din clase variate (antiinflamatoare nonsteroidiene, blocante ale canalelor de calciu, antidepressive triciclice, antihistaminice, blocați ai receptorilor adrenergici, anestezice locale, unele antibiotice, etc) pot influența funcția plachetară.

**Tabel 11.V Principalele cauze ale creșterii numărului de plachete****I. TROMBOCITOZE****1. În stări fiziologice (efort fizic intens, descărcări de catecolamine, ovulație, menstruație, lăuzie)****2. În stări patologice**

- a. Reacția de fază acută
  - intervenții chirurgicale majore
  - procese inflamatorii
  - neoplazii
- b. Regenerare medulară accelerată
  - anemii hemolitice
  - anemii posthemoragice
  - anemii feriprive cronice
  - criza reticulocitară la debutul tratamentului anemiei megaloblastice
- c. Secreție crescută de eritropoetină
  - cardiopatii cianogene evoluând cu policitemie
  - tumori renale secretante de eritropoetină
- d. Postsplenectomie

**II. TROMBOCITEMII****1. Afecțiuni mieloproliferative**

- a. Asociat cu policitemia vera, leucemie granulocitară cronică, metaplazie mieloidă anterior apariției mielofibrozei
- b. Trombocitemia esențială

**2. Sindroame mielodisplazice (anemia refractară cu sideroblaști inelari, sindromul 5q-)****Anomalii genetice**

Sunt cauzate de defecte moleculare care pot perturba toate etapele prin care plachetele intervin în hemostază. Aceste anomalii pot fi suspectate atunci când timpul de sângerare este prelungit iar numărul de plachete este normal, sau trombopenia este ușoară (discordantă cu prelungirea timpului de sângerare). Diagnosticul diferențial al acestor anomalii se face prin teste de agregare utilizând diferiți stimuli și prin tehnici de biologie moleculară.

Anomaliile funcționale genetice ale plachetelor sunt prezentate în tabelul 11.VI.

**11.2.3 FACTORUL VON WILLEBRAND (vWF)****11.2.3.1 Structură și funcție**

Factorul von Willebrand este o glicoproteină care mediază interacțiunea dintre plachete, precum și dintre acestea și peretele vascular. De asemenea el transportă factorul VIII al coagulării, protejându-l de acțiunea proteazelor.

Factorul von Willebrand este sintetizat de endoteliile vasculare și de către megakariocite. Sinteza lui este urmată de glicozilări și de clivarea unui propeptid, în urma cărora rezultă monomeri (220-260 kD) ce se unesc prin punți disulfidice, formând dimeri. Aceștia vor polimeriza linear, ajungându-se la multimeri cu mase între 12 000 și 20 000 kD.

Funcționalitatea vWF depinde de gradul de polimerizare, multimerii de talie mare fiind mult mai eficienți în interacțiunea cu plachetele.

Un domeniu al factorului von Willebrand se leagă de Gplb-IX din membrana plachetară, de collagen și alte structuri ale matricii extracelulare, intervenind astfel în adeziunea plachetelor, iar un alt domeniu se leagă de factorul VIII al coagulării, pe care îl protejează de o degradare proteolitică precoce.

**Tabel 11.VI Anomalii calitative genetice ale plachetelor**

#### **I. DEFECTE DE ADERARE**

1. Sindrom Bernard Soulier
  - deficit de Gplb
2. Anomalia de tip sindrom pseudo von Willebrand
  - exces de Gplb pe membrana plachetară
3. Deficit de aderare la collagen
  - deficit de Gpla

#### **II. DEFECTE DE ACTIVARE**

1. Anomalii pe calea acidului arahidonic
  - deficit de ciclooxygenază sau tromboxan sintetază (anomalie de tip aspirinic)
  - deficite ale receptorilor pentru TxA<sub>2</sub>
2. Defecte de mobilizare a calciului

#### **III. DEFECTE DE SECREȚIE**

1. Deficite ale granulelor dense
  - boala rezervorului de stocare – absența granulelor dense
  - sindrom Hermanski Pudlak
  - sindrom Chediak Higashi
  - sindrom Wiskott Aldrich
2. Deficite ale granulelor  $\alpha$ 
  - sindromul plachetelor cenușii (gray platelet syndrome)

#### **IV. DEFECTE DE AGREGARE**

1. Trombastenia Glanzmann
  - deficit de Gplb/IIla –lipsa agregării la stimulare cu ADP

#### **V. DEFICITE FUNCȚIONALE ALE PLACHETELOR CAUZATE DE ANOMALII ALE UNOR PROTEINE PLASMATICE**

1. Boala von Willebrand – plachetele nu aderă la structurile subendoteliale
2. Afibrinogenemia – nu se formează punți de fibrinogen între plachetele activate, care nu agregă

Secreția vWF din endotelii se face atât către structurile subendoteliale, cât și către lumenul vascular. Există o secreție bazală, continuă de vWF și una rapidă și importantă cantitativ, declanșată de adrenalină, mediatori ai inflamației (IL-1, TNF $\alpha$ , histamină, componentele C5a și C5b ale complementului), anioni superoxid, endotoxine, vasopresină (și un analog sintetic al acesteia, desaminodextroargininvasopresină - DDAVp) și acid nicotinic. vWF este îndepărtat din circulație prin acțiunea unei metaloproteinaze sintetizate în ficat numită ADAMTS-13, care clivează cu predilecție formele multimerice mari. ADAMTS - 13 este inactivată de către trombină. În condițiile unui endoteliiu intact, trombina se leagă preferențial de trombomodulina expusă pe suprafața celulelor endoteliale, ADAMTS-13 fiind astfel disponibilă pentru a degrada vWF; acest mecanism limitează extinderea adeziunii și agregării plachetare dincolo de sediul leziunii vasculare. În condițiile unei generări masive de trombină

(așa cum se întâmplă de exemplu în CID din șocul septic), aceasta va inactiva ADAMTS-13, iar în circulație vor persista forme multimerice mari și funcțional active ale vWF. Mutații ale ADAMTS-13 sau inhibarea ei de către autoanticorpi sunt implicate în patogeneza purperei trombotice trombocitopenic.

### 11.2.3.2 Factorul von Willebrand în patologie

Nivelul plasmatic al vWF depinde de rata secreției și de ritmul degradării sale. Nivele crescute ale factorului von Willebrand pot fi întâlnite în numeroase stări patologice așa cum sunt infecțiile acute bacteriene și virale, infarctul miocardic, intervențiile chirurgicale, leucemia acută, eclampsia, sindromul nefrotic, hipertiroidismul, diabetul, obezitatea abdominală sau ciroza hepatică decompensată. Mecanismele care determină creșterea secreției de vWF sunt reprezentate de stimularea adrenergică, acțiunea citokinelor proinflamatorii, stimularea endotelilor de către condițiile hemodinamice particulare (regim accelerat de curgere, scădere a presiunii coloidosmotice), sau perturbarea captării și degradării vWF în ficat (ciroza hepatică).

Relevanța pentru clinică a nivelelor crescute de factor von Willebrand trebuie însă interpretată ținând seama că funcționalitatea vWF este dată de prezența formelor multimerice cu masă moleculară mare, iar determinarea vWF ca antigen (vWF:Ag) nu oferă informații în acest sens (nivele antigenice crescute se pot datora formelor cu masă moleculară mică și cu funcționalitate redusă).

**Boala von Willebrand** se datorează deficitului cantitativ sau anomaliilor calitative ale factorului von Willebrand și este alături de hemofilia A una din cele mai frecvente perturbări genetice hemoragice.

Din punct de vedere clinic se caracterizează prin hemoragii ale mucoaselor (epistaxis, gingivoragii, menoragii, hemoragii spontane din lojele amigdalene).

Boala von Willebrand este clasificată în 3 tipuri majore:

**Tipul 1** care include deficite cantitative parțiale (defect de eliberare a vWF din endotelii)

**Tipul 2** – deficite calitative

- tip 2A – deficit al formelor multimerice mari ale vWF (prin deficit de polimerizare, sau din cauza unei susceptibilități crescute a multimerilor la acțiunea ADAMTS-13).
- tip 2B – afinitate crescută a vWF pentru Gplb plachetară, ceea ce explică agregabilitatea plachetară intensă la ristocetină), în timp ce formele multimerice mici și mijlocii rămase în plasmă - deși au determinanți antigenici și pot transporta factorul VIII- au o activitate slabă de agregare a plachetelor inactivate în prezența ristocetinei (R:Cof scăzut).
- tip 2M- adezivitate plachetară scăzută, în ciuda dimensiunilor normale ale multimerilor vWF
- tip 2N – variante cu afinitatea scăzută pentru factorul VIII

**Tipul 3** – deficit complet de sinteză a vWF, care se traduce prin valori extrem de reduse ale factorului von Willebrand, dar și ale factorului VIII. Clinic apare un sindrom hemoragic extrem de sever, în care manifestările pot lua și forma hematoamelor musculare sau hemartrozelor.

**Sindromul plachetar pseudo von Willebrand** se caracterizează printr-o anomalie la nivelul plachetelor, constând într-o afinitate exagerată a Gplb față de factorul von Willebrand care este normal.

Unele mutații ale genei vWF singure sau în combinație pot avea efect complexe și pot produce fenotipuri mixte.

Mecanismele patogenetice corespunzătoare acestor mutații pot fi parțial elucidate prin câteva teste de laborator cum ar fi determinarea antigenului factorului von Willebrand în plasmă (vWF:Ag), explorarea agregării plachetare la ristocetină în plasma bogată în plachete (PRP), evaluarea capacității vWF din plasma săracă în plachete (PPP) de a agrega în prezența ristocetinei o suspensie de plachete inactivate – așa numitul Ristocetin cofactor (R:Cof), investigarea coagulării pe cale intrinsecă prin APTT și eventual dozarea factorului VIII, precum și imunelectroforeza bidimensională a vWF și electroforeza multimerilor vWF. Aceste teste sunt prezentate în tabelul 11.VII.

**Tabel 11.VII Modificarea unor teste de laborator în diferitele tipuri ale bolii von von Willebrand**

	vWF: Ag	VIII:C	Agregare Ris PRP	R:Cof PPP	Structură multimerică	Răspuns la DDAVP
<b>Tip 1</b>	Scăzut	Scăzut	Scăzută	Scăzut	Normală	Creșterea vWF în plasmă; corectare tranzitorie a hemostazei
<b>Tip 2A</b>	Scăzut sau normal	Ușor scăzut sau normal	Foarte scăzută	Mult scăzut	Absența multi- merilor mari și mijlocii în plasmă și plachete	Creșterea formelor multimerice mici care nu corectează hemostaza
<b>Tip 2B</b>	Scăzut sau normal	Ușor scăzut sau normal	Crescută	Moderat scăzut	Absența multi- merilor mari în plasmă. Normală în plachete	Nu corectează hemostaza, risc de trombocitopenie
<b>Tip 3</b>	Foarte scăzut sau absent	Foarte scăzut	Absență	Absent	Variabil	Fără efect
<b>Pseudo vW (tip plachetar)</b>	Scăzut sau normal	Ușor scăzut sau normal	Crescută	scăzut	Absența multi- merilor mari din plasmă	Ineficient, risc de trombocitopenie

#### 11.2.4 EXPLORAREA HEMOSTAZEI PRIMARE

##### 11.2.4.1 Timpul de sângerare

Este un test care explorează în mod global hemostaza primară; el depinde de calitatea vaselor, de numărul și funcția plachetelor sangvine, de vWF și de fibrinogen.

**Metoda Duke** constă într-o incizie (cu lungime de 3mm, și profunzime de 2 mm) practică cu lanțeta în lobul urechii. În mod normal sângerarea se oprește în mai puțin de 5 minute.

**Metoda Ivy** constă dintr-o incizie lungă de 1 cm și adâncă de 1 mm efectuată pe față

anterioară a antebrațului, pe care s-a aplicat o presiune de 40 mm Hg cu manșeta tensiometrului. Prin această metodă, timpul de sângerare fiziologic este de până la 10 minute.

**Metoda Ivy 3 puncte** este o variantă a celei de mai sus și constă în efectuarea a 3 puncte de incizie pe antebraț în condițiile descrise anterior. Timpul de sângerare este sub 6 minute. Metoda permite și colectarea cantității de sânge scurs, care este sub 100  $\mu$ l.

Timpul de sângerare este influențat de hematocrit, fiind grevat de anumite limite: are o valoare predictivă mediocră a sângerării, reproductibilitate slabă și dependentă de operator, o sensibilitate limitată și o fiabilitate redusă în caz de anomalii tegumentare, motiv pentru care este tot mai puțin utilizat.

#### 11.2.4.2 Timpul de sângerare *in vitro* (timp de ocluzie)

Se efectuează pe un aparat denumit Platelet Function Analyzer (PFA) în care procesele de aderare și agregare plachetară care apar în cursul unei leziuni vasculare sunt simulate *in vitro*. Analizorul conține două tipuri de membrane, una acoperită cu collagen și ADP, cealaltă cu collagen și adrenalină. Sângele trece printr-un orificiu practicat în aceste membrane, fiind înregistrat timpul de ocluzie al orificiului. Timpul de ocluzie este de 60-120 sec pentru collagen/ADP și de 80-120 sec pentru collagen/adrenalină. Acest test explorează global componentele hemostazei primare, exceptând componenta vasculară. Are o sensibilitate mare în cazul bolii von Willebrand și al unor anomalii plachetare.

#### 11.2.4.3 Numărătoarea plachetelor sangvine

Se efectuează în mod uzual din sângele prelevat pe EDTA și are valori cuprinse între 150 000-400 000/mm<sup>3</sup>. Există situații în care EDTA duce la aglutinarea plachetelor, la numărătoare apărând o falsă scădere a numărului acestora. În cazul unei asemenea suspiciuni se recomandă întinderea unui frotiu de sânge periferic colorat May Grunwald Giemsa, pe care se observă agregatele de plachete, urmată de numărătoarea plachetelor din sângele recoltat pe citrat de sodiu, unde se obțin valori reale.

#### 11.2.4.4 Testele de agregare plachetară

Se efectuează pe un aparat denumit agregometru și explorează funcția plachetelor din plasma citratată bogată în plachete (PRP). Stimulii folosiți sunt ADP-ul, collagenul, acidul arahidonic, trombina, ristocetina. La adăugarea acestor stimuli se produce o agregare a plachetelor, ceea ce va crește transmisia optică a unui fascicul luminos care străbate PRP. Înregistrarea acestui traseu generează o curbă de agregare plachetară, din care se pot analiza latența demarării agregării, viteza și intensitatea agregării în raport cu un martor.

Agregometria prin impedanță utilizează sângele integral, iar agregarea plăcuțelor are loc pe suport solid, ceea ce simulează mai exact condițiile *in vivo*. Această metodă se utilizează în special pentru monitorizarea eficienței tratamentului antiplachetar. Unele tipuri de agregometre pot determina simultan cu agregarea și cantitatea de ATP eliberată din plachete, iar altele pot măsura fluxul de calciu eliberat intraplachetar.

Există și alte teste care investighează funcția plachetară, printre care se numără determinarea unor metaboliți ai eicosanoidelor specifice plachetare și testul RPFA (*Rapid Function*

*Platelet Assay*) un test automatizat folosit pentru detectarea anomaliilor plachetare genetice și dobândite și pentru evaluarea efectului terapeutic al agenților antiplachetari (aspirină, clopidogrel, inhibitori ai GP IIb/IIIa).

Trombelastografia este o metodă care permite observarea *in vitro* a relației dintre diferitele componente ale hemostazei, analizând interacțiunile dintre plachete, fibrinogen și factorii coagulării dintr-o perspectivă globală. Formarea cheagului este înregistrată în dinamică, iar curba obținută furnizează informații despre diversele etape ale hemostazei.

Marcarea trombocitelor cu Ac anti glicoproteine membranare și analizarea prin citometrie în flux permite studierea reactivității plachetare, a trombocitelor circulante activate, a agregatelor trombocitare sau a agregatelor trombocite-leucocite, precum și a microparticulelor derivate din trombocite. Testarea se poate face din sânge integral, PRP sau suspensie de trombocite spălate.

#### 11.2.4.5 Explorarea factorului von Willebrand

Aceste teste includ determinarea antigenului factorului von Willebrand în plasmă (vWF:Ag), prin metoda ELISA sau prin electroimunodifuzie (metoda Laurell) și teste funcționale. Acestea constau în studiul agregării plachetare la ristocetină în plasma bogată în plachete (PRP), precum și evaluarea capacității vWF din plasma săracă în plachete (PPP) de a agrega în prezența ristocetinei o suspensie de plachete inactivate – așa numitul Ristocetin cofactor (R:Cof). Pentru investigarea dimensiunii multimerilor de vWF se poate efectua imunelectroforeza bidimensională a vWF și electroforeza multimerilor vWF.

### 11.3 COAGULAREA

Coagularea sângelui se realizează prin transformarea fibrinogenului solubil în fibrină insolubilă sub acțiunea trombinei. Formarea trombinei este asigurată de o adevărată cascadă enzimatică, alcătuită din activări succesive ale precursorilor inactivi ai factorilor coagulării prin procese de proteoliză limitată.

În viziunea clasică, propusă de Macfarlane și Davie și Ratnoff în funcție de modalitatea și viteza de activare a factorului X se disting două căi ale coagulării. Calea extrinsecă, mai rapidă, este amorsată de activarea factorului VII în contact cu factorul tisular (care în condiții fiziologice nu vine în contact cu sângele circulant). Calea intrinsecă decurge ceva mai lent și este inițiată de către activarea factorilor XII și XI prin contact cu structurile subendoteliale sau cu suprafețe străine. Cele două căi nu pot fi însă privite ca două entități independente, între ele existând o multitudine de interacțiuni. Acest model nu poate explica întru totul toate fenomenele care se produc in vivo în cursul hemostazei.

Teoria convențională asupra cascadei coagulării tinde să fie înlocuită de un alt model care presupune că procesele din cadrul coagulării urmează o serie de faze sau stadii: inițiere, amplificare, propagare și terminare, mai degrabă decât cele două căi (extrinsecă și intrinsecă) descrise inițial. În acest model un rol esențial îl are rolul interacțiunii dintre factorii coagulării cu suprafețele celulare.

În faza de inițiere în zona leziunii vasculare celulele care exprimă pe suprafața lor factor tisular vin în contact cu factorul VII care se activează. Complexul format activează mici cantități de factor X și IX. FXa în prezența cofactorului său, FVa, formează un complex (numit protrombinază) la suprafața celulelor care exprimă FT. Complexul protrombinazei produce generarea unor cantități reduse de trombină (insuficiente pentru formarea completă a fibrinei, dar esențiale pentru etapa următoare, de amplificare a coagulării). Există dovezi că factorii VII, X și II pot traversa peretele vascular, considerându-se că procesul de inițiere are loc în mod continuu, producând cantități reduse de trombină în spațiul extravascular chiar în absența unei leziuni vasculare.

Faza de amplificare se declanșează doar în caz de leziune vasculară, în care plachetele și FVIII (transportat de factorul von Willebrand) vin în contact cu structurile extravasculare, unde aderă de celulele care exprimă FT. Cantitatea mică de trombină generată în faza de inițiere interacționează cu plachetele și cu complexul FVIII/vWF. Trombina activează plachetele, care prin secreția conținutului granulelor eliberează FV. Alt efect al trombinei formate în faza de inițiere este activarea FV și FVIII la suprafața plachetelor. Complexul FVIII/vWF disociază, eliberând vWF, care determină aderarea și agregarea plachetară la sediul leziunii. Trombina activează de asemenea FXI la suprafața plachetelor (ceea ce explică de ce FXII nu este indispensabil pentru hemostază).

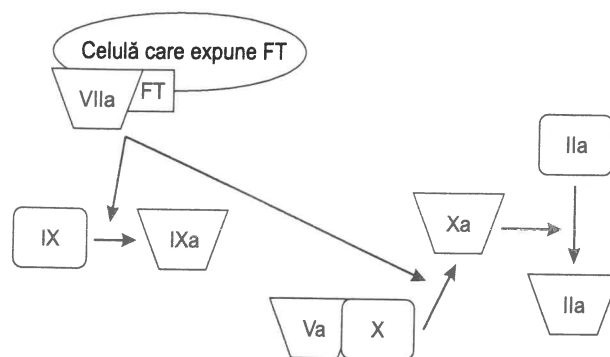
Faza de propagare constă în migrarea unui număr mare de plachete la locul leziunii și producerea complexului tenazei și protrombinazei la suprafața plachetelor activate. Complexul tenazei se formează prin legarea FIXa de FVIIIa. Acest complex generează FXa care se asociază cu FVa pe suprafața plachetelor, formând complexul protrombinazei, care transformă cantități mari de protrombină în trombină. Trombina este responsabilă de clivarea proteolitică a fibrinogenului și apariția monomerilor de fibrină care ulterior vor polimeriza.

Faza de terminare asigură limitarea formării fibrinei la sediul leziunii, prevenind extinderea trombului și ocluzia vaselor. În această etapă intervin mecanismele anticoagulante: TFPI, sistemul proteinei C și antitrombina. Acest model este prezentat schematic în figura 11.4.

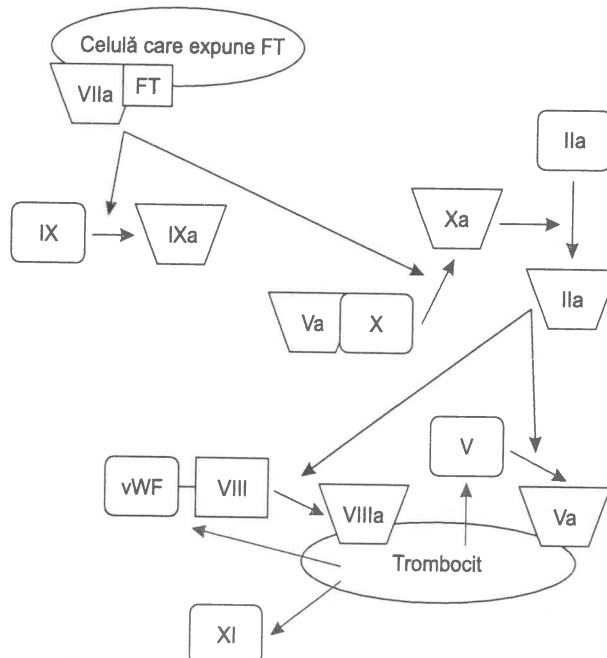
### 11.3.1 FACTORII COAGULĂRII

În raport cu caracteristicile lor biochimice și funcționale, factorii coagulării pot fi grupați precum urmează:

- factorul tisular
- proteaze serinice dependente de vitamina K (factorii II, VII, IX și X)
- factori cu rol în activarea prin contact a căii intrinseci (factorii XII, XI, kalikreina, kininogenul cu greutate moleculară mare HMWK)
- cofactori ai coagulării (factorii V, VIII), care formează complexe cu proteazele, contribuind la creșterea activității lor procoagulante
- fibrinogenul, factorul XIII stabilizator al fibrinei și fibronectina cu rol în formarea și consolidarea rețelei de fibrină

**A. Inițiere**


Complexul protrombinazei (fXa-fVa) activează protrombina la trombină (cantități mici)

**B. Amplificare**


Trombina stimulează eliberarea factorilor V, XI, VIII-vWF din trombocite. Trombina clivează fVIII de pe vWF și-l activează. Trombina activează fV.

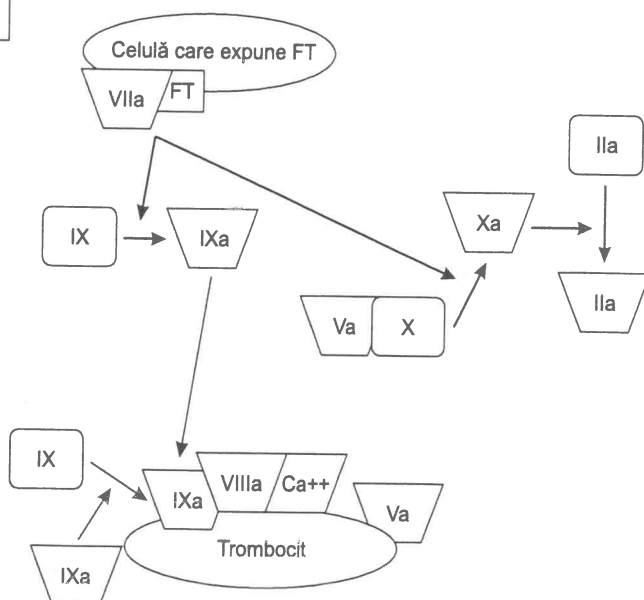
**C. Propagare**


Figura 11.4 Reprezentare schematică a teoriei moderne a coagulării

### 11.3.1.1 Factorul tisular (TF, tromboplastina tisulară)

Este o glicolipoproteină transmembranară care se leagă necovalent de fosfolipide. El este prezent în multe țesuturi (fibroblaste perivascularare, celule subendoteliale, celule endoteliale, creier, plămâni, rinichi, placentă). În mod normal, factorul tisular nu vine în contact cu sângele circulant. În condițiile leziunii vasculare sau a stimulării celulelor endoteliale sau a monocitelor circulante de către citokine proinflamatorii, proteina C reactivă, anioni superoxid, particule de LDL oxidate, lizolecitină generată prin oxidarea LDL sau endotoxine, factorul tisular se expune la suprafața celulelor, amorsând prin legarea de factorul VIIa calea extrinsecă a coagulării. Legarea factorului VII de factorul tisular declanșează de asemenea și procese de semnalizare intracelulară cu rol în angiogeneză și apoptoză.

Microparticule purtătoare de TF pot fi derivate și din monocite, mușchi neted, celule endoteliale, și au fost descrise în cancer, ateroscleroză, diabet tip 2, sepsis, hipertensiune pulmonară, dar și la indivizi sănătoși.

Este de menționat faptul că intima vasculară situată în proximitatea unei plăci aterosclerotice este foarte bogată în factor tisular, iar citokinele produse de celulele spumoase determină expunerea de factor tisular la suprafața celulelor endoteliale suprajacente, fapt ce creează premise de apariție a trombozei.

### 11.3.1.2 Proteaze serinice dependente de vitamina K (factorii II, VII, IX, X)

Acești factori au o serie de caracteristici fizico-chimice comune:

- sunt adsorbabili pe suspensii de citrat de bariu, hidroxid de aluminiu și fosfat tricalcic
- au activitate proteazică, având în centrul activ serină (serin proteaze). Ei circulă în plasmă sub formă inactivă, de zimogeni
- se sintetizează în ficat, sinteza lor hepatică fiind stimulată de un peptid rezultat prin activarea proteolitică a protrombinei
- în structura lor se găsește un domeniu bogat în resturi de acid glutamic (Gla)
- sinteza lor în formă activabilă depinde de prezența vitaminei K. Rolul vitaminei K este de a favoriza acțiunea unei carboxilaze care furnizează factorilor amintiți o grupare COOH la moleculele de acid glutamic menționate mai sus. Radicalii de acid  $\gamma$ -carboxiglutamic rezultați sunt în măsură să fixeze ionii de  $\text{Ca}^{2+}$ , aceste punți de calciu servind la formarea de complexe la nivelul membranelor fosfolipidice între un factor activat și substratul său (zimogenul factorului care urmează a fi activat). În absența sau antagonizarea vitaminei K, factorii respectivi sunt inactivabili, deci nefuncționali, fiind denumiți generic PIVKA (*protein induced by vitamin K absence or antagonism*).

**Factorul II (protrombina).** Protrombina are o masă moleculară de 72 000 D și este activată de către complexul format de Xa, V, fosfolipide și calciu. Activarea sa se produce printr-un proces de proteoliză limitată, în cursul căruia rezultă un peptid de clivare denumit fragment 1+2 (F1+2). Acest peptid stimulează sinteza hepatică de factori ai coagulării dependenți de vitamina K, iar nivelul său în plasmă este un marker al generării protrombinei in vivo.

Trombina rezultată prin activarea protrombinei poate fi considerată enzima reglatoare principală a procesului de hemostază. Efectele trombinei ar putea fi astfel sistematizate:

- transformarea fibrinogenului în fibrină
- activarea factorului XIII stabilizator al fibrinei
- amplificarea sintezei de factori V și VIII
- agregarea plachetelor sangvine
- legarea de trombomodulina endotelială care activează sistemul proteinei C (mecanism anticoagulant). De menționat că, pe de altă parte, complexul trombină-trombomodulină activează și TAFI (Inhibitorul Fibrinolizei Activat de Trombină) care generează modificări ale fibrinei ce o fac mai rezistentă la fibrinoliză.

Din cele prezentate mai sus reiese că reglarea activității trombinei este deosebit de complexă, având în vedere proprietatea ei de a difuza de la nivelul suprafeței unde a fost generată, precum și capacității sale de a cliva numeroase substraturi. Recunoașterea substraturilor de către trombină este controlată de o serie de cofactori care acționează prin fixarea trombinei pe diferite suprafețe, prin blocarea legării substratului de anumite regiuni ale trombinei sau dimpotrivă prin generarea unor situsuri de legare a substratului, respectiv prin modularea alosterică a centrului activ al trombinei. Prin efectele pe care le au asupra hemostazei, acești cofactori pot fi procoagulanți ( $\text{GpIb}\alpha$ , fibrina, ionul de  $\text{Na}^+$ ) sau anticoagulanți (heparina, trombomodulina).

**Factorul VII** intervine în inițierea coagulării pe cale extrinsecă prin formarea unui complex cu factorul tisular, participând însă și la activarea căii intrinseci (prin activarea factorului IX). Factorul VII are o greutate moleculară de circa 50 000 D și este secretat de ficat sub forma unui singur lanț polipeptidic.

Odată ajuns în plasmă, o parte a moleculelor de factor VII suferă un proces de clivare internă, sub acțiunea factorului XII (implicat în principal în activarea căii intrinseci), rezultând o formă cu două lanțuri polipeptidice și denumită  $\alpha\text{VIIa}$  sau VIIa. Această formă are o afinitate ridicată față de factorul tisular, complexul format fiind de zeci de ori mai activ în procesul de coagulare decât complexul factor tisular-factor VII (cu un singur lanț polipeptidic). Formarea complexului factor tisular/VIIa la suprafața membranelor celulare determină mobilizarea factorului tisular din aparatul Golgi și expunerea sa pe suprafața celulelor. Acest proces depinde de activitatea proteazică a factorului VIIa și este un mecanism important de modulare a răspunsului la injuria vasculară, prin expunerea factorului tisular doar când și unde este necesar.

**Factorul IX** (*factorul Christmas*) este o glicoproteină cu masă moleculară de 55 400 D.

Activarea lui se produce de către factorul XIa, printr-un proces de proteoliză limitată. De asemenea, factorul IX poate fi activat și de către factorul VII legat de factorul tisular (conexiune între calea intrinsecă și cea extrinsecă, denumită calea extrinsecă alternativă). Prin intermediul punților de calciu, factorul IXa formează la nivelul suprafețelor fosfolipidice complexe cu factorul VIII și cu factorul X, pe care îl activează.

**Factorul X** (*factorul Stuart-Prower*) este o glicoproteină cu masa moleculară de 56000 D. Activarea sa se realizează prin proteoliză limitată și este produsă fie prin acțiunea factorului IXa (cuplat într-un complex cu factorul VIII), fie prin acțiunea complexului factor VIIa-factor tisular. Factorul X se găsește astfel la punctul de interferență a căii intrinseci și a celei extrinseci. După activare, factorul X formează un complex cu factorul V, fosfolipidele și ionii de calciu (complexul protrombinazei), activând proteolitic protrombina pe care o transformă în trombină.

În afară de coagulare, factorul Xa intervine și în alte procese, fiind un activator al receptorilor activați de proteaze (PAR1 și PAR 2). Studii recente demonstrează că PAR-2 joacă un rol important în fibroză, remodelare tisulară și cancer, ceea ce sugerează că FXa este un mediator în interfața dintre coagulare și progresia fibrozei.

Pacienții hiperlipemici au nivele crescute ale factorului X, în timp ce la bolnavii cu insuficiență hepatică se înregistrează nivele scăzute ale acestui factor.

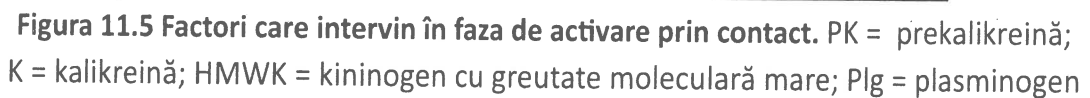
### 11.3.1.3 Factori care intervin în faza de activare prin contact

Factorii implicați în faza de activare prin contact sunt factorii XII, XI, prekalikreina și kininogenul cu greutate moleculară mare (HMWK). Primii trei sunt prezenți în plasmă ca precursori ai unor serin proteaze și se activează la contactul cu anumite suprafețe, iar HMWK are rolul unui cofactor. Suprafețele care declanșează activarea factorilor de contact sunt încărcate electronegativ. Printre acestea se numără sticla, caolinul, celita, acidul elagic, sulfatul de dextran. Au fost identificați și activatori biologici ai acestor factori, printre care ARNul extracelular provenit din celulele lezate sau necrotice, membrana plachetelor sangvine stimulate cu ADP, membrana bazală, colagenul, cristalele de urați, endotoxinele bacteriene.

Această etapă a coagulării este în relație și cu fibrinoliza; interacțiunea se reflectă în faptul că plasmă activează factorul XII, iar kininele rezultate sub acțiunea kalikreinei stimulează eliberarea de t-PA din endoteliile vasculare și transformă plasminogenul în plasmină. În plus, faza de activare prin contact intervine și în activarea sistemului renină-angiotensină, precum și în activarea complementului, fiind astfel o importantă verigă de legătură între coagulare, fibrinoliză și inflamație, aspecte reprezentate schematic în figura 11.5.

**Factorul XII** (*factor Hageman*) este un proteină cu masa de circa 80 000 Da, care prin regiunea NH<sub>2</sub>-terminală se leagă de suprafețele electronegative, în timp ce regiunea CO<sub>2</sub>-OH-terminală are activitate enzimatică. În activarea factorului XII intervin un proces de autoactivare spontană, precum și interacțiunea sa cu factorul XI și prekalikreina la nivelul suprafețelor. Cantitățile reduse de factor XIIa formate activează prekalikreina la kalikreină și factorul XI la factor XIa, care la rândul lor vor accelera activarea factorului XII. Factorul XII poate fi activat proteolitic și de plasmină sau tripsină.

**Factorul XI** circulează în plasmă sub forma complexelor cu HMWK. Structural, este un homodimer cu o greutate de circa 160 000 D. Sub acțiunea factorului XIIa, dar și a tripsinei, factorul XI este activat prin clivare proteolitică, rezultând două lanțuri ușoare, care conțin centrul activ, și două lanțuri grele prin care se leagă de HMWK. Factorul XIa determină activarea factorului IX pe calea intrinsecă.



**Kininogenul** cu greutate moleculară mare (HMWK, factorul Fitzgerald) este o  $\alpha_2$  globulină având masa moleculară de 120 000 D, care formează complexe necovalente cu factorii XII, XI și prekalikreina. HMWK favorizează legarea acestor complexe de suprafețele electronegative, și facilitează efectul activator al kalikreinei asupra factorului XII și cel al factorului XIIa asupra factorului XI. Acest efect se explică prin protejarea de către HMWK a factorilor amintiți față de acțiunea unor inhibitori de proteaze, în primul rând C1 INH.

**Factorul V** are o masă moleculară de 330 000 D și este sintetizat de ficat, dar și de megakariocite, celule endoteliale și celule musculare netede. Factorul V nu are activitate enzimatică, ci participă ca și cofactor la activarea protrombinei de către factorul Xa. Urmele de trombină

transformă factorul V într-o formă activată, FVa, care este capabil să se lege de fosfolipide și care accelerează activarea protrombinei. Mecanismele prin care se produce acest proces constau în inducerea unor modificări conformaționale ale moleculei de protrombină, facilitarea legării factorului Xa de suprafețele fosfolipidice și favorizarea formării complexului enzimă-substrat.

**Factorul Va** este degradat proteolitic de către proteina C activată. Prezența unei mutații punctiforme 1756A → G (Arg 506 → Gln), generează un factor V denumit factor V Leiden care este rezistent la inactivarea de către APC, menținându-și însă activitatea procoagulantă.

**Factorul VIII** este o glicoproteină cu masă moleculară de aproximativ 280 000 D, circulă în plasmă sub forma unui complex cu factorul von Willebrand, care îl transportă, îl stabilizează și îl protejează față de acțiunea proteazelor. La apariția unei leziuni vasculare, complexul factor von Willebrand – factor VIII se fixează de structurile subendoteliale, iar urmele de trombină generate pe cale extrinsecă activează factorul VIII (similar cu activarea factorului V). Factorul VIIIa formează complexe cu fosfolipidele, ionii de calciu, factorul IXa și factorul X.

Ca și factorul Va, **factorul VIIIa** este degradat proteolitic de către proteina C activată, fiind necesară și prezența factorului V, care aici joacă rolul unui cofactor anticoagulant.

Creșteri tranzitorii ale nivelului plasmatic ale complexului vWF – fVIII apar în cursul efortului fizic intens, a stimulării simpatoadrenergice și după administrarea de acid nicotinic și vasopresină.

Creșteri mai persistente au fost raportate în sarcină, în inflamații cronice, hipertiroidism, arteriopatii periferice, nefropatii, diabet zaharat cu retinopatie și neoplasme.

### 11.3.1.5 Fibrinogen, fibrină, factor XIII, fibronectină

**Fibrinogenul** este o proteină cu masa moleculară de 340 000 D. Este un dimer, fiind alcătuit din două unități identice, legate prin punți disulfidice. Fiecare unitate la rândul ei este formată din trei lanțuri numite A $\alpha$ , B $\beta$  și  $\gamma$ , astfel încât structura sa ar putea fi exprimată ca A $\alpha$ <sub>2</sub>B $\beta$ <sub>2</sub> $\gamma$ <sub>2</sub>.

Fibrinogenul este sintetizat în ficat, dar se găsește și în granulele  $\alpha$  ale plăcuțelor, concentrația sa plasmatică fiind de 200-400 mg/dl. Sinteza sa hepatică este stimulată de producția de degradare a fibrinogenului și fibrinei, care acționează indirect, prin stimularea macrofagelor care produc citokine (IL-1, IL-6, TNF  $\alpha$ ). Aceste citokine induc sinteza hepatică a fibrinogenului alături de alte proteine de fază acută, ceea ce explică creșterea nivelului plasmatic de fibrinogen în acest context patologic. Scăderea cantității de fibrinogen se întâlnește în faza inițială a declanșării CID, în hepatopatiile aflate în stadiu terminal și în deficitul genetic (situație rară).

Au fost descrise o serie de anomalii structurale ale fibrinogenului (disfibrinogenemii). Acestea se pot traduce prin polimerizarea modificată a fibrinogenului, care produce o fibrină rigidă, rezistentă la acțiunea plasminei (fibrinogen Chapell Hill III), prin eliberarea defectuoasă a peptidelor (fibrinogen Baltimore) sau printr-un mod particular de reacție al rețelei de fibrină cu factorul XIII, care o face rezistentă la fibrinoliză (fibrinogen Marburg).

Transformarea fibrinogenului în fibrină decurge în mai multe etape. Într-o primă fază, trombina desprinde două fragmente peptidice numite fibrinopeptid A (FpA) din lanțurile A $\alpha$ ,

proces care duce la formarea monomerilor de fibrină I. Ulterior trombina clivează și câte un fragment denumit fibrinopeptid B (Fp B) din lanțurile B $\beta$ , rezultând monomerii de fibrină II. Îndepărtarea FpA se produce mult mai rapid decât cea a FpB și este esențială pentru polimerizarea monomerilor, fapt demonstrat de acțiunea unor proteaze din veninul de șarpe (reptilază), care produc coagularea fibrinogenului deși îndepărtează doar FpA. Monomerii de fibrină rezultați agregă spontan și polimerizează termino terminal, formând filamente de fibrină. Fibrina formată în această etapă poate fi depolimerizată de agenți denaturanți cum sunt ureea și acidul monocloracetic, și este susceptibilă la acțiunea proteolitică a plasminei. Într-o etapă ulterioară, aceste filamente de fibrină vor fi legate și consolidate prin legături transversale, sub acțiunea factorului XIII stabilizator al fibrinei.

Prođuii rezultați în cursul coagulării fibrinogenului, reprezentați de FpA, FpB și monomerii solubili de fibrină I pot fi detectați în sânge prin metode imunochimice și constituie markeri ai activării coagulării in vivo.

FpA are valori ridicate la pacienți cu infarct miocardic, angină pectorală instabilă și arteriopatii periferice.

**Factorul XIII stabilizator al fibrinei** este o proteină cu masa moleculară de 320 000 D, fiind format din două subunități A și două subunități B. Atât factorul XIII A cât și factorul XIII B se găsesc sub formă dimerică (A<sub>2</sub>, respectiv B<sub>2</sub>), iar factorul XIII plasmatic constă din asocierea acestor subunități (f XIII A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>).

Subunitatea B a factorului XIII este sintetizată în hepatocite, iar sinteza subunității A are loc în mai multe tipuri de celule, între care un loc principal îl ocupă monocitele și megakariocitele (găsindu-se deci și în plachetele sangvine). Subunitatea B asigură stabilitatea în plasmă a subunității A, dar intervine și în apărarea antiinfecțioasă, prin favorizarea opsonizării bacteriene.

Activarea factorului XIII aflat în circulație sub formă inactivă, de zimogen, se produce sub acțiunea trombinei printr-o proteoliză limitată. Activarea decurge în două etape succesive, constând în clivarea unui fragment peptidic din subunitățile A și apoi în disocierea subunităților A și B, în urma cărora subunitățile A dobândesc o configurație activă, prin demascarea cisteinei din centrul activ al moleculei (F XIIIa\*). Procesul de activare a FXIII sub acțiunea trombinei este stimulat de monomerii de fibrină care se formează din fibrinogen sub acțiunea trombinei. Prin polimerizarea acestor monomeri, ei formează un complex cu factorul XIII, care devine mai susceptibil la acțiunea trombinei.

Ca mod de acțiune, FXIII este o transglutaminază care în prezența ionilor de calciu consolidează rețeaua de fibrină prin stabilirea unor legături covalente transversale între resturi de glutamină și lizină din monomeri diferiți. De asemenea, sub acțiunea factorului XIII se încorporează în rețeaua de fibrină  $\alpha_2$  antiplasmina, un inhibitor al plasminei. Aceste acțiuni conferă fibrinei calități mecanice superioare (cheag mai ferm, mai dens și mai elastic) și un oarecare grad de rezistență la fibrinoliză.

Factorul XIII acționează și asupra altor substrate, printre care fibronectina, o proteină de adeziune pe care o leagă de rețeaua de fibrină și de collagen. Acest efect are importanță în

procesul de vindecare a plăgilor, având însă și un potențial aterogen prin încorporarea microtrombilor în peretele vascular. De asemenea, FXIII poate acționa și asupra vitronectinei, o altă proteină de adeziune, precum și asupra lipoproteinei (a) Lp(a), o proteină circulantă deosebit de aterogenă, care prin acest mecanism se va fixa la nivelul depozitelor intravasculare de fibrină, contribuind la procesul de aterogeneză.

În afară de rolul pe care îl joacă în hemostază, factorul XIII contribuie și la procesul de vindecare a plăgilor, prin modularea interacțiunilor dintre fibrină, fibronectină, vitronectină și matricea țesutului conjunctiv. Interacțiunea acestor componente favorizează migrarea fibroblastelor prin gelul de fibrină și implicit formarea țesutului conjunctiv. Prin intervenția FXIII în remodelarea matricii extracelulare acesta intervine în progresia proceselor de fibroză, precum și în progresia tumorală.

Factorul XIII intervine și în procesele de nidare a ovulului fecundat, rol sugerat de incapacitatea femeilor cu deficit homozigot de factor XIII de a duce la termen sarcina.

O funcție mai recent descrisă a FXIII este legată de intervenția sa în apărarea antiinfecțioasă. S-a demonstrat că subunitatea B a FXIII se leagă de proteina A a stafilococului aureus (SpA). Această proteină împiedică recunoașterea și fagocitarea bacteriilor de către macrofage, iar legarea ei de FXIII îi anihilează aceste efecte. Astfel, FXIII promovează opsonizarea bacteriană și fagocitoza.

**Fibronectina (FN)** face parte din grupul proteinelor de adeziune, alături de fibrinogen, factor von Willebrand, vitronectină și trombospondină. Aceste proteine au ca element comun prezența în structura lor primară a unui tripeptid Arg-Gly-Asp, care este recunoscut de receptori celulari specifici, denumiți integrine. Fibronectina este sintetizată de hepatocite, de celulele endoteliale, fibroblaste și macrofage. Ea este prezentă în matricea substanței fundamentale a țesutului conjunctiv, unde se leagă de fibrele de collagen. Există și o formă solubilă, circulantă a fibronectinei. Sub acțiunea factorului XIII, fibrina se leagă de fibronectină, și prin intermediul acesteia, de collagen, ceea ce asigură procesul de reparare tisulară dar favorizează și încorporarea microtrombilor în peretele arterial, contribuind la aterogeneză.

În afară de hemostază, prin acțiunea sa opsonizantă fibronectina intervine și în procesele de fagocitoză a germenilor microbieni și a detritusurilor celulare.

Nivele scăzute de fibronectină au fost semnalate după intervenții chirurgicale ample, traumatisme, arsuri extinse și în CID, mecanismele fiind complexe (consum în microtrombi, antrenarea FN în zonele lezate în vederea reparării tisulare, scăderea sintezei hepatice). Creșteri ale fibronectinei au fost descrise la obezi, la subiecți cu hiperlipoproteinemie tip IIb și IV și la pacienți cu sindrom nefrotic, explicația fiind accelerarea sintezei de proteine în ficat.

### 11.3.2 Explorarea coagulării

Corectitudinea rezultatelor testelor de coagulare depinde de respectarea unor reguli legate de recoltarea probelor. Astfel, garoul trebuie menținut un timp cât mai scurt posibil, recoltarea se va face în tuburi de plastic sau sticlă siliconată (pentru a evita activarea factorilor de contact), cu respectarea proporției corecte între sânge și anticoagulant, iar proba se va trimite la laborator în interval de maximum 2 ore (respectiv 1 oră la pacienții tratați cu heparină).

### 11.3.2.1 Timpul Quick (TQ, timpul de protrombină PT)

Reprezintă timpul de coagulare al plasmei după adăugarea de tromboplastină celulară și calciu. Acest test explorează calea extrinsecă a coagulării, depinzând deci de factorii VII, V, X și II. Exprimarea timpului de protrombină se face:

- în secunde
- ca procent față de o plasmă martor (indice de protrombină, IP), ale cărui valori normale sunt 80–120%
- ca INR (*International Normalized Ratio*) care reprezintă  $(TQ_{bolnav}/TQ_{martor})^{ISI}$ , unde ISI (*International Sensitivity Index*) reprezintă o caracteristică a tromboplastinei utilizate. Acest mod de exprimare este de preferat, deoarece înlătură diferențele date de folosirea diferitelor tipuri de tromboplastină și permite o bună monitorizare a pacienților tratați cu antivitamine K (AVK.)

Timpul de protrombină este prelungit în tratamentul cu AVK, în insuficiența hepatică, în caz de existență a unor anticoagulanți circulanți dirijați împotriva factorilor investigați, sau în caz de deficit genetic al factorilor implicați.

### 11.3.2.2 Testul Owren

Se practică utilizând plasmă diluată de 10 ori, la care se adaugă fibrinogen și factor V (Normotest) sau fibrinogen, factor V și factor VIII (Thrombotest), urmat de adăugarea de tromboplastină calcică. Semnificația exploratorie este aceeași ca și a timpului Quick, testul fiind însă mai sensibil la modificările factorilor II, VII și X care apar în cursul terapiei cu AVK. Acest test nu se utilizează în practica de rutină.

O variantă a timpului Quick este testul EXCA (*Extrinsic Coagulation Activity Assay*), un test cromogenic global, care constă în incubarea plasmei cu tromboplastină calcică, urmată de oprirea generării trombinei, urmată de o etapă de detecție a trombinei cu ajutorul unui substrat cromogen. Testul se utilizează la pacienții tratați cu anticoagulante dirijate împotriva factorului Xa (heparine fracționate) sau trombinei (Hirudin).

### 11.3.2.3 Testul Stypven

Testul Stypven este un test în care sub acțiunea veninului de *Vipera Russellii* se inițiază coagularea direct prin activarea factorului X în prezența de fosfolipide. Acest test va fi prelungit în deficitele factorilor V, X, II sau fibrinogen și normal în deficitul izolat de factor VII.

### 11.3.2.4 Timpul de tromboplastină parțial activată (APTT)

Acest test explorează calea intrinsecă și comună și constă în incubarea plasmei cu un reactiv care conține fosfolipide (cefalină) și un activator al factorilor de contact (caolin, acid elagic), măsurându-se timpul de apariție a cheagului după adăugarea de  $CaCl_2$ . Valoarea se exprimă în raport cu o plasmă martor și variază în funcție de reactivii folosiți, fiind de ordinul a 25-50 de secunde. Raportul între APTT la pacient și la martor trebuie să fie sub 1,2. APTT este prelungit în tratamentul cu heparine nefracționate, în deficitele factorilor de pe calea intrinsecă și comună (cele mai frecvente fiind deficitele de factor VIII și factor IX), sau în cazul existenței unor anticoagulanți circulanți sau anticorpi antifosfolipide.

Un test recent care explorează global calea intrinsecă este INCA (*Intrinsic Coagulation Activity Assay*), constând în incubarea plasmei cu particule de  $\text{SiO}_2$  și  $\text{CaCl}_2$ . După stoparea reacției se măsoară activitatea trombinei cu ajutorul unui substrat cromogen.

#### 11.3.2.5 Timpul de trombină(TT)

Explorează etapa fibrinoformării și reprezintă timpul de coagulare al plasmei la care s-a adăugat trombină. Valoarea normală este de 18-20 de secunde. Prelungirea timpului de trombină apare la pacienții tratați cu heparină, în cazul prezenței produșilor de degradare a fibrinei, în caz de hipofibrinogenemii sub 50 mg/dl sau disfibrinogenemii.

#### 11.3.2.6 Timpul de reptilază

Este o variantă a timpului de trombină în care trombina (sensibilă la acțiunea heparinei) este înlocuită cu reptilază, o enzimă sensibilă doar la prezența produșilor de degradare a fibrinei.

#### 11.3.2.7 Testul de generare a trombinei (*Thrombin Generation Assay*)

Este un test global de evaluare a coagulării, în care potențialul coagulant al plasmei se evaluează prin rata formării trombinei. Aceasta este cuantificată prin degradarea unui substrat cromogen sau marcat fluorescent al trombinei, după incubarea plasmei în prezență de factor tisular, fosfolipide și calciu. Curba de generare a trombinei este caracterizată de o fază de latență (lag) urmată de formarea și apoi inhibarea trombinei, iar testul reflectă faza de inițiere, propagare și terminare a coagulării.

#### 11.3.2.8 Dozarea fibrinogenului

Dozarea fibrinogenului se face în mod uzual prin evaluarea timpului de coagulare a plasmei (dependentă de cantitatea de fibrinogen) sub acțiunea trombinei. Există și alte metode de dozare, acestea fiind gravimetrice, turbidimetrice sau imunologice.

#### 11.3.2.9 Teste specifice pentru factorii coagulării

**Dozarea factorului XIII** se face prin dozarea  $\text{NH}_3$  eliberat prin acțiunea f XIII (transglutaminază), sau urmărind fluorometric capacitatea factorului XIII de a încorpora o amină fluorescentă în caseină.

**Ceilați factori ai coagulării** se pot doza individual (în general la pacienții suspecți de deficite izolate ale unuia dintre factori) prin utilizarea unor plasme substrat lipsite de factorul respectiv. Prin amestecarea plasmei deficitare în factorul de dozat cu plasma de pacient (suspectat de deficit) și efectuarea din acest amestec a PT sau APTT (în funcție de poziția factorului de dozat în cascada coagulării) se urmărește în ce măsură plasma de pacient corectează plasma substrat deficitară. Cu cât deficitul la pacient este mai sever, cu atât corectarea plasmei substrat va fi mai slabă. Gradul de corectare se compară cu cel al unor diluții de plasmă martor.

### 11.3.3 PATOLOGIA COAGULĂRII

#### 11.3.3.1 Anomalii cu caracter dobândit

În numeroase afecțiuni apar modificări ale nivelului plasmatic al diferiților factori ai coagulării, de obicei acestea fiind însoțite și de modificări ale sistemului fibrinolitic și uneori de anomalii cantitative sau funcționale plachetare. Din aceste considerente am socotit mai oportun să prezentăm aceste modificări dobândite ale hemostazei într-un subcapitol separat.

#### 11.3.3.2 Anomalii cu caracter genetic

Aceste deficite sunt relativ rare, de exemplu hemofilia A apare cu o frecvență de 1: 50000, iar hemofilia B cu o frecvență de 1: 30 000, celelalte anomalii fiind mult mai rar întâlnite. Chiar dacă sunt puțin frecvente, aceste anomalii au adus o contribuție importantă la înțelegerea rolului jucat de diferiții factori ai coagulării în procesul de hemostază.

##### Deficitul de factor VIII (hemofilia A)

Este cea mai frecventă anomalie genetică a coagulării și se transmite legat de cromozomul X, pe care se află localizată gena pentru factor VIII. Există mai multe mutații care produc hemofilia, dintre care formarea unor molecule incomplete de FVIII prin intervenția unui codon stop, sau anomalii funcționale ale FVIII, care însă este prezent ca antigen.

Manifestările clinice depind de severitatea deficitului. În deficitele severe apar hemartroze, hematoame subcutanate, intramusculare, sângerări după traumatisme minime sau intervenții chirurgicale minore și epistaxis.

Diagnosticul de laborator se bazează pe prelungirea APTT neînsoțită de modificări ale altor teste de coagulare, precum și pe determinarea activității factorului VIII. Principala problemă de diagnostic diferențial o constituie boala von Willebrand (tip I), în care pe lângă prelungirea APTT se constată și un timp de sângerare prelungit, iar nivelul factorului von Willebrand este scăzut. Diagnosticul poate fi completat de investigații de biologie moleculară, care sunt utile mai ales pentru detectarea femeilor purtătoare.

##### Deficitul de factor IX (hemofilia B)

Este de 5-10 ori mai puțin frecventă decât hemofilia A și este cauzată de un deficit de factor IX. Ca și la hemofilia A, gena responsabilă este localizată pe cromozomul X, iar anomalia se datorează fie unui deficit cantitativ de sinteză, fie sintezei unor molecule nefuncționale de factor IX.

Manifestările clinice sunt asemănătoare cu cele din hemofilia A, însă formele severe sunt mult mai rare.

##### Afibrinogenemia, disfibrinogenemiile

**Afibrinogenemia** este o anomalie rară (1:1 milion locuitori) cu transmitere autosomal recesivă. Manifestările clinice la homozigoți constau în hemoragii din cordonul ombilical, epistaxis, gingivoragii, menoragii, hematoame, sângerări prelungite din plăgi și întârzieri în procesul de cicatrizare (datorită absenței fibrinei). În deficitele severe, examinările de laborator relevă o

absență a fibrinogenului, iar sângele este practic incoagulabil, fiind prelungiți și PT, APTT și timpul de trombină. De asemenea lipsa fibrinogenului diminuează agregabilitatea plachetară, iar timpul de sângerare este prelungit.

**Disfibrinogenemiile** reprezintă anomalii calitative ale moleculei de fibrinogen, fiind descrise până acum circa 37 de asemenea mutații, unele dintre ele putând fi clinic silențioase. Unele dintre aceste anomalii evoluează cu manifestări hemoragice (sângerări prelungite după intervenții chirurgicale, menoragii, sângerări din placentă în timpul sarcinii) și cu vindecarea întârziată a plăgilor. Există și unele disfibrinogenemii caracterizate prin tendința la tromboză. În aceste cazuri se descriu anomalii de polimerizare, anomalii de legare/activare a plasminogenului, legare defectuoasă a fibrinei de trombină (trombina nelegată ducând la amplificarea coagulării și activare plachetară crescută).

Examinările de laborator evidențiază o discordanță între timpul de trombină care este foarte prelungit și PT și APTT, care sunt normale. În cazurile cu deficit sever și aceste teste sunt prelungite.

**Deficitul de protrombină** este anomalia cel mai rar întâlnită. Manifestările hemoragice constau în sângerări din cordonul ombilical, hemoragii ale mucoaselor și din plăgi cu ocazia intervențiilor chirurgicale. Testele de laborator arată o prelungire a timpului de protrombină și a APTT.

**Deficitul de factor V** se traduce prin prelungirea timpului de trombină și a APTT, diagnosticul de certitudine fiind dat de incapacitatea plasmei de pacient de a corecta coagulabilitatea unei plasme lipsite de factor V. Manifestările hemoragice nu sunt deosebit de exprimate în cazul acestei anomalii.

**Deficitul de factor VII** se manifestă printr-un sindrom hemoragic moderat ca severitate, iar testele de laborator evidențiază prelungirea timpului de protrombină, APTT și timpul de trombină fiind nemodificați. Confirmarea deficitului se face prin demonstrarea lipsei de corectare a coagulabilității unei plasme lipsite de factorul VII.

**Deficitul de factor X** este rar întâlnit (similar cu cel de protrombină) și se traduce prin prelungirea PT și APTT. Caracteristică este prelungirea importantă a testului Stypven, iar dozarea se face utilizând plasmă deficitară în factor X.

**Deficitul de factor XI** evoluează cu un sindrom hemoragic relativ blând, iar testele de laborator arată o prelungire a APTT în timp ce PT este normal. Precizarea diagnosticului se face cu ajutorul plasmei lipsite de factor XI.

**Deficitul de factor XII** este o anomalie care interesează etapa inițială a activării prin contact și care din punct de vedere al testelor de laborator se manifestă prin prelungirea APTT. Diagnosticul de certitudine se pune utilizând o plasmă deficitară în factor XII. Acești subiecți nu prezintă sindrom hemoragic, ci, dimpotrivă, uneori pot avea manifestări trombotice. Aceasta s-ar putea explica prin contribuția pe care o are factorul XII ca activator al fibrinolizei, deficitul său ducând la o fibrinoliză mai încetinită.

**Deficitul de factor XIII** are drept consecință formarea unei rețele de fibrină mai laxă, cu calități mecanice mai precare și mai susceptibilă la fibrinoliză. Clinic apar manifestări he-

moragice destul de importante. Acestea constau în hematoame cutanate, intramusculare, cerebrale, hemartroze, hemoragii intraperitoneale la femei. Pacienții mai prezintă o vindecare întârziată a plăgilor, iar femeile pot prezenta avorturi spontane repetate. Bărbații cu deficit homozigot pot prezenta oligospermie sau azoospermie.

## 11.4 MECANISME ANTICOAGULANTE FIZIOLOGICE

Limitarea formării de trombi la regiunea unde s-a produs o leziune vasculară este realizată printr-o multitudine de mecanisme care previn extinderea depozitelor fibrinoplachetare. Acestea sunt reprezentate de proprietățile antitrombotice ale endoteliilor intacte, de efectul de îndepărtare a factorilor activați ai coagulării de către torentul circulator, de intervenția sistemului fibrinolitic precum și de existența unor mecanisme anticoagulante specifice. Deficitele genetice sau dobândite ale acestor mecanisme anticoagulante predispun la apariția trombozelor.

### 11.4.1 ANTITROMBINA III (AT III)

Este o  $\alpha_2$  glicoproteină plasmatică sintetizată de ficat și de endoteliile vasculare. AT III face parte din familia inhibitorilor de serinproteaze (superfamilia SERPIN), alături de  $\alpha_1$  antitripsină,  $\alpha_2$  macroglobulină,  $\alpha_2$  antiplasmină, PAI și C1 inhibitor. Acțiunea inhibitorie a AT III se exercită în principal asupra trombinei, dar și a factorilor Xa și IXa. Într-o mult mai mică măsură AT III inhibă acțiunea factorilor XIIa și XIa, kalikreina și plasmina (Figura 11.6).

Activitatea antitrombinei este accelerată de aproximativ 1000 de ori în prezența heparinei, respectiv a heparansulfatului endotelial, datorită unor modificări conformaționale induse moleculei de AT III de către aceste substanțe care îi cresc afinitatea față de serinproteaze.

Metodele de explorare în laborator a AT III sunt fie metode imunologice (acestea detectează antigenul AT III dar nu furnizează informații despre funcția acesteia) și metode funcționale, bazate pe proprietatea AT III de a inhiba trombina, acestea putând fi efectuate în prezența sau în absența heparinei.

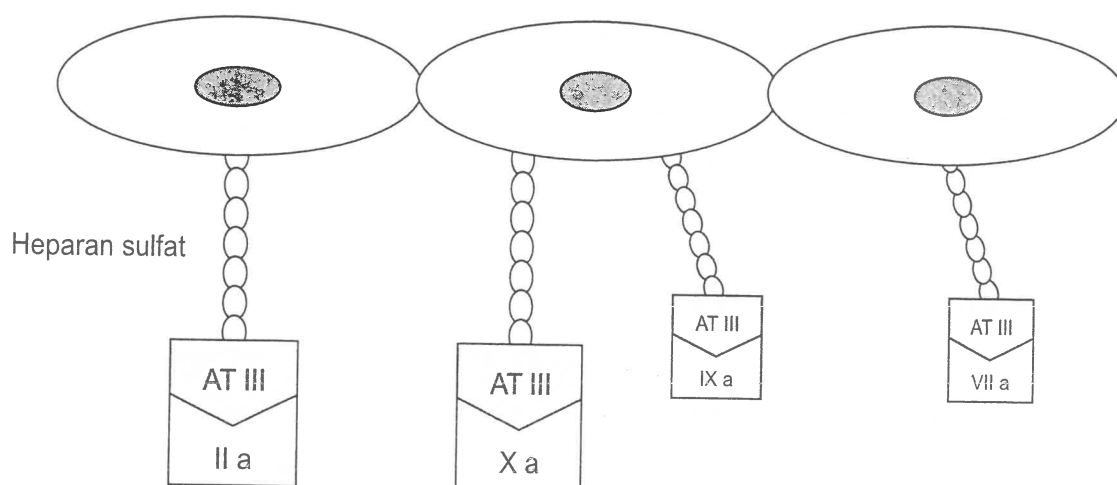


Figura 11.6 Mecanismul de acțiune al antitrombinei III

Deficitele genetice de antitrombină III se transmit autosomal dominant cu penetranță variabilă, deficitele apărând la 1:2000-5000 indivizi. Până la 50% din indivizii cu deficit de AT vor suferi tromboze venoase în cursul vieții. Trombozele apar adesea în legătură cu sarcina, avortul, nașterea, consumul de contraceptive orale, intervenții chirurgicale, supraponderea.

Există două tipuri majore ale deficitului genetic de AT III:

**Tipul I** – cantitativ se caracterizează prin scăderea simultană a antigenului și a funcției și se datorează sintezei deficitare a unor molecule normale de AT III. Deficitul homozigot de tip I este incompatibil cu viața.

**Tipul II** – calitativ, se caracterizează prin nivele normale ale antigenului și reducerea activității AT III și se datorează unor mutații punctiforme care perturbă funcția moleculei de AT III. O sistematizare a acestor disfuncții moleculare le clasifică în:

**Tipul II RS** (*Reactive Site*) în care mutațiile interesează situsul prin care AT III se leagă de trombină

**Tipul II HBS** (*Heparin Binding Site*) caracterizat prin perturbarea legării antitrombinei de heparină. Plasma acestor pacienți inhibă lent trombina și factorul Xa dar nu își accelerează efectul în prezența heparinei.

**Tipul II PE** (*Pleiotropic Effects*) în care mutațiile exercită efecte multiple (pleiotrope) atât asupra situsului reactiv cât și asupra situsului de legare al heparinei. În unele cazuri mutațiile generează o moleculă de antitrombină susceptibilă la o degradare precoce în circulație, rezultând astfel o scădere atât a antigenului cât și a funcției (ceea ce pune probleme de diagnostic diferențial cu deficitul cantitativ de tip I; elucidarea se face prin tehnici de biologie moleculară).

Deficite dobândite ale antitrombinei III apar în ciroza hepatică (prin sinteza deficitară), în sindromul nefrotic și enteropatia exudativă (datorită pierderilor renale, respectiv intestinale) și în CID (prin consum). Creșteri ale nivelelor de AT III se înregistrează în cadrul reacției de fază acută.

#### 11.4.2 COFACTORUL II AL HEPARINEI (HC II)

HC II este un inhibitor de serin proteaze care are o structură similară antitrombinei. Efectul său inhibitor se exercită însă doar asupra trombinei, iar acțiunea sa anticoagulantă este potențată de heparină și de legarea de dermatansulfatul endotelial.

Deficitul genetic de HC II este asociat cu apariția evenimentelor trombotice, având o pondere redusă (0,6%) din cauzele genetice de tromboze venoase. Prevalența similară a deficitului la subiecți cu tromboze repetitive și la subiecți sănătoși pune problema dacă deficitul de HC II este în sine un factor de risc important pentru tromboză.

Deficite dobândite la HC II s-au înregistrat la pacienții cu coagulare intravasculară diseminată și la cei cu insuficiență hepatică.

#### 11.4.3 INHIBITORUL CĂII MEDIATE DE FACTORUL TISULAR (TFPI) SAU INHIBITORUL CĂII EXTRINSECI (EPI)

TFPI este sintetizat de endoteliile vasculare, de care rămâne fixat prin intermediul unor glucozaminoglicani. TFPI devine activ doar după inițierea coagulării, respectiv după generarea

factorului Xa. Acesta odată format se leagă de TFPI, iar acest complex inhibă complexul format de factorul VIIa cu factorul tisular (Figura 11.7). Cu alte cuvinte, coagularea extrinsecă se autolimitează prin intermediul acestui mecanism.

#### 11.4.4 PROTEINA Z (PZ) ȘI INHIBITORUL PROTEINEI Z (PZI)

Proteina Z este o glicoproteină plasmatică dependentă de vitamina K, care în prezența fosfolipidelor și a ionilor de calciu formează un complex cu factorul Xa, servind drept cofactor pentru inactivarea rapidă a factorului Xa de către inhibitorul proteinei Z, un inhibitor de proteaze.

Studii experimentale și cercetări clinice sugerează o asociere între deficitul de proteină Z și creșterea riscului trombotic la unele categorii de pacienți (pacienți tineri cu accidente vasculare cerebrale care nu au alți factori de risc pentru ateroscleroză și pacienți cu tromboembolism venos cu mutație Leiden a factorului V). Deficitul de proteină Z a fost descris la pacienți cu accidente vasculare cerebrale, sindroame coronariene acute, la gravide cu evoluție nefavorabilă a sarcinii și în sindromul nefrotic.

Un aspect cu importanță practică este reprezentat de tratamentul cu anticoagulate orale, care interferează cu acțiunea vitaminei K, generând formarea unor proteine nefuncționale (PIVKA). În cazul deficitului de PZ, ca și al celui de proteină C, tratamentul cu antivitamine K poate genera apariția unui dezechilibru între potențialul procoagulant și anticoagulant, soldat cu apariția microtrombozelor venoase ale vaselor dermului și necroza hemoragică a pielii.

#### 11.4.5 SISTEMUL PROTEINEI C

Este un mecanism anticoagulant important, care intervine prin degradarea factorilor Va și VIIIa și este format din proteina C, cofactorul ei proteina S, trombomodulina și receptorul endotelial al proteinei C (EPCR).

**Proteina C** este o serinprotează dependentă de vitamina K sintetizată în ficat, sub formă de zimogen. PC este activată de către trombina legată de o glicoproteină endotelială numită

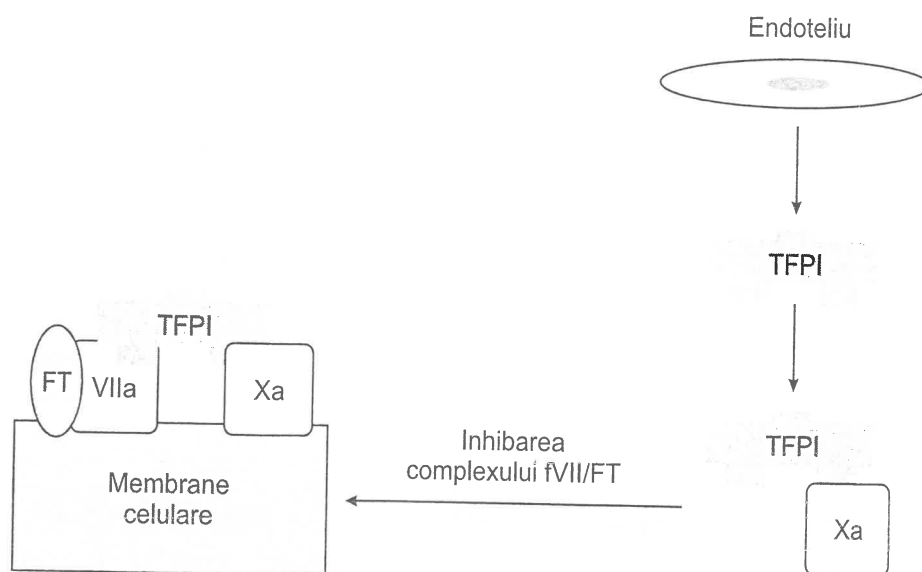


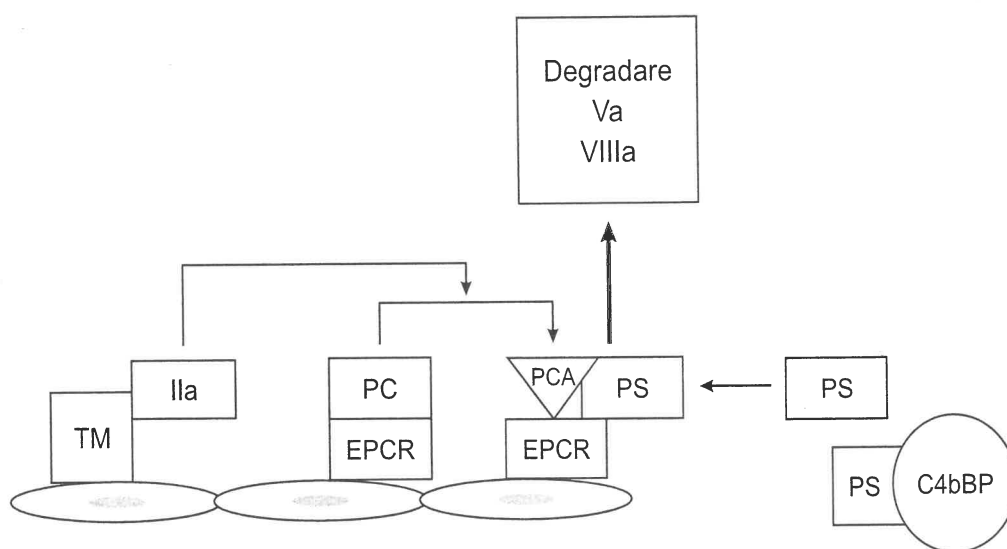
Figura 11.7 Mecanismul de acțiune al TFPI

**trombomodulină. Receptorul endotelial al proteinei C (EPCR)** este o proteină transmembranară care leagă atât proteina C cât și proteina C activată (APC) și care reglează acest sistem anticoagulant prin accelerarea activării proteinei C de către complexul trombină-trombomodulină. A fost identificată și o formă circulantă solubilă a EPCR (s-EPCR) a cărei legare de APC blochează interacțiunea cu fosfolipidele și inhibă centrul activ al APC, perturbând astfel acțiunea APC asupra factorului Va.

**Proteina S**, de asemenea dependentă de vitamina K este sintetizată de ficat dar și de plachetele sangvine și de endotelii. Rolul său de cofactor al proteinei C se exercită prin formarea unor complexe între proteina C activată și suprafețele fosfolipidice electronegative. Aproximativ 40% din PS circulă în plasmă sub formă liberă și intervine în procesul amintit mai sus, restul de 60% circulă legată de o proteină care transportă și fracțiunea C4b a complementului, denumită C4b-BP și este nefuncțională din punct de vedere al acțiunii de cofactor anticoagulant.

Proteina C odată activată, în prezența cofactorului ei proteina S și a ionilor de calciu degradează proteolitic factorii VIIIa și Va ai coagulării, la nivelul suprafețelor fosfolipidice, exercitând astfel un efect anticoagulant (Figura 11.8). Degradarea factorului VIIIa de către APC necesită și prezența factorului V intact, care în această situație are un rol de cofactor anticoagulant. PC activată are și o acțiune profibrinolitice prin neutralizarea efectului inhibitor al PAI. Cele două tipuri de efecte fac din acest sistem un important mecanism antitrombotic.

În afară de proprietățile sale anticoagulante și profibrinolitice, proteina C activată are și efecte antiinflamatorii și antiapoptotice, care se manifestă atunci când proteina C activată se leagă de EPCR și clivează proteolitic un receptor denumit receptor activat de proteaze 1 (PAR-1).



**Figura 11.8 Sistemul proteinei C.** PC = proteina C; PCA = proteina C activată; PS = proteina S; EPCR= receptorul endotelial al proteinei C; TM= trombomodulină; C4bBP = proteina care leagă fracțiunea C4b a complementului

Dozarea proteinei C se poate face ca antigen (prin teste ELISA) sau prin teste funcționale coagulometrice sau amidolitice. Testele ELISA pentru dozarea proteinei S pot detecta fie nivelul total de PS, fie doar fracțiunea ei liberă care intervine ca și cofactor al PC. PS poate fi dozată și funcțional prin metode coagulometrice.

Deficitele genetice de PC și PS reprezintă o cauză importantă de tromboze venoase (survenind la 1: 200-500 de indivizi pentru deficitul de PC și 1:500 pentru cel al PS), apariția acestora având aceiași factori precipitanți enumerați în cazul deficitului de AT III. Pacienții cu deficite genetice de PC sau PS au un risc de a dezvolta tromboze venoase de 2-11 ori mai mare decât cei fără aceste deficite.

Deficitul de proteină C de tip I constă în reducerea concomitentă a antigenului și a activității iar cel de tip II se caracterizează prin scăderea activității, nivelul antigenului fiind normal. Mutațiile afectând PC pot interesa centrul activ, pot perturba interacțiunea PC cu cofactorul ei PS sau legarea PC de EPCR. A fost descris și un deficit al receptorului endotelial pentru proteina C (EPCR), care se soldează cu incapacitatea de generare a proteinei C activate și cu predispoziție la tromboze.

Un aspect important pentru practică este tratamentul intempestiv cu anticoagulate orale la pacienți cu deficit heterozigot de proteină C, care poate produce necroza hemoragică a pielii prin tromboza vaselor dermului. Fenomenul se explică prin scăderea rapidă ( $T/2$  6-8 ore) a formelor funcționale, activabile ale PC, în raport cu factorii coagulării dependenți de vitamina K, care scad mai lent (în special protrombina cu  $T/2$  de 60 de ore).

Se descriu 3 tipuri de deficit de proteină S. Tipul 1 se caracterizează prin nivele reduse ale antigenului și activității PS. În tipul 2 nivelul antigenului este normal, în timp ce activitatea este scăzută. În tipul 3 proteina S totală are nivele normale, dar proteina S liberă este redusă, datorită unei mutații care crește afinitatea și legarea proteinei S de C4b BP.

Deficitul homozigot de proteină S este asociat cu purpura fulminans neonatală.

O anomalie vasculară constând în îngustarea progresivă a arterelor cerebrale și denumită sindromul moyamoya a fost asociată cu deficitul genetic combinat al proteinelor C și S.

Deficite cu caracter dobândit ale PC și PS se descriu în legătură cu scăderea sintezei (insuficiență hepatică) sau cu consumul crescut în CID.

De menționat că în sindromul nefrotic proteina C nu se pierde, ci are chiar nivele plasmatice crescute, datorită încărcăturii ei electronegative care face să fie respinsă la nivelul capsulei Bowmann. PS are nivele antigenice totale crescute (prin același mecanism), având însă o funcționalitate redusă, probabil prin creșterea procentului de PS legată de C4b BP și diminuarea fracțiunii libere.

**Rezistența la proteina C activată (APC). Factorul V Leiden.** Defectul molecular responsabil de această anomalie este o mutație punctiformă a factorului V, 1756A → G (Arg 506 → Gln), care face ca acesta să își păstreze activitatea procoagulantă, fiind însă rezistent la inactivarea de către APC. Rezistența la APC se produce atât prin pierderea unui situs de inactivare de către factorul Va, cât și prin pierderea activității de cofactor a factorului V în procesul de inactivare a factorului VIII de către APC.

Ca semnificație clinică, rezistența la APC este socotită drept una din cele mai frecvente cauze de tromboze ereditare. Anomalia are o penetranță incompletă, în funcție de factorii de mediu și de influența altor gene, fapt sugerat de exprimarea fenotipică diversă a mutației (există homozigoți asimptomatici și heterozigoți cu manifestări clinice). Prevalența mutației este mai mare în Europa comparativ cu alte regiuni ale lumii.

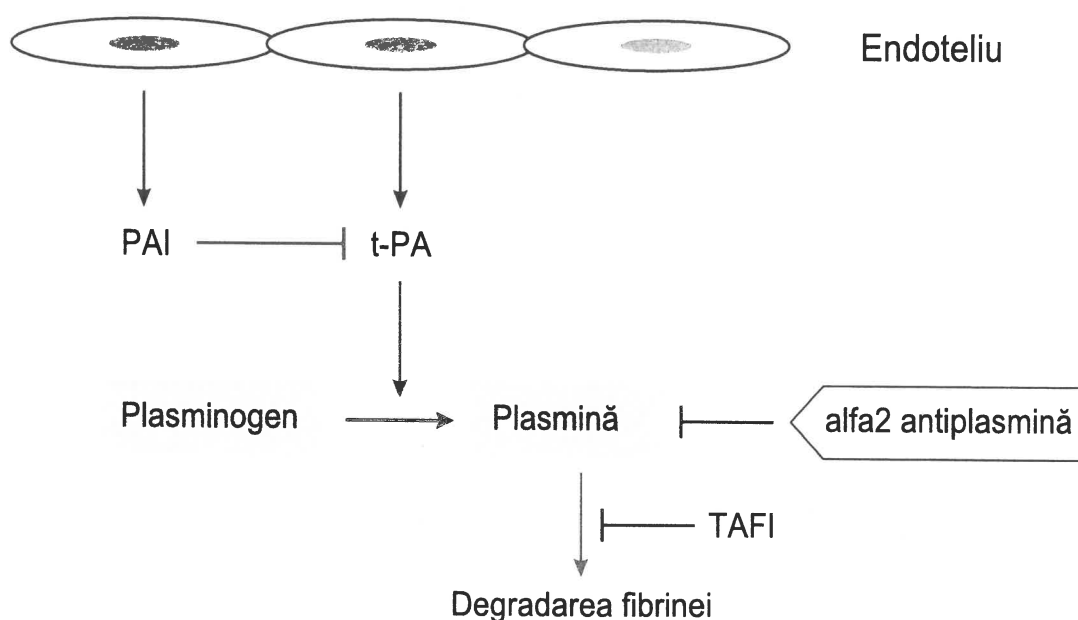
Detectarea rezistenței la APC se face prin evaluarea prelungirii APTT-ului plasmei de analizat la adăugarea de APC. În cazul rezistenței la APC, adăugarea de APC nu prelungește semnificativ APTT. Pentru a elimina posibila rezistență dată de nivelul crescut al factorului V, plasma de analizat se diluează cu o plasmă lipsită de factor V. Mutația Leiden trebuie confirmată ulterior prin teste de biologie moleculară.

#### 11.4.6 ANEXINA V

Este o proteină cu proprietăți anticoagulante, cu o masă de 34 000 D, care a fost inițial izolată din placentă. În momentul activării plachetare anexina se leagă în prezența ionilor de calciu de fosfolipidele electronegative expuse pe suprafața plachetelor (fosfatidilserină), inhibând legarea factorilor coagulării (factorul X și trombina) de aceste suprafețe.

### 11.7 FIBRINOLIZA

Fibrinoliza reprezintă ansamblul proceselor care asigură îndepărtarea depozitelor de fibrină (care ar putea genera tromboze), prevenind totodată liza prematură a cheagului, care ar antrena hemoragii. Asigurarea acestui echilibru delicat este realizată prin interacțiuni complexe între componentele activatoare și inhibitoare ale sistemului fibrinolitic (Figura 11.9).



**Figura 11. 9 Schema generală a sistemului fibrinolitic** PAI = inhibitorul activatorului plasminogenului; t-PA = activator tisular al plasminogenului; TAFI = inhibitorul fibrinolizei activat de către trombină

### 11.7.1 PLASMINOGENUL ȘI PLASMINA

Plasminogenul este o glicoproteină sintetizată în ficat, formată dintr-un singur lanț polipeptidic. Există două forme moleculare, care diferă prin aminoacidul din capătul N - terminal: Glu plasminogen, (forma nativă a plasminogenului), cu un timp de înjumătățire de 2 zile și având acid glutamic în capătul terminal, și Lys plasminogen, care are un timp de înjumătățire de 24 de ore, și provine din clivarea Glu plasminogenului în cursul activării fibrinolizei, prezentând lizină în capătul N - terminal.

Molecula de plasminogen prezintă 5 anse (kringles), care au o afinitate înaltă pentru legarea de lizină și compuși analogi, motiv pentru care se numesc *Lysin Binding Sites* – LBS. Aceste structuri permit legarea plasminogenului în rețeaua de fibrină, precum și interacțiunea sa cu  $\alpha 2$  antiplasmina. Lipoproteina (a) prezintă la 10-20% din subiecții normo și hiperlipemici are atașată o apoproteină particulară - apo(a), care are o porțiune din moleculă similară structural cu situsurile prin care plasminogenul se leagă de fibrină. Lipoproteina (a) are o mare afinitate pentru fibrină, fibronectină și proteoglicani, intrând în competiție cu plasminogenul pentru legarea în rețeaua de fibrină și având un efect de inhibare a fibrinolizei.

Plasmina este o enzimă proteolitică ce se formează din precursorul ei inactiv – plasminogenul. Plasmina degradează proteolitic fibrina, fibrinogenul, dar și alte proteine plasmatice, mai ales factorii V și VIII ai coagulării, având predilecție pentru legăturile peptidice Arg-Lys (proprietate ce permite utilizarea unor substraturi sintetice pentru determinarea activității plasminei).

### 11.7.2 ACTIVATORII FIBRINOLIZEI

#### 11.7.2.1 Activatorul tisular al plasminogenului t-PA

Activatorul tisular al plasminogenului este sintetizat și stocat de celulele endoteliale, fiind eliberat sub efectul unor stimuli ca hipoxia generalizată sau localizată, acidoza, efortul fizic, adrenalina, vasopresina, acidul nicotinic.

t-PA nativ se găsește sub formă monocatenară (*single chain t-PA*, sc-t-PA) și sub acțiunea plasminei și a tripsinei se transformă într-o moleculă cu 2 lanțuri polipeptidice (*two chain t-PA*, tc-t-PA), care este mai activă, dar și mai rapid inactivată de către inhibitori. În structura moleculei se găsesc structuri în ansă asemănătoare cu cele ale plasminogenului, prin care t-PA se leagă de rețeaua de fibrină. La nivelul rețelei de fibrină se formează de fapt un complex ternar între aceasta, plasminogen și t-PA. Apariția primelor urme de plasmină accelerează transformarea Glu-plasminogen în Lys-plasminogen (mai ușor activabil) și a sc-t-PA în tc-t-PA (mai activ). Fibrina însăși este prin urmare inductoare a activității fibrinolitice.

Timpul de viață al t-PA este foarte scurt ( $T/2$  de 5 minute), fiind captat și inactivat în ficat. Doar circa 5% din t-PA circulant se găsește sub formă liberă, activă, restul fiind complexat cu inhibitorul său PAI.

#### 11.7.2.2 Activatorul plasminogenului de tip urinar (urokinaza, u-PA)

Urokinaza este sintetizată de celulele epiteliale renale, ale căilor urinare, vaginale, corneene, din mucoasa gastrică, macrofage și celule endoteliale. Ea a fost evidențiată în plasmă, urină, lichid seminal și colostru.

u-PA este o enzimă proteolitică sintetizată inițial ca proenzimă (prourokinază, sc-u-PA), care se transformă în forma activă tc-u-PA.

u-PA intervine în menținerea permeabilității ductelor excretoare, prin îndepărtarea depozitelor fibrinoase, dar intervine alături de t-PA și în activitatea fibrinolitice generală. Pe suprafața unor celule cum ar fi fibroblastele, monocitele, granulocitele, spermatozoizii, celulele endoteliale au fost evidențiați receptori pentru u-PA. Asemenea receptori de găsesc și pe celulele tumorale din carcinoame mamare, ale colonului, limfoame histiocitare, ceea ce favorizează focalizarea activității fibrinolice pe respectivele celule și implicit potențialul metastazant al acestor tumori.

Studii recente au pus în evidență interacțiuni mai complexe între elementele sistemului fibrinolic. Astfel, s-a demonstrat că leucocitele sau microparticulele derivate din acestea purtătoare de uPA/uPAR pot recunoaște și activa plasminogenul expus pe alte suprafețe (plachete, fibrină, matrice extracelulară).

### 11.7.2.3 Sistemul de activare intrinsec

Este reprezentat de către factorul XII, prekalikreina și HMWK. Factorul XII și prekalikreina pot activa direct plasminogenul, iar kinele rezultate sub acțiunea kalikreinei stimulează eliberarea de t-PA din endoteliile vasculare. Pe de altă parte, factorul XII se activează sub acțiunea plasminei. Interacțiunile complexe dintre factorii de activare prin contact și sistemul fibrinolic se reflectă și pe plan clinic la pacienții cu deficit de factor XII (boală Hageman) care nu dezvoltă manifestări hemoragice, fiind mai degrabă predispuși la accidente trombotice.

### 11.7.2.4 Alți activatori ai fibrinolizei

Streptokinaza este un activator al fibrinolizei obținut din tulpini de streptococ hemolitic, fiind utilizată ca agent terapeutic în tromboliză. Acțiunea sa se exercită prin formarea unui complex cu plasminogenul căruia îi induce o modificare conformațională, acest complex activând ulterior alte molecule de plasminogen.

## 11.7.3 INHIBITORII FIBRINOLIZEI

Controlul fibrinolizei se realizează la două nivele, de către două tipuri de inhibitori. Un prim nivel are loc chiar în etapa activării, unde intervin inhibitorii activatorului plasminogenului (PAI). Un alt nivel de control se realizează prin inhibarea plasminei în mod specific de către  $\alpha_2$  antiplasmină, respectiv în mod nespecific de către alți inhibitori de proteaze ( $\alpha_2$  macroglobulină,  $\alpha_1$  antitripsină).

### 11.7.3.1 Inhibitorii activatorului plasminogenului

**PAI-1.** Este o proteină din superfamilia serpine, produs în hepatocite și celulele endoteliale, dar și în plachetele sangvine, fibroblaste și celulele musculare netede, precum și de adipocite. Insulina stimulează producția de PAI hepatic, în timp ce PAI endotelial este sintetizat sub acțiunea citokinelor proinflamatorii și a endotoxinelor, fiind deci un reactant de fază acută. Toate tipurile de PAI inhibă atât t-PA cât și u-PA.

**PAI-2.** A fost extras din placentă, dar și din monocite, granulocite și celulele unor linii tumorale. Activitatea inhibitorie a PAI-2 este mai puternică împotriva u-PA, iar rolul său fiziologic ar consta în protejerea organismului matern de o activare masivă a fibrinolizei în perioada sarcinii și în expulzie.

**PAI-3.** Este produs de hepatocite, fiind identic cu inhibitorul proteinei C (PCI), ponderea sa fiind redusă în economia generală a fibrinolizei.

### 11.7.3.2 $\alpha_2$ antiplasmina

Este principalul inhibitor al plasminei, fiind o proteină din superfamilia serpine, sintetizată de ficat. Molecula sa are un situs care inhibă centrul activ al plasminei, procesul fiind extrem de rapid. Un alt situs, conținând lizină de pe molecula de  $\alpha_2$  antiplasmină servește la legarea reversibilă a acesteia de plasminogen, la nivelul situsurilor LBS ale acestuia.  $\alpha_2$  antiplasmina se leagă covalent în rețeaua de fibrină sub acțiunea factorului XIII stabilizator al fibrinei, acest mecanism prevenind o degradare prematură a dopului hemostatic.

### 11.7.3.3 Inhibitorul fibrinolizei activat de trombină

Inhibitorul fibrinolizei activat de trombină (*Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor - TAFI*) este un atenuator al fibrinolizei. El își exercită rolul prin acțiunea sa procarboxipeptidazică, îndepărtând resturi de Lys din rețeaua de fibrină, ceea ce determină o legare mai redusă a plasminogenului de aceasta, cu scăderea concentrației de plasminogen din rețeaua de fibrină, respectiv degradare diminuată a fibrinei de către plasmină.

TAFI este activat de plasmină și de către complexul trombină – trombomodulină, fiind o verigă de legătură între coagulare și fibrinoliză.

El este de asemenea implicat în repararea tisulară și răspunsul inflamator. TAFI este implicat în numeroase stări patologice asociate cu tendință la tromboze, cum ar fi rezistența la proteina C activată, accidentele vasculare cerebrale, boala coronariană, preeclampsia și sindromul metabolic.

Nivelele scăzute de TAFI, așa cum apar la pacienții cu ciroză, la hemofilici sau la cei cu leucemie acută promielocitară contribuie la potențialul profibrinolitik crescut al acestor subiecți.

### 11.7.3.4 Alți inhibitori ai fibrinolizei

- $\alpha_2$  macroglobulina este un inhibitor general de proteaze, având rolul unei a doua linii de apărare, iar acțiunea sa asupra  $\alpha_2$  antiplasminei se exercită în mod lent, progresiv.
- $\alpha_1$  antitripsina intervine de asemenea în mod lent și progresiv ca inhibitor al plasminei
- inhibitorul componentei C1 a complementului (C1-INH) intervine în inhibarea fibrinolizei pe calea intrinsecă, prin efectul pe care îl exercită asupra factorului XII, kalikreinei și HMWK.
- inhibitorii sintetici au o structură similară lizinei, intrând în competiție cu radicalii lizină din structura fibrinei și limitând legarea plasminogenului în rețeaua de fibrină. Ei sunt utilizați în scop terapeutic, iar reprezentantul tipic al acestor inhibitori sintetici este acidul epsilon aminocaproic (EACA).

### 11.7.4 EXPLORAREA FIBRINOLIZEI

#### 11.7.4.1 Timpul de liză al cheagului de sânge diluat

Urmărește timpul în care se lizează cheagul obținut prin coagularea cu trombină a sângelui diluat în tampon acetat. Valorile se situează între 150 și 300 de minute.

#### 11.7.4.2 Timpul de liză al euglobulinelor

Prin precipitarea euglobulinelor (plasminogen, fibrinogen, activatori ai fibrinolizei) se limitează efectul inhibitorilor fibrinolizei. Valoarea normală este de peste 3 ore.

#### 11.7.4.3 Dozarea PDF și D-D

În urma fibrinolizei rezultă produși de degradare ai fibrinei și fibrinogenului, denumiți PDF. D dimerii (D-D) fac parte din PDF, dar ei rezultă prin degradarea fibrinei stabilizate de factorul XIII, diferențiind astfel fibrinoliza de fibrinogenoliză.

#### 11.7.4.4 Alte teste

Se poate efectua dozarea plasminogenului, a t-PA, PAI și  $\alpha 2$  antiplasminei.

A fost pus la punct și un test global de explorare a fibrinolizei (*Fibrinolysis Parameters Assay, FIPA*), în care plasma este incubată cu reactivul FIPA, conținând urokinază și acid tranexamic (un inhibitor al reacției plasmină -  $\alpha 2$  antiplasmină). După o incubare de 10 min, activarea fibrinolizei este stopată cu arginină, iar activitatea plasminei generate este măsurată cu ajutorul unui substrat cromogenic, și exprimată în raport cu cea a unei plasmă normale, valoarea activității fiind de  $100 \pm 15\%$ .

### 11.7.5. PATOLOGIA FIBRINOLIZEI

#### 11.7.5.1 Perturbări genetice ale fibrinolizei care evoluează cu tendință la hemoragie

- **Deficitul familial de  $\alpha 2$  antiplasmină (boala Miyasato).** A fost descris la un număr mic de familii și se manifestă prin epistaxis, hematurie, hemartroze, hematoame cerebrale și intramusculare și mai ales hemoragii după traumatisme, survenind la câteva ore de la incident (hemoragii în doi timpi). Deficitul de  $\alpha 2$  antiplasmină poate fi cantitativ, cu scăderea atât a antigenului cât și a funcției, sau funcțional, anomaliile putând interfera cu legarea  $\alpha 2$  antiplasminei de rețeaua de fibrină, de plasminogen sau de centrul activ al plasminei. Deși cheagul acestor pacienți este neprotejat față de fibrinoliză, fenomenul nu se însoțește de o activare a fibrinolizei sistemice, datorită intervenției inhibitorilor generali de proteaze ( $\alpha 2$  macroglobulina,  $\alpha 1$  antitripsina)
- **Sinteză/eliberare crescută de t-PA din endotelii.** Nivele crescute de t-PA au fost asociate cu infertilitatea masculină și feminină.
- **Deficit de PAI**

### 11.7.5.2 Perturbări genetice ale fibrinolizei care evoluează cu tendință la tromboze

- **Anomalii familiale ale plasminogenului.** Aceste defecte pot evolua cu o sinteză redusă a plasminogenului (hipoplasminogenemii familiale) sau ca deficite funcționale (displasminogenemii), în care plasminogenul nu se leagă de t-PA sau generează o plasmină inactivă. Defectul homozigot tip I de plasminogen se soldează cu depuneri masive de fibrină în spațiile extravasculare ale mucoaselor și cu apariția conjunctivitei lemnoase.
- **Reducerea activității t-PA** se datorează sintezei sau eliberării sale deficitare din endotelii.
- **Disfibrinogenemii asociate cu o fibrinoliză deficitară.** Prin coagulare fibrinogenul poate forma o rețea de fibrină cu afinitate scăzută față de plasminogen, având drept consecință încetinirea fibrinolizei.

### 11.7.5.3 Perturbări dobândite ale fibrinolizei asociate cu o fibrinoliză accelerată

- **Ciroza hepatică.** La cirofici apare o creștere a nivelului circulant de t-PA (a cărui inactivare în ficat este redusă în acest caz) și o diminuare a potențialului antifibrinolitic (prin scăderea  $\alpha_2$  antiplasminei). Rețeaua de fibrină este mai puțin consolidată prin scăderea factorului XIII. Valorile PAI pot avea o mare dispersie individuală, ținând cont că PAI-1 se eliberează și din endotelii în contextul existenței unei reacții inflamatorii.
- **Leucemia acută promielocitară.** La acești pacienți fibrinoliza este accelerată datorită acțiunii proteazelor leucocitare asupra  $\alpha_2$  antiplasminei, factorului XIII și fibrinogenului, cheagul fiind deosebit de susceptibil la fibrinoliză.

### 11.7.5.4 Perturbări dobândite ale fibrinolizei asociate cu o fibrinoliză încetinită

- **Starea postoperatorie,** în special după intervenții pe abdomen evoluează cu creșteri ale potențialului antifibrinolitic, prin creșterea secreției de PAI mediată de citokinele de fază acută care determină și creșterea fibrinogenului, factorului VIII și vWF, creându-se astfel condiții propice apariției de tromboze.
- **Vasculitele** se caracterizează prin procese inflamatorii ale endoteliilor, însoțite de eliberarea de citokine proinflamatorii, care determină o eliberare crescută de PAI din endotelii, scăderea eliberării de t-PA, concomitent cu o expunere crescută a factorului tisular și eliberarea de factor vWF care transportă factorul VIII.
- **Sindromul metabolic** este o entitate în care se asociază anomalii ale lipidelor serice (hipertrigliceridemie, HDL scăzut și prezența LDL dense), rezistența la insulină, hipertensiune și un status protrombotic. Acesta evoluează cu creșteri ale factorului XIII și fibronectinei, precum și cu nivele crescute de PAI-1 și  $\alpha_2$  antiplasmină, fibrinoliza fiind încetinită la acești subiecți.

## 11.8 PARTICULARITĂȚI ALE HEMOSTAZEI ÎN DIFERITE STĂRI FIZIOLOGICE ȘI PATOLOGICE

### 11.8.1 SINDROAME HEMORAGICE ALE NOU-NĂSCUTULUI

La nou născut mecanismele hepatice de sinteză a factorilor coagulării sunt incomplet dezvoltate (fenomen și mai evident la cei născuți prematur), astfel încât aceștia au nivele mai reduse ale factorilor dependenți de vitamina K, precum și a factorilor XI și XII. Nivelele plasmatice de antitrombină, PC și PS sunt de asemenea mai scăzute. Factorii V și VIII au nivele comparabile cu cele de la adult. În decurs de câteva săptămâni nivelele factorilor coagulării ating valorile normale ale adultului; în schimb, concentrațiile de proteină C și S se normalizează abia în jurul vârstei de 3-6 luni. Acest decalaj între potențialul procoagulant și deficitul relativ al unor mecanisme anticoagulante generează o mai mare susceptibilitate la apariția CID în caz de infecții cu unii agenți patogeni.

Aportul alimentar redus de vitamină K, absența florei microbiene intestinale saprofite, eventualele administrări de antibiotice creează la nou născut premisele instalării unei carențe de vitamină K. Deficitul tranzitor de vitamină K poate genera o serie de manifestări hemoragice denumite boala hemoragică a nou născutului, manifestată de obicei prin hemoragii digestive sub formă de melenă, sau chiar prin hemoragii din bontul ombilical, hematoame cefalice, echimoze extinse. Manifestările cedează la administrarea de vitamină K.

### 11.8.2 PARTICULARITĂȚI ALE HEMOSTAZEI ÎN SARCINĂ

În sarcină echilibrul hemostatic este mai precar, ceea ce are drept consecințe clinice variate ca severitate și ca manifestare (atât hemoragice cât și trombotice).

Modificările hemostazei se instalează începând cu sfârștul primului trimestru și constau în creșteri ale fibrinogenului plasmatic, ale factorilor II, IX și X, precum și a factorului VIII și a factorului von Willebrand (în special a unor forme cu un grad mai redus de polimerizare) - aceștia fiind eliberați datorită stimulării de durată a celulelor endoteliale. Factorul XIII și AT III au nivele scăzute. La nivelul circulației uteroplacentare are loc un proces localizat și de mică intensitate de generare de trombină și degradare a depozitelor trombotice, ceea ce se reflectă în creșterea moderată a nivelului de produși de degradare ai fibrinei și fibrinogenului (fibrinopeptid A) și prezența monomerilor de fibrină solubilă, precum și a complexelor AT-factori activați ai coagulării. Activitatea fibrinolitica sistemică este însă încetinită datorită producției crescute de PAI-2 la nivelul placentei.

În condițiile exacerbării patologice a acestor aspecte fiziologice apare disgravidia tardivă, respectiv preeclampsia și eclampsia. În acest context apare o scădere a numărului de plachete prin consum, creșterea monomerilor solubili de fibrină și a PDF. În formele mai severe aceste aspecte se extind și la circulația terminală de la nivel renal.

Unele complicații ale sarcinii (embolia cu lichid amniotic, sarcina oprită în evoluție, ruptura uterină sau de placentă, mola hidatiformă) pot declanșa fenomenul de coagulare intravasculară diseminată.

La gravide este contraindicată administrarea anticoagulantelor orale (alternativa terapeutică fiind heparinele), deoarece antagoniștii vitaminei K perturbă sinteza osteocalcinei, o proteină din țesutul osos dependentă de vitamina K, existând prin urmare riscul de apariție a malformațiilor scheletului la nou născut.

### 11.8.3 PARTICULARITĂȚI ALE HEMOSTAZEI ÎN NEOPLAZII

Neoplaziile sunt grevate de modificări complexe ale hemostazei, care interesează toate componentele acesteia (perete vascular, plachete, coagulare și fibrinoliză) și care se traduc prin tromboze (preponderent în cazul tumorilor solide) sau prin hemoragii (mai frecvente în cazul hemopatiilor maligne). Mecanismele care duc la perturbările hemostazei țin fie de particularitățile celulelor maligne, fie de impactul general pe care îl au neoplazia și complicațiile acesteia asupra organismului.

**Afectarea peretelui vascular** în cancere se datorează fie invaziei directe a celulelor neoplazice, fie unor mecanisme imune. Pe de altă parte, creșterea masei tumorale este în mare măsură condiționată de angiogeneză. Celulele tumorale cât și unele celule ale sistemului imun (monocite, limfocite T) exprimă și secretă factori care determină atragerea și proliferarea celulelor endoteliale. Acești factori proangiogenici sunt: factorul de creștere al endoteliilor vasculare (VGEF), factorul permeabilizator vascular (VPF), factorul de creștere transformant  $\alpha$  și  $\beta$  (TGF  $\alpha$ ,  $\beta$ ), factorii de creștere a fibroblaștilor (FGF 1-7), factorul de creștere derivat din plăcuțe (PDGF), factorul tisular (TF), activatorul de tip urokinază al plasminogenului (uPA). O enzimă secretată de endotelii, heparanaza, care clivează heparan sulfatul pare a fi implicată în potențialul proangiogenic și metastatic al tumorilor. Celulele neoplazice dar și efectorii imuni secretă și factori anti angiogenici, cum ar fi inhibitorul tisular al metaloproteinelor (TIMP), angiostatina, inhibitorul activatorului plasminogenului (PAI). Procesul de creștere și diseminare a tumorii poate fi influențat de dezechilibrul între mecanismele pro și anti angiogenice.

**Anomaliile plachetelor sangvine.** În cancere se înregistrează anomalii cantitative (scăderi sau creșteri ale numărului de plachete) și calitative ale trombocitelor.

Trombocitopeniile se produc cel mai adesea prin scăderea producției consecutive invadării medulare, sau prin distrucție accelerată periferică. Aceasta se poate produce prin mecanism imun, prin consum în cadrul unor procese de CID sau mai rar prin sechestrare splenică sau în hemangioame.

Trombocitemiile apar îndeosebi în cadrul sindromului mieloproliferativ cronic (trombocitemie esențială, leucemie granulocitară cronică, policitemia vera).

Adezivitatea și agregabilitatea plachetară sunt în general accentuate în tumorile solide, în timp ce în sindroamele mieloproliferative apare o diminuare a funcției plachetare.

**Perturbări ale coagulării.** Chiar în absența trombozelor manifeste clinic, la pacienții cu neoplazii se constată o activare sistemică a coagulării, corespunzătoare cu un sindrom cronic de CID și care se traduce prin creșterea nivelelor plasmatice de fibrinopeptid A, complexe AT - factori activați ai coagulării, și a produșilor rezultați din activarea plăcuțelor sangvine

(beta tromboglobulina, PF4). În activarea sistemică a coagulării intervin mai multe mecanisme, printre care:

- hiperexpresia factorului tisular pe celulele neoplazice, dar și pe cele endoteliale, monocite/macrofage și limfocite, acest mecanism părând să influențeze capacitatea de metastazare
- hiperexpresia pe unele celule neoplazice a receptorilor pentru factorul V (celule leucemice) sau pentru trombină (cancer mamar), care se corelează cu potențialul invaziv al tumorii
- procoagulantul legat de celulele canceroase (cancer procoagulant), care activează direct factorul X

**Perturbări ale fibrinolizei.** Fibrinoliza joacă un rol important în diseminarea tumorală, facilitând mobilizarea celulelor canceroase. Unele celule tumorale exprimă pe suprafața lor activator tisular al plasminogenului (t-PA), activator de tip urokinază (u-PA) și receptorul pentru u-PA (u-PAR). La unii pacienți cu tumori solide se înregistrează nivele plasmatiche crescute ale PAI-1, care contribuie la tendința spre tromboze. În leucemia acută promielocitară LAM 3 degradare  $\alpha_2$  antiplasminei de către elastaza leucocitară determină o accelerare a fibrinolizei.

#### 11.8.4 PARTICULARITĂȚI ALE HEMOSTAZEI ÎN BOLI RENALE

În bolile renale pot apare atât manifestări hemoragice cât și fenomene trombotice, în funcție de mecanismele patogenetice ale afecțiunii renale respective.

**Sindromul nefrotic.** Pierderea urinară de proteine interesează și antitrombina III, cu masă moleculară joasă, în timp ce alți factori ai coagulării cu mase moleculare mari vor fi crescuți (fibrinogen, factor V, factor VIII, factor XIII, fibronectină). Factorii coagulării dependenți de vitamina K (II, VII, IX, X) deși au o masă moleculară similară cu ATIII nu se pierd la nivel renal, datorită încărcării lor electronegative și respingerii lor electrostatice la nivelul capsulei Bowman. La creșterea nivelului lor plasmatic contribuie și sinteza accelerată de proteine și lipoproteine în ficat cauzată de scăderea presiunii coloidosmotice. Prin aceleași mecanisme se explică creșterea nivelurilor de proteină C și S. În sindromul nefrotic proteina S se găsește în mare proporție legată de C4bBP (un reactant de fază acută), iar fracțiunea liberă, care este cofactor al proteinei C este în cantitate redusă, funcționalitatea acestui sistem anticoagulant fiind astfel limitată. Factorul von Willebrand are valori crescute ca urmare a stimulării eliberării sale din celulele endoteliale. Dezechilibrele menționate au ca efect o creștere a riscului pentru evenimente trombotice.

Pacienții cu sindrom nefrotic au în principiu un potențial antifibrinolitic ridicat (prin sinteza crescută de PAI-1,  $\alpha_2$  antiplasmină,  $\alpha_2$  macroglobulină). Totuși, fibrinoliza este moderat accelerată. Explicația acestui fenomen ar putea fi faptul că în sindromul nefrotic, albumina, care în mod normal limitează activarea fibrinolizei prin limitarea formării complexelor între t-PA, plasminogen și fibrină, are nivele foarte scăzute. Astfel, este favorizată acțiunea t-PA al cărui nivel este doar moderat crescut în plasma bolnavilor cu sindrom nefrotic.

**Glomerulonefritele.** În patogeneza și evoluția glomerulonefritelor o verigă importantă o constituie depunerea de fibrină la nivelul glomerulilor. Acest proces este cauzat de expune-

rea factorului tisular de către celulele endoteliale lezate și de către monocitele infiltrate în glomeruli. Deși acumularea de material trombotic este localizată, în glomerulonefrite există și modificări sistemice ale hemostazei, traduse prin creșterea nivelelor de fibrinogen, factor von Willebrand și inhibitor al activatorului plasminogenului (PAI-1).

**Insuficiența renală cronică.** Insuficiența renală cronică este asociată cu o tendință la hemoragii, cauzate în principal de alterări ale hemostazei primare, respectiv de scăderea adezivității și agregării plachetare. Reactivitatea redusă a plachetelor sangvine s-ar datora unui complex de perturbări în care sunt incluse acumularea de AMPc în plăcuțe ca urmare a hiperparatiroidismului secundar, efectului combinat al ureei, creatininei, compușilor fenolici și acidului guanidinosuccidinic, precum și prezenței formelor multimerice cu greutate mică a factorului von Willebrand, care au o funcționalitate diminuată ca mediatori ai interacțiunii dintre plachete și peretele vascular.

#### 11.8.5 PARTICULARITĂȚI ALE HEMOSTAZEI ÎN BOLI HEPATICE

Ficatul are un rol important în sinteza unor factori ai coagulării (factorii II, V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, fibrinogenul), fibrinolizei (plasminogen,  $\alpha_2$  antiplasmină, PAI-1), mecanismelor anticoagulante (AT III, PC, PS) intervenind pe de altă parte și în degradarea vWF, a factorului VIII și a factorilor activați ai coagulării. Pacienții cu afecțiuni hepatice severe prezintă perturbări complexe ale hemostazei, soldate cu tendință la sângerare. Mecanismele care concură la această predispoziție sunt complexe și includ deficitul de vitamină K, reducerea sintezei unor factori ai coagulării, consumul factorilor coagulării într-un sindrom de CID, fibrinoliza accelerată, trombocitopenia și fragilitatea capilară.

Deficitul de vitamină K apărut în contextul icterului mecanic sau al unui sindrom de malabsorbție lipidică are drept consecință apariția formelor nefuncționale ale factorilor coagulării dependenți de vitamina K, denumite PIVKA, ceea ce se reflectă în prelungirea timpului de protrombină și normalizarea lui după administrarea parenterală a vitaminei K.

Alterarea funcției proteosintetice a ficatului se traduce prin scăderea factorilor II, V, VII, X, a factorului XIII, în timp ce fibrinogenul este în limite normale, iar factorul VIII și vWF sunt crescuți (prin scăderea inactivării lor). Scăderea factorului V este un indicator fidel al funcției proteosintetice hepatice, deoarece sinteza sa nu depinde de vitamina K. În insuficiența hepatică supraacută scăderile cel mai rapide le înregistrează factorul VII care are un T/2 scurt (6-8 ore).

Accelerarea fibrinolizei apare în cazul cirozelor hepatice decompensate și se datorează reducerii sintezei de PAI-1,  $\alpha_2$  antiplasmină, factor XIII stabilizator al fibrinei și nivelului crescut de t-PA care este slab inactivat în ficat. De menționat că în tumorile hepatice și în hepatopatiile colestatice activitatea fibrinolitica este însă încetinită.

Trombocitopenia întâlnită la bolnavii cu ciroză hepatică se explică prin sechestrarea în splină a plachetelor precum și printr-un mecanism imunologic, constând în depunerea de complexe imune nespecifice pe suprafața plachetelor, care astfel vor fi mai rapid înlăturate din circulație. Adezivitatea și agregabilitatea plachetară sunt de asemenea diminuate, pro-

tabil prin alterări ale structurii lipidice membranare și/sau astenizarea plachetelor în urma sechestrării splenice sau a contactului cu complexe imune.

### 11.8.6 ANOMALIILE HEMOSTAZEI ȘI SINDROMUL METABOLIC

Factorii de risc metabolici și un grad redus de inflamație asociată acestui sindrom determină un echilibru precar al balanței hemostatice.

La acești indivizi se descrie o hiperreactivitate plachetară, asociată cu un grad de hipercoagulabilitate (nivele crescute de factori VII, X și XIII și fibrinogen), precum și o fibrinoliză mai încetinită, prin creșterea potențialului antifibrinolitik (creșterea nivelului de PAI-1 și  $\alpha_2$  antiplasmină). Cu toate că și factorii anticoagulanți sunt crescuți, înregistrându-se nivele ridicate de PC, PS și într-o mai mică măsură de AT III, modificările globale ale hemostazei predispun acești pacienți la evenimente trombotice. De fapt, acest echilibru hemostatic precar poate fi perturbat prin dezvoltarea unei disfuncții endoteliale care duce la scăderea mecanismelor antitrombotice și la accentuarea celor protrombotice în peretele arterial. Un exces de acizi grași eliberați de către țesutul adipos și ajunși la ficat pe cale portală va determina nu doar o steatoză ci și o stimulare a sintezei hepatice de factori procoagulanți și de inhibitori ai fibrinolizei.

### 11.8.7 COAGULAREA INTRAVASCULARĂ DISEMINATĂ (CID)

CID este o perturbare complexă a hemostazei în care apar atât fenomene trombotice (prin activarea intravasculară a coagulării și depunerea de fibrină și plachete în capilare) cât și hemoragii (datorate consumului plachetelor și factorilor coagulării), fiind considerată o verigă patogenetică implicată în numeroase stări patologice.

**Tabel 11.VIII Stări patologice asociate cu CID**

- 
- Septicemii (în special cu microorganisme Gram negative)
  - Complicații obstetricale (eclampsie, embolie cu lichid amniotic, ruptură de placentă, molă hidatiformă)
  - Hemoliză intravasculară
  - Reacții imune intravasculare
  - Veninuri și toxine animale
  - Proteze valvulare și vasculare, circulație extracorporeală
  - Traumatisme severe, arsuri
  - Neoplazii
  - Boli hepatice severe
- 

Activarea coagulării se produce prin expunerea factorului tisular pe celulele endoteliale și pe monocite, urmată de activarea factorului VII și declanșarea reacțiilor de pe calea extrinsecă. Trombina formată amplifică și calea intrinsecă, prin activarea factorului VIII, rezultând depozite de fibrină.

Mecanismele antitrombotice ale endoteliilor sunt deprimare (deficit de heparan și dermatansulfat, scăderea trombomodulinei, a TFPI) sub acțiunea agenților declanșatori (endo-

toxine, radicali superoxid), consecința fiind reducerea eficienței funcționale a antitrombinei III, cofactorului II al heparinei și sistemului proteinei C.

Fibrinoliza are un comportament bifazic, fiind inițial activată compensator prin eliberarea de t-PA din endotelii, ceea ce se reflectă prin creșterea PDF și a complexelor plasmină/ $\alpha_2$  antiplasmină. În faza următoare activitatea fibrinolitica scade prin epuizarea eliberării de t-PA endotelial și prin inactivarea t-PA circulant de către PAI.

**Tabel 11.IX Diagnosticul de laborator în CID**

- Evidențierea coagulopatiei de consum ( $\downarrow$  plachetelor, prelungirea PT, APTT,  $\pm \downarrow$  fibrinogenului)
- Evidențierea produșilor rezultați prin activarea coagulării in vivo (monomeri solubili de fibrină, fibrinopeptid A, F1+2,  $\beta$ TG, PF4)
- Evidențierea răspunsului fibrinolitic compensator (PDF, DD)
- Evidențierea complexelor între factorii activați ai coagulării și antitrombină, a complexelor plasmină/ $\alpha_2$  antiplasmină)

Manifestările clinice ale CID sunt consecința formării de microtrombi care obstruează microcirculația și determină apariția insuficienței pluriorganice. Prin consumul factorilor coagulării și al plachetelor, la care se adaugă leziunile pereților vasculari se produc fenomene hemoragice.

Conduita terapeutică vizează în principal tratamentul etiologic și menținerea perfuziei organelor afectate. Factorii consumați trebuie înlocuiți prin tratament substitutiv (sânge proaspăt sau derivate). Pentru a împiedica extinderea trombozelor se administrează heparină ca tratament anticoagulant. Tratamentul cu inhibitori ai fibrinolizei este contraindicat, fibrinoliza fiind în CID un mecanism compensator.

#### 11.8.8 ANOMALII ALE COAGULĂRII LEGATE DE PREZENȚA UNOR ANTICOAGULANȚI CIRCULANȚI

Acești inhibitori pot fi dirijați specific împotriva factorilor coagulării, fie sunt anticorpi antifosfolipide (așa zisul anticoagulant lupic).

**Anticorpi dirijați specific împotriva unor factori ai coagulării** aparțin de obicei clasei IgG și apar de cele mai multe ori la pacienți politransfuzati, în contextul unei alloimunizări. Cel mai frecvent acești anticorpi sunt întâlniți în cazul hemofiliei A (Ac antifactor VIII) sau al hemofiliei B (Ac antifactor IX), precum și la pacienți cu boală von Willebrand (Ac anti vWF). Anticorpii dirijați contra celorlalți factori ai coagulării sunt foarte rar întâlniți. Se mai descriu cazuri de anticorpi antifactor XIII, majoritatea apărând în contextul tratamentului cu izoniazidă. Uneori anticorpii apar la lăuze sau la pacienți cu diverse anomalii ale răspunsului imun. Prezența acestor anticorpi predispune la hemoragii.

**Anticorpii antifosfolipide** apar în contextul unor boli autoimune, hemopatii maligne, neoplazii, tratamente medicamentoase sau în lipsa unei cauze evidente. Acești anticorpi sunt reprezentați de molecule de IgG și/sau IgM, mai rar IgA. Anticorpii sunt dirijați în realitate împotriva unor complexe formate din fosfolipide (cardiolipina și fosfatidilserina) și proteine ( $\beta_2$  glicoproteina I și protrombina). Deși prezența anticorpilor antifosfolipide determină în vivo prelungirea timpilor de coagulare în care sunt implicate fosfolipidele, totuși manifestările

clinice ale sindromului antifosfolipide constau în tromboze arteriale sau venoase. Suspiciunea de sindrom antifosfolipide vizează pacienții tineri cu tromboze arteriale (infarct, AVC), femei cu avorturi recurente, pacienți cu tromboze venoase atipice (retiniene, cerebrale, hepatice – sindrom Budd Chiari), pacienți cu trombocitopenie.

S-a sugerat că mecanismul prin care anticorpii antifosfolipide determină tromboze ar fi o competiție în legarea de celule între aceștia și anexina A5, ceea ce ar duce la reducerea proprietăților anticoagulante ale anexinei.

Explorarea în laborator a sindromului implică evidențierea lipsei de corectare a coagulabilității într-un amestec format dintr-o plasmă normală și plasma de pacient, demonstrarea prelungirii testelor de coagulare dependente de fosfolipide (APTT, APTT diluat, testul cu venin de Vipera Russell diluat dRVVT sărac în fosfolipide - LA Screen, respectiv bogat în fosfolipide - LA Confirm). De asemenea se pot efectua teste ELISA prin care se dozează titrul de anticorpi. Explorarea de laborator a sindromului antifosfolipide este dificilă în tratamentul cu heparine nefracționate (dacă acestea nu sunt neutralizate in vitro cu heparinază sau polibren), testele fiind modificate din cauza heparinei. Pe de altă parte, în prezența anticorpilor antifosfolipide monitorizarea prin APTT a tratamentului cu heparine nefracționate este dificil de interpretat.

## 11.9 TROMBOZELE

Tromboza reprezintă consecința activării patologice a fenomenelor fiziologice ale hemostazei. În producerea trombozelor intervin factorii triadei lui Virchow: leziunea endotelială, staza și perturbarea echilibrului hemostazei.

### 11.9.1 ETIOLOGIA TROMBOZELOR

Cauzele producerii de tromboze pot fi genetice sau dobândite, sau asocieri ale acestora.

Anomaliile familiale ale hemostazei cu potențial protrombotic sunt prezentate în tabelul 11.XI

**Tabel 11.X Anomalii familiale ale hemostazei cu potențial protrombotic**

- 
- |   |
|---|
| <b>1. Deficite cantitative sau calitative ale mecanismelor anticoagulante</b>   |
| - AT III  |
| - PC  |
| - PS  |
| - HC II   |
| <b>2. Deficite de inactivare a unor factori ai hemostazei</b>                   |
| - Factor V Leiden – rezistența la proteina C activată                           |
| - Factor VIII 336 Arg→Ile – activitate specifică crescută                       |
| - Defect de proteoliză a multimerilor vWF – purpură trombotică trombocitopenică |
| <b>3. Creșterea sintezei unor factori procoagulanți</b>                         |
| - Factor VII (353Arg/Gln)   |
| - Protrombină (20210 G→A)   |
| - Deleția unor peptide din factorul VIII  |
| <b>4. Anomalii ale fibrinolizei</b>   |
| - Disfibrinogenemii   |
| - Anomalii ale t-PA   |
| - Displasminogenemii  |
| - ↑ PAI-1   |
-

De menționat că diversele mutații se pot asocia la același individ, crescând riscul pentru evenimente trombotice iar la evaluarea potențialului trombogen al diferitelor mutații trebuie avută în vedere și eventuala asociere a altor condiții patologice favorizante așa cum sunt:

- Vârsta înaintată
- Antecedente personale și familiale de tromboză
- Imobilizare prelungită
- Insuficiență cardiacă congestivă
- Varice
- Obezitate
- Sarcină
- Contraceptive orale, tratament estrogenic
- Intervenții chirurgicale (micul bazin, chirurgie oncologică, ortopedică – șold, genunchi)
- Cancere, leucemii
- Poliglobulie
- Hemoglobinuria paroxistică nocturnă
- Colagenoze
- Sindrom nefrotic
- Hiperlipoproteinemii aterogene\*
- Diabet zaharat \*
- Fumat\*
- Hiperuricemie\*

*\*Mai ales tromboze arteriale*

Obezitatea și hiperlipoproteinemii (IIb, IV, V) sunt caracterizate prin creșterea potențialului antifibrinolitic (creșterea PAI-1 și a factorului XIII stabilizator al fibrinei), precum și a celui procoagulant (nivele crescute de factor VII și X). Cu toate că la acești subiecți se înregistrează și nivele crescute de PC și PS, echilibrul hemostatic este precar, putând fi deplasat în sensul trombozei dacă se adaugă procese inflamatorii, diabet zaharat sau hiperuricemie, care afectează tromborezistența endotelială, după cum s-a arătat anterior.

Intervențiile chirurgicale, procesele inflamatorii, neoplaziile și colagenozele declanșează sinteza de citokine proinflamatorii, care amorsează reacția de fază acută, caracterizată prin creșterea fibrinogenului și eliberarea din endotelii a factorului von Willebrand, a factorului VIII și a PAI-1.

Predispoziția la tromboze din sindromul nefrotic se explică prin pierderile de AT III și creșterea nivelului de fibrinogen, factor V, factor VIII, factor XIII, factor von Willebrand și fibronectină. Cu toate că proteina C înregistrează nivele crescute, funcționalitatea sa este limitată de nivelul scăzut al cofactorului ei, forma liberă a proteinei S.

### 11.9.2 EXPLORAREA DE LABORATOR A TROMBOZELOR

Aceasta ar trebui să cuprindă:

- Hemoleucogramă (număr de plachete, hematii)
- Depistarea rezistenței la proteina C activată (+ evidențierea factorului V Leiden)
- Detectarea mutației G20210A a protrombinei
- Determinarea AT III, PC, PS (activitate  $\pm$  antigen)
- Depistarea hiperhomocisteinемiei

În cazul suspiciunii de sindrom antifosfolipidic se impune determinarea anticorpilor anticardiolipină, antifosfatidilserină, anti  $\beta$ 2GP1, antiprotrombină.

La pacienții cu tromboze se pot evidenția în circulație produși rezultați din activarea plachetelor (PF4,  $\beta$  tromboglobulină), sau a clivării fibrinogenului (FpA, FpB), precum și din degradarea fibrinei (D dimeri). De menționat că determinarea D-dimerilor este utilă mai ales pentru excluderea trombozei venoase profunde, principala limită fiind însă rezultatele fals pozitive, mai ales la pacienții care au procese inflamatorii coexistente sau neoplazii.

### 11.9.3 SUPRAVEGHEREA TRATAMENTULUI ANTICOAGULANT

#### 11.9.3.1 Tratamentul cu heparine

Heparinele sunt mucopolizaharide sulfatate naturale, cu mase moleculare variabile care acționează prin potențarea acțiunii antitrombinei. Complexul heparină-AT are o acțiune inhibitorie asupra factorului IIa și a factorului Xa. La pacienții cu deficit de antitrombină sau cu polimorfisme ale site-ului de legare al heparinei (HBS) se poate înregistra o rezistență la heparină (necesitatea administrării unor doze mari de heparină pentru a obține un răspuns anticoagulant).

Efectul anticoagulant și proprietățile farmacologice ale heparinelor variază în funcție de masa moleculară, fiind descrise în prezent trei clase: heparine nefracționate, heparine fracționate (cu masă moleculară joasă) și pentazaharidul Fondaparinux.

Heparinele standard (nefracționate) au o acțiune echivalentă anti IIa și anti Xa. Legarea lor de proteinele plasmaticе (vWF), factorul plachetar 4 (PF4), celule endoteliale și macrofage le limitează biodisponibilitatea și explică variabilitatea efectului lor anticoagulant. Monitorizarea tratamentului se face prin testul APTT. Recoltarea trebuie făcută din brațul contralateral perfuziei, la 6 ore de la debutul tratamentului sau de la modificarea dozei (în caz de administrare continuă), sau la jumătatea intervalului dintre administrări (în caz de administrare intermitentă). Valoarea APTT trebuie să fie 1,5-3 ori mai prelungită decât cea a matorului, testul fiind efectuat zilnic. Având în vedere că PF4 eliberat de plachete poate modifica heparinemia, plasma trebuie separată în decurs de o oră de la recoltare.

La pacienții tratați cu doze mari de heparină (angioplastie, by pass cardiopulmonar, hemodializă) la care APTT-ul este nemăsurabil sau în cazul în care se impune un rezultat rapid în vederea monitorizării tratamentului cu heparină se recurge la un test denumit Activated Clotting Time (ACT). Acest test se face din sânge integral, recoltat într-un tub sau cartuș ce

conține activatori ai căii intrinseci. Prin introducerea tubului într-un aparat special, se măsoară timpul de coagulare al sângelui. Valorile normale sunt între 70-180 secunde. Limitele acestui test sunt precizia mai mică decât cea a APTT, relativa lipsă de standardizare a diferitelor metode, precum și faptul că rezultatele sunt influențate de numărul și funcția plachetelor, temperatura ambiantă, hipotermie, hemodiluție.

Heparinele fracționate (cu greutate moleculară joasă) au o activitate anti Xa de aproximativ 3 ori mai puternică decât cea anti IIa. Administrarea lor nu modifică testul APTT. În caz de administrare profilactică nu este necesară supravegherea de laborator. În caz de tratament al TVP constituite, supravegherea se face prin determinarea heparinemiei ca activitate anti Xa, în cazuri particulare cum ar fi insuficiența renală, cașexia sau obezitatea, apariția hemoragiilor.

Fondaparinux este un pentazaharid de sinteză (subunitatea din lanțurile de heparină) având exclusiv activitate antiXa (exercitată prin intermediul antitrombinei). Monitorizarea tratamentului se supune aceluiași principii ca și pentru heparinele fracționate.

Având în vedere riscul apariției trombocitopeniei induse de heparină, în cazul administrării ambelor tipuri de heparine este necesară numărătoarea periodică a plachetelor.

### 11.9.3.2 Tratamentul cu anticoagulante orale (antivitamine K, AVK)

Vitamina K intervine în coagulare prin favorizarea acțiunii unei carboxilaze care duce la sinteza unor forme activabile, funcționale ale factorilor II, VII, IX și X. Procesul de carboxilare a acidului glutamic decurge în paralel cu o epoxidare a vitaminei K. Deoarece procesul de carboxilare al vitaminei K necesită prezența vitaminei K în formă redusă, este esențială transformarea epoxidului vitaminei K sub acțiunea unei reductaze. Mecanismul de acțiune al anticoagulantelor orale (antagoniștilor vitaminei K) constă în inhibiția competitivă a reductazei epoxidului vitaminei K; astfel, absența formei reduse a acesteia nu va permite carboxilarea acidului glutamic iar factorii rezultați (PIVKA) nu vor funcționali. Cinetica descreșterii activității factorilor depinde de T/2 al acestora (f VII 6 ore, F IX 12 ore, F X 36 ore, f II 60 ore); din acest motiv instalarea efectului terapeutic durează câteva zile.

Tratamentul cu AVK se supraveghează prin efectuarea timpului de protrombină (PT, timp Quick), care din motive de standardizare se exprimă sub formă de INR. Primul control se face la 48 de ore de la inițierea administrării, iar apoi tot la 48 de ore până la atingerea INR considerat optim pentru pacientul respectiv, în funcție de patologia căreia i se adresează terapia anticoagulantă. Următoarele controale se fac bisăptămânal, apoi săptămânal, bilunar, până se ajunge la efectuarea lunară a PT.

Răspunsul individual la AVK variază în funcție de numeroși factori de mediu: vârstă, regim alimentar, patologie asociată renală, hepatică, cardiacă, stări hipercatabolice, precum și medicamente care interferează prin potențarea (AINS, tetraciclină, neomicină, D tiroxină) sau diminuarea (barbiturice, colestiramină, etinilestradiol, rifampicină) efectului AVK. Răspunsul uneori capricios al pacienților la tratamentul cu AVK se poate datora și unei reactivități individuale determinate genetic la acțiunea anticoagulantelor orale. Genele responsabile

sunt gena pentru citocromul P<sub>450</sub> (denumită CYP2C9) și gena pentru complexul 1 al epoxid reductazei vitaminei K (VKORC1), enzima responsabilă de regenerarea vitaminei K. Pacienții pot astfel să prezintă o hipersensibilitate la acțiunea AVK, datorită mutațiilor CYP2C9 afectând degradarea AVK (degradare mai redusă a AVK), respectiv o rezistență la acțiunea AVK prin mutații ale genei VKORC1. A fost pus la punct și un sistem care detectează variantele acestor gene, denumit Nanosphere Verigene Warfarin Metabolism Nucleic Acid Test.

### 11.9.3.3 Noi clase de anticoagulante

În această categorie se încadrează antitrombinicele directe: Argatroban (injectabil) și Dabigatran (oral) precum și inhibitorii direcți ai factorului Xa: Rivaroxaban și Apixaban.

Avantajele acestor noi medicamente sunt faptul că în principiu nu necesită monitorizare și ajustarea dozei. Cu toate acestea există situații în care pacienții au risc de sângerare și se impune totuși supravegherea de laborator. Testele uzuale (PT, APTT) nu pot fi utilizate pentru monitorizare, limitele lor fiind legate de sensibilitatea analitică și de absența concordanței între doză și prelungirea timpilor de coagulare. Dintre testele folosite pentru supravegherea tratamentului cu noile anticoagulante orale se pot menționa timpul total de coagulare (TCT – Total Coagulation Time), timpul de ecarină (Ecarin Clotting Time ECT), acestea fiind însă variabile în funcție de aparatura și reactivii folosiți. Testul cel mai precis este spectrometria de masă, mai puțin accesibilă însă pe scară largă.

Inconvenientul major al acestor medicamente este legat de inexistența unui antidot în caz de supradozare.

## 11.10 CAZURI CLINICE COMENTATE

### 11.10.1 MONITORIZAREA TRATAMENTULUI CU ANTIVITMINE K

Pacientă în vârstă de 63 de ani cunoscută cu fibrilație atrială, aflată în tratament cronic cu Sintrom. La monitorizarea lunară a tratamentului anticoagulant, în urmă cu o săptămână, valoarea INR a fost de 2,6.

Se prezintă la urgență pentru astenie, stare febrilă care durează de 3 zile (temperatura la prezentare 39,1°C), dispnee, tuse. În urma examenului clinic și radiologic se stabilește diagnosticul de bronhopneumonie. Este internată, se instituie tratament cu ciprofloxacina.

După 3 zile de la începerea tratamentului antibiotic se solicită INR, care are valoarea de 3,3, fără să se fi modificat doza de anticoagulant.

#### Interpretarea cazului

Efectul antivitaminelor K este influențat de procesele patologice asociate și de numeroase medicamente. Stările febrile determină un catabolism exagerat al factorilor dependenți de vitamina K, potențând efectul AVK. Ciprofloxacina (și alte antibiotice, între care chinolonele, cefalosporinele) potențează de asemenea efectul AVK. Febra și tratamentul antibiotic au determinat un efect mai puternic al AVK, cu creșterea INR.

### 11.10.2 COAGULARE INTRAVASCULARĂ DISEMINATĂ

Pacient de 73 de ani internat în secția de Terapie Intensivă cu diagnosticul de stare septică, având ca punct de plecare un abces prostatic pentru care s-a intervenit chirurgical, prezintă gingivoragii, peteșii și echimoze pe toată suprafața corpului și hemoragie la nivelul plăgii operatorii și la nivelul cateterului i.v.

- Uree 74 mg/dl (normal 15-40 mg/dl)
- Creatinină 3,2 mg/dl (normal 0,7-1,2 mg/dl)
- ASAT 78 UI/l
- ALAT 84 UI/l
- Bilirubină totală 2,5 mg/dl (normal <1 mg/dl)
- Trombocite 48 000/mm<sup>3</sup>
- PT 20,5 secunde (normal 11,8-13,2 secunde)
- IP 19% (normal 80-120%)
- APTT 46 secunde (normal 25-35 secunde)
- Fibrinogen 205 mg/dl (normal 200-400 mg/dl)
- Ddimeri 1,1 μg/ml (normal <0,25 μg/ml)

#### Interpretarea cazului

Pacientul dezvoltă coagulare intravasculară diseminată (CID) în contextul stării septică. PT și APTT sunt prelunghiți, numărul de trombocite este scăzut, D dimerii sunt crescuți. Valorile normale ale fibrinogenului (ar fi fost de așteptat să fie scăzut) se explică prin faptul că fibrinogenul este un reactant de fază acută și probabil a avut valori crescute anterior instalării CID, motiv pentru care este importantă urmărirea lui în dinamică. Alterarea funcției renale și hepatice se explică prin insuficiența pluriorganică instalată în cadrul CID.

### 11.10.3 TROMBOFILIE EREDITARĂ

Pacientă în vârstă de 23 de ani se prezintă pentru tumefiere și durere la nivelul gambei. Pacienta nu are antecedente personale patologice semnificative. Pacienta consumă anticoncepționale orale și este fumătoare. Examenul ecoDoppler evidențiază aspect de tromboză venoasă profundă.

#### Interpretarea cazului

Pentru elucidarea cauzei trombozei venoase se efectuează ca panel de investigații:

- Rezistența la proteina C activată (APCR).
- Depistarea mutației G20210 A a protrombiniei
- Dozarea activității proteinei C
- Proteina S:Ag (forma liberă)
- Dozarea activității antitrombinei
- Teste pentru detectarea anticoagulantului lupic

Toate testele au fost negative, exceptând APCR, care a fost pozitiv. Se recomandă confirmare prin teste de biologie moleculară pentru depistarea factorului V Leiden. Se instituie tratament anticoagulant, se recomandă utilizarea altei metode contraceptive și renunțarea la fumat.

#### 11.10.4 PURPURĂ TROMBOCITOPENICĂ PRIN MECANISM IMUN

Copil de 7 ani se prezintă pentru peteșii diseminate, mai numeroase la nivelul gleznelor. Pacientul este la 3 săptămâni de la remisia varicelei. Examenul clinic nu evidențiază alte modificări.

- Trombocite 61 000/mm<sup>3</sup>
- PT 12,4 secunde, (normal 11,8-13,2 secunde)
- IP 100% (normal 80-120%)
- APTT 25,3 secunde (normal 25-35 secunde)
- Fibrinogen 328 mg/dl (normal 200-400 mg/dl)

În hemoleucogramă se evidențiază limfocitoză. Frotiul de sânge periferic nu prezintă modificări, exceptând numărul scăzut de trombocite.

##### Interpretarea cazului

Trombocitopenia izolată, fără alte modificări ale testelor de laborator pledează pentru diagnosticul de purpură trombocitopenică imună. La stabilirea diagnosticului este util aspectul normal al frotiului, fără schizocite (ca în purpura trombotică trombocitopenică), fără leucocite imature (ca în leucemie) și fără agregate trombocitare (ca în pseudotrombocitopenie). Cauza trombocitopeniei poate fi episodul de infecție virală în antecedente (varicela), context care explică și limfocitoza.

#### 11.10.5 HEMOFILIE A

Copil de sex masculin, în vârstă de 1 an și o lună, este adus pentru constatarea de către mamă a unei tumefieri la nivelul articulației genunchiului, survenită după un traumatism minor. Articulația este inflamată, dureroasă, caldă. Copilul evită să se sprijine pe membrul inferior afectat. Anamneza nu relevă sângerări din cordonul ombilical la naștere. Nu se descriu antecedente familiale de sindrom hemoragipar.

- Timp de sângerare 2 minute 33 secunde (normal <5 minute)
- PT 12,5 secunde (normal 11,8-13,2 secunde)
- IP 101%
- APTT 49 secunde (normal 25-35 secunde).

##### Interpretarea cazului

Contextul clinic și modificarea izolată a APTT sugerează diagnosticul de hemofilie.

Se efectuează dozarea activității factorului IX, care are valori normale.

La dozarea activității factorului VIII se obține o activitate de 3%. Diagnosticul este de hemofilie A, formă cu severitate moderată.

#### Bibliografie selectivă

1. Ariens RAS, de Lange M, Snieder H, et al. Activation markers of coagulation and fibrinolysis in twins: heritability of the prethrombotic state. *Lancet*, 2002, 359: 667-71
2. Baglin T, Gray E, Greaves M, et al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J*

- Haematol. 2010;149(2):209–20
3. Bauer KA. Pros and cons of new oral anticoagulants Hematology 2013 2013:464-70
  4. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature. 1994;369(6475):64–7.
  5. Borensztajn K, Spek CA. Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target. Expert Opin Ther Targets. 2011;15(3):341-9.
  6. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. Annual Review of Medicine. 1995, 46: 103-12
  7. Brudașcă I. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): Physiology and clinical implications. Fiziologia-Physiology, 2006, 16: 4-7
  8. Brudașcă I, Cucuianu M. Pathogenic role of abnormal fatty acids and adipokines in the portal flow. Rom J. Intern. Med., 2007, 45(2), 149-57
  9. Brudașcă I, Cucuianu M, Stancu A, Colhon DM. Plasma protein S antigen (PS:Ag) in selected disease states. Rev Roum Med Int, 1994, 32(1):29-35
  10. Brudașcă I., Goina A. Sistemul proteinei Z- fiziologie și implicații clinice. Clujul Medical, 2006, 2, 321-26
  11. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. Thromb Res. 2011;127 Suppl 3:S21-5
  12. Cheong PL, Lee WT, Lin HM, Lin KH. Moyamoya syndrome with inherited C and S proteins deficiency: report of one case. Acta Pediatr Taiwan, 2005, 46(1): 31-4
  13. Cucuianu A. Tulburări de hemostază în cancer. În: Actualități în patologia hemostazei și trombozei sub redacția Cucuianu M., Crîșnic I., Vasile Goldiș University Press, Arad, 1999
  14. Cucuianu M. Factor XIII and fibrinolytic resistance. Circulation. 2000; 101: e158
  15. Cucuianu M, Bodizs G, Duncea I, Colhon D. Plasma fibronectin in overweight men and women: correlation with serum triglyceride levels and serum cholinesterase activity. Blood Coagul Fibrinolysis. 1996;7(8):779-85
  16. Cucuianu M., Brudașcă I., Trif I., Stancu A. Clinical studies on plasma protein C. Correlation with serum cholinesterase. Nouv Rev Fr Hematol, 1993, 35: 481- 86
  17. Cucuianu M. Crîșnic I. Actualități în patologia hemostazei și trombozei. Ed. Vasile Goldiș University Press, Arad, 1999
  18. Cucuianu M., Cucuianu A. Von Willebrand factor and cardiovascular disease. Restricted relevance. Rom J Intern Med., 2006, 44: 3-17
  19. Cucuianu M., Knauer O., Roman S.  $\alpha_2$  antiplasmin, Plasminogen Activator Inhibitor (PAI) and dilute blood clot lysis time in selected disease states. Thromb Haemost, 1991, 66(5): 586-91
  20. Cucuianu M., Trif I., Cucuianu A. Hemostaza: biochimie, fiziopatologie clinică. Ed Dacia, Cluj Napoca 1994
  21. Cucuianu M., Vasile A., Popescu T.A., Crîșnic I., Tapalagă D. Clinical studies concerning factor XIII; with special reference to hyperlipemia. Thromb Diathes Haemorrh (Stuttgart), 1973, 30: 480-93
  22. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. Blood, 2008, 112 (1): 19-27
  23. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized

- mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(3):1004-8
24. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway. Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005, 25:1311
  25. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964;145:1310-2
  26. Ferreira CN, Sousa MdO, Dusse LMSA, Carvalho, MdG. A cell-based model of coagulation and its implications. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 2010. 32(5), 416-421
  27. Funk DMA. Coagulation assays and anticoagulant monitoring. *ASH Education Book*, 2012 vol.no. 1, 460-65
  28. Giannakopoulos B et al. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood*, 2007, 109: 422-30
  29. Gierer P, Hoffmann JN, Mahr F, Menger MD, Mittlmeier, Gradl G, Vollmar BT. Activated protein C reduces tissue hypoxia, inflammation, and apoptosis in traumatized skeletal muscle during endotoxemia. *Critical Care Medicine*. 2007, 35(8):1966-71
  30. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ* 2013;3:329-40
  31. Ida M., Satoh A., Matsumoto I., Kojima-Aikawa K. Human Annexin V Binds to Sulfatide: Contribution to Regulation of Blood Coagulation. *J. Biochem*, 2004, Vol. 135, No. 5: 583-88
  32. Ivanciu L, Krishnaswamy S, Camire RM: New insights in the spatiotemporal localization of prothrombinase in vivo. *Blood* 2014, 124(11): 1705-14
  33. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y. et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104(15): 6388-93
  34. Kerenyi A, Penzes K, Haramura G, Muszbek L. Factor XIII B subunit, a *S. aureus* protein A binding protein. Abstract presented at the XXII<sup>nd</sup> International Fibrinogen Workshop, Brighton (UK), July 4-6 2012
  35. Khan S, Dickerman JD. Review Hereditary thrombophilia. *Thrombosis Journal* 2006, 4:15
  36. Lipe B, Ornstein DL. Deficiencies of Natural Anticoagulants, Protein C, Protein S, and Antithrombin. *Circulation*. 2011; 124: e365-e368
  37. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature*. 1964;202:498-9
  38. Maiello M., Torella M., Caserta L., Caserta R., Sessa M. et al Hypercoagulability during pregnancy: evidences for a thrombophilic state . *Minerva Ginecol*. 2006 , 58 (5): 417-22
  39. Mandal S. K., Pendurthi U. R., MohanRao V. Cellular localization and trafficking of tissue factor *Blood*, 2006, Vol. 107, No. 12: 4746-53
  40. Mause S, Weber C. Microparticles. Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circulation Research*. 2010; 107: 1047-57
  41. Minger AM, Heimbürger N, Zeitler P, Kreth W, Schuster V. Homozygous type I plasminogen deficiency. *Semin Thromb Haemost*, 1997, 23 (3):259-69

42. Monagle P, Ignjatovic V, Savoia H. Hemostasis in neonates and children: Pitfalls and dilemmas. *Blood Reviews*, 2010 ,24( 2), 63–8.
43. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* 2011; 91: 931–72
44. Plawinski L, Anglés-Cano E. Membrane microvesicles: a circulating source for fibrinolysis, new antithrombotic messengers. *Haematologica* 2013; 98:e75-e76
45. Ratnoff. OD, Forbes CD. Disorders of hemostasis. Second Edition, W. B. Saunders Company, 1991
46. Rizza C., Lowe G. Haemophilia and other inherited bleeding disorders. W.B. Saunders Company, 1997
47. Roberts HR, Stinchcombe TE, Gabriel DA. The dysfibrinogenemias. *Br J Haematol.* 2001; 114(2):249-57
48. Rus HG, Cucuianu M, Manasia M C Spînu C, Cristea A, Nanulescu M. Plasma fibronectin and factor XIII in nephrotic syndrome *Rev Roum Médecine interne* 1987;25(2):105-11.
49. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, et al. Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost.* 2006;4(10):2103-14
50. Schroeder V, Kohler HP. New developments in the area of factor XIII. *J Thromb Haemost* 2013;11: 234–44
51. Skurk, T, Hauner, H. Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *International journal of obesity* 2004, 28(11), 1357-64.
52. Stief, T. W. Innovative Tests of Plasmatic Hemostasis . *Lab Med.* 2008, 39(4): 225-30
53. Stief TW, Otto S, Renz H. The intrinsic coagulation activity assay. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2006 ;17(5):369-78.
54. Stief TW, Wiczerzak A, Renz H. The extrinsic coagulation activity assay. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008 14(3):303-18
55. Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *Pharmacogenomics J*, 2007, 7: 99–111
56. Wendy Lim. Updates in Aggressive Thrombotic Disease: Antiphospholipid syndrome *Hematology* 2013 2013:675-80
57. Zimmerman, et al. Hemophilia: In Review. *Pediatrics in Review* 2013; 34:289-95



# 12

## Patochimia funcțiilor hepatice

Andrea Marta Fodor, Minodora Dobreanu

Ficatul este cel mai mare organ glandular din organism (masa acestuia la adult este de 1,2 - 1,5 kg). Din punct de vedere structural și funcțional, conține 4 sisteme diferite: a) parenchimul hepatic (hepatocitele), b) sistemul de drenaj biliar, c) sistemul vascular și d) sistemul monocito-macrofagic.

### 12.1 ELEMENTE STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE

#### 12.1.1 PARENCHIMUL HEPATIC

Unitatea structurală și funcțională a ficatului este lobulul hepatic; de formă poliedrică, aceste structuri sunt organizate în jurul venelor centrale lobulare și au în colțuri triada vasculară: venă portă (ramificații ale acesteia), arteră hepatică, duct biliar (*Figura 12.1*). Hepatocitele (aranjate în coloane) comunică între ele prin orificii deschise multiple (gap junctions) ale membranelor, fiind astfel capabile să funcționeze în ansamblu. Prin capacitatea lor funcțională mare și prin variatele lor funcții metabolice, ansamblul hepatocitelor reprezintă laboratorul biochimic central al organismului. Din punct de vedere structural, polul vascular (suprafața hepatocitelor situată spre sinusoidul hepatic) prezintă microvilozități ale membranei, care sub forma unei margini în perie mărește considerabil suprafața de contact cu sângele sinusoidelor (spațiul Disse); schimburile sunt amplificate și datorită faptului că nu există membrană bazală vasculară între hepatocite și celulele endoteliale (celulele endoteliale având spații largi între ele, în care se postează numeroase celule Kupffer – fagocite mononucleare). Polul biliar, dispune de un labirint bazal, mai puțin complicat. Aproximativ 75% din fluxul sanguin hepatic provine din vena portă, care aduce sângele din teritoriul intestinal. Circulația sanguină în interiorul lobulului hepatic (dinspre vena portă și artera hepatică spre vena centrolobulară) este inversă sensului de circulație al bilei în canaliculele biliare.

Citoplasma hepatocitelor este bogată în ergastoplasmă rugoasă, cu multe granule (ribozomi) și vezicule. La acest nivel are loc biosinteza multor proteine, lipo- și glucoproteine (fibrinogenul, factori de coagulare, reactanți de fază acută). La nivelul reticulului endoplasmatic neted și al aparatului Golgi, are loc transportul, depozitarea numeroșilor produși (glicogen, vitamine, lipide, metale) și exportul altora (glucoza, proteine, lipo- și glucoproteine, bila). Conținutul enzimatic bogat al hepatocitelor face posibilă desfășurarea tuturor transformă-

rilor biochimice metabolice, dintre care unele (oxidoreducerile, transferurile de radicali) sunt utilizate în scopul detoxifierii unor substanțe formate în organism sau pătrunse în el.

Din punct de vedere diagnostic, enzimele hepatocitelor pot fi cuprinse în 3 grupe majore:

1. Enzimele de secreție, ca pseudocolinesteraza și unii factori plasmatici de coagulare, care se secretă în sânge. Scăderea activității lor în plasmă reprezintă semnul unei leziuni hepatocelulare grave.
2. Enzimele de excreție: fosfataza alcalină, g glutamil-transpeptidaza, leucin-amino-peptidaza, 5-nucleotidaza, sunt formate în hepatocite sau celulele ductelor biliare și se excret prin bilă. Creșterea activității plasmatice a acestor enzime pledează pentru tulburarea drenajului biliar.
3. Enzimele indicatoare ale citolizei sunt enzimele proprii hepatocitelor, localizate fie în citoplasmă (C-enzime: GPT, aldolaza, LDH), fie în microsomi (M-enzime: GOT, GLDH). În condiții normale, aceste enzime ajung numai în cantități reduse în circulație (consecința reînnoirii fiziologice a hepatocitelor), ca urmare activitatea lor plasmatică este mică. În cazul unor leziuni hepatocelulare, pătrund în sânge întâi C-enzimele, iar în cazul unor leziuni mai grave, crește și activitatea plasmatică a M-enzimelor.

### 12.1.2 FUNCȚIILE METABOLICE ALE HEPATOCITELOR

#### 12.1.2.1 Metabolismul glucidelor

Gluciza sanguină este sursa energetică principală pentru majoritatea celulelor organismului, mai ales pentru acelea care folosesc preferențial gluciza: neuroni, elemente figurate sanguine. Ficatul joacă un rol central în metabolismul carbohidraților, în special în menținerea

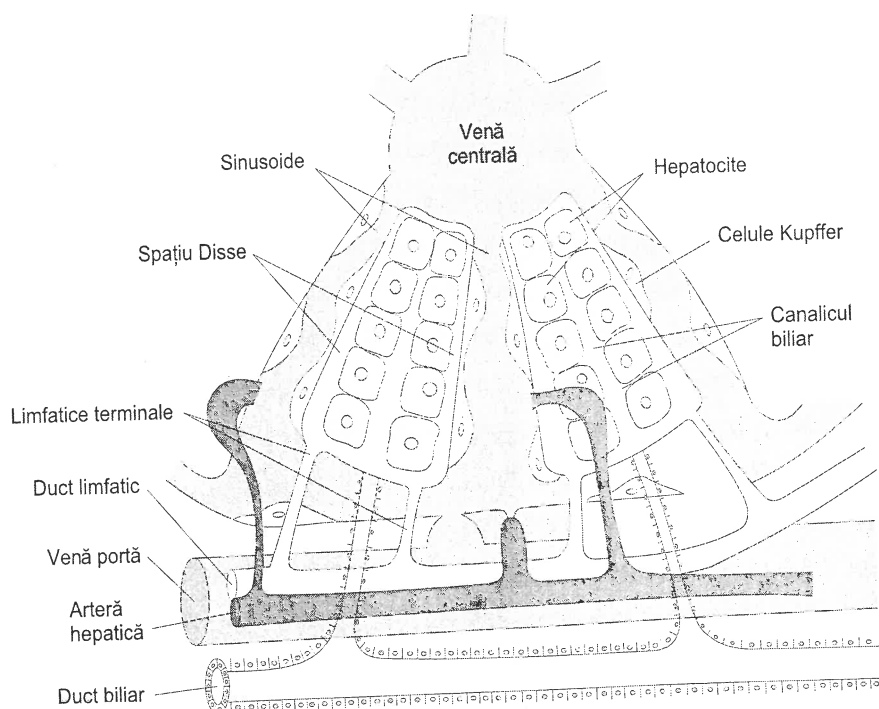


Figura 12.1. Structura lobulului hepatic

glicemiei. Această funcție depinde de capacitatea ficatului de a stoca excesul de glucoză postprandial, de a-l elibera în perioadele interprandiale și de a sintetiza de novo glucoză (vezi 15.1). Rezervele de glicogen ale hepatocitelor sunt limitate (aproximativ 80 g). În ciuda acestei cantități modeste, ficatul poate susține continuu concentrația constantă a glucozei sanguine, prin asigurarea raportului constant între glicogenoliză și glicogenogeneză. Lipsa congenitală a unor enzime implicate în glicogenoliză, se manifestă sub forma diferitelor glicogenoze, prezentate în *Tabelul 15.1*.

Dintre monozaharidele reabsorbite și transportate în ficat, manoza și fructoza se transformă spontan în glucoză, prin epimerizare. Transformarea galactozei în glucoză are loc prin intermediul UDP-glucozei și necesită activitatea galactoziltransferazei. Lipsa congenitală a acestei enzime duce la manifestarea galactozemiei. Pentozele sunt încadrate în șuntul pentozofosfatic al oxidării directe a glucozei. Produsul final al degradării anaerobe a glucozei în mușchi – lactatul, va ajunge înapoi la mușchi prin ciclul Cori (după neoformarea de glucoză): pe seama energiei eliberate în cursul oxidării a 20% din acidul lactic, 80% se transformă în glucoză (vezi 15.1.3).

#### 12.1.2.2 Metabolismul lipidelor

Hepatocitele transformă excesul de glucoză și de aminoacizi glucogenetici în grăsimi neutre și colesterol. Din excedentul de acetil CoA rezultat prin descompunerea acizilor grași în ficat se sintetizează corpii cetonic. În hepatocite se sintetizează trigliceride, fosfolipide, colesterol și acizi biliari, se activează vitamina D (25-hidroxilarea), se formează lipoproteinele VLDL și HDL. În hepatocitele cu funcție deficitară se limitează treptat capacitatea mobilizării lipidelor: din acest motiv poate apare o steatoză hepatică mai mult sau mai puțin accentuată.

#### 12.1.2.3 Metabolismul proteinelor

Atât anabolismul, cât și catabolismul proteinelor se desfășoară foarte intens în hepatocite. În ficat se sintetizează majoritatea proteinelor plasmatică (vezi 6.4) cu excepția  $\gamma$  globulinelor. Concentrația plasmatică a albuminei și mai ales a factorilor de coagulare II, VII, IX și X (determinată sub formă de activitate de protrombină) este un bun indice al capacității de sinteză hepatică. Proteinele din clasele alfa și beta globulinelor se sintetizează de asemenea la nivel hepatic, citokinele proinflamatorii (IL-6) având un important efect stimulator asupra producerii proteinelor de fază acută (vezi 6.4.6). Detoxifierea prin ciclul ureei (Krebs-Henseleit) a amoniacului eliberat prin dezaminarea aminoacizilor, are loc exclusiv în hepatocite (vezi și Capitolul 5.4). Creșterea amoniemiei (din cauza insuficienței sau lipsei detoxifierii amoniacului) este cauza comei hepatice, care se manifestă în faza finală a insuficienței hepatice.

#### 12.1.2.4 Funcția de depozit a ficatului

Constă în acumularea unor substanțe de rezervă, ca glicogenul, proteine, lipide, vitamine și unele oligoelemente. Ficatul servește și drept depozit de sânge mobilizabil. Ficatul poate stoca o cantitate de vitamină B12 suficientă pentru aproximativ 3-6 ani de zile, alături de vitamine liposolubile (A, D și K) și fier sub formă de feritină.

### 12.1.2.5 Funcția de detoxifiere a ficatului

Se realizează prin intermediul activității bogatului sistem enzimatic al hepatocitelor. Cu ajutorul diferitelor transformări biochimice catalizate de enzime, substanțele în exces (hormoni steroizi și polipeptidici, mediatori) sau toxice (amoniac, amine biogene) de origine endogenă și exogenă, pot fi neutralizate sau inactivate prin oxidare, reducere, proteoliză, transfer de radicali, (acetilare, glucuronare etc). Medicamentele liposolubile sunt transformate în produși hidrosolubili, după care se excretă în urină. Alcoolul (etanolul) suferă o oxidare primară la nivelul hepatocitelor. Rata de eliminare depinde de activitatea alcool dehidrogenazei.

### 12.1.3 Sistemul biliar și secrețiile biliare

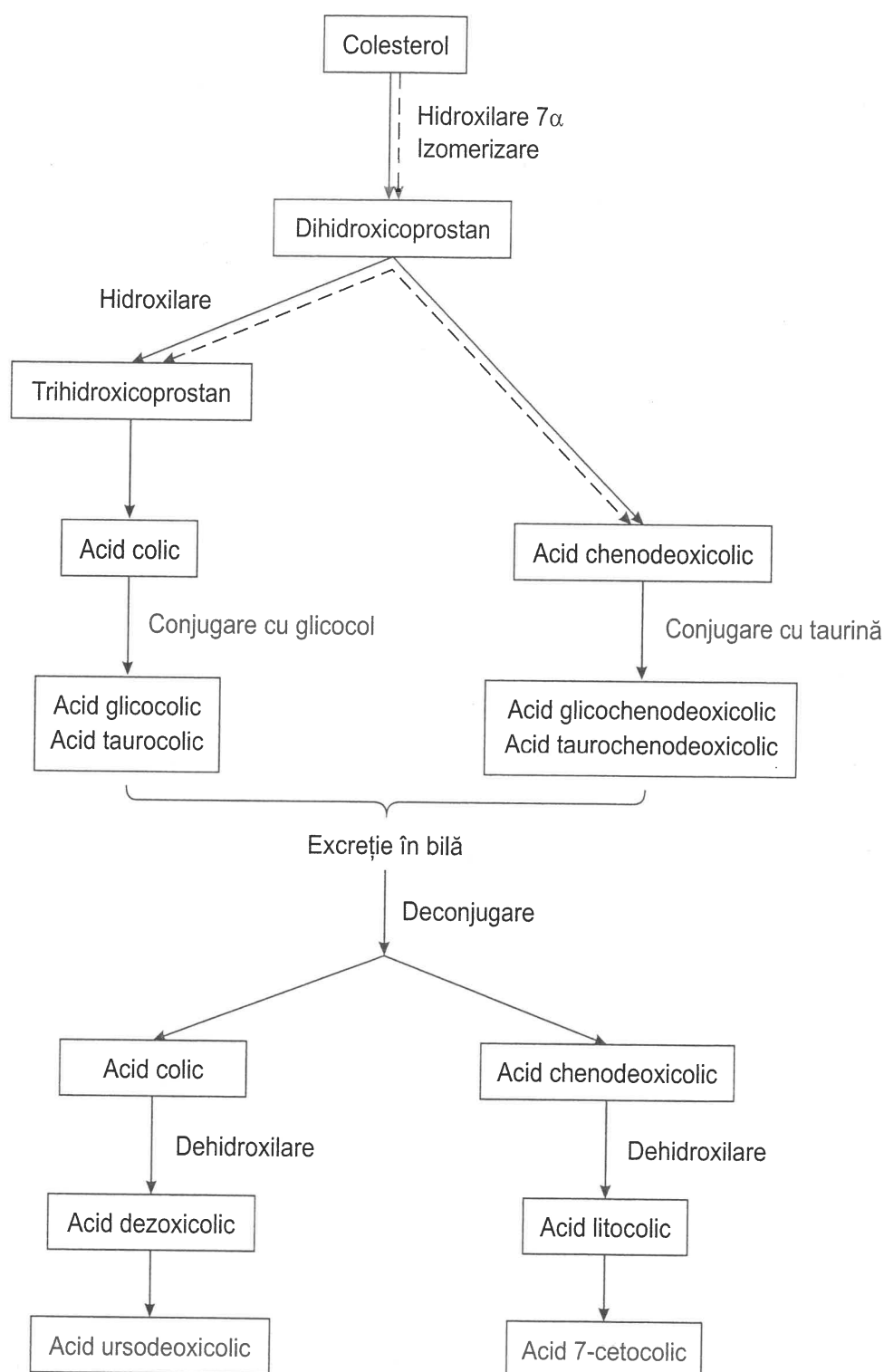
Microtubii biliari pornesc de la nivelul labirintului bazal al polului biliar hepatocitar (*Figura 12.1*) și se continuă cu conductele intercelulare, intralobulare și interlobulare, adunându-se în ductul coledoc, din care se desprinde ductul cistic spre colecist. Producția zilnică de bilă este între 800 - 1000 ml, care se elimină sub o presiune de 26 cm apă. Secreția biliară se oprește în cazul în care presiunea intracapsulară hepatică se ridică peste nivelul de 35 cm apă.

În compoziția bilei predomină apa, în care sunt dizolvați electroliți, sărurile acizilor biliari, bilirubina conjugată, lecitina, colesterolul liber, enzime, imunoglobuline (IgA), tironine etc. Modificarea compoziției bilei poate facilita apariția calculilor biliari.

#### 12.1.3.1 Sinteza acizilor biliari

Acizii biliari sunt substanțe polare, amfipatice, care acționează ca detergenți și emulgatori ai grăsimilor. La nivelul tractului intestinal favorizează absorbția lipidelor și a vitaminelor liposolubile, funcție denumită efect hidrotrop. Reduc tensiunea superficială, împreună cu fosfolipide și monogliceride participă la emulsionarea lipidelor, pregătindu-le pentru procesele de digestie și absorbție de la nivel intestinal.

Zilnic se sintetizează aproximativ 300-500 mg de acizi biliari. Sinteza are loc în reticulul endoplasmatic neted al hepatocitelor și se face din colesterol, prin hidroxilarea acestuia în poziția 7 și hidrogenarea la dubla legătură (rezultând  $3\alpha$ ,  $7\alpha$  dihidroxicoprostan-această etapă lipsește din procesul de biosinteză al acidului chenodeoxicolic). Aproximativ două treimi din acest produs se hidroxilează și în poziția 12, rezultând în final  $3\alpha$ ,  $7\alpha$  și  $12\alpha$  trihidroxicoprostan. Din acești precursori, la nivel mitocondrial au loc procese de oxidare ale lanțului lateral, rezultând acizii biliari primari: acidul chenodeoxicolic și respectiv acidul colic. Prin conjugare cu glicocolul și cu taurina se formează acizii glicocolic, taurocolic, respectiv glicochenodeoxicolic și taurochenodeoxicolic, în bilă aceștia ajungând sub forma sărurilor de  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$ . Sub acțiunea florei microbiene intestinale o parte din acizii biliari primari se vor transforma în acizi biliari secundari (prin dehidroxilare  $7\alpha$ ), respectiv din acidul colic va rezulta acidul dezoxicolic, iar din acidul chenodezoxicolic va rezulta acidul litocolic. Acizii biliari terțiari se formează la nivel hepatic prin transformarea unor metaboliți ai acizilor biliari reabsorbiți din intestin: acidul ursodeoxicolic, format prin reducerea unui metabolit colanic sau acidul 7-cetocolic, hidroxilat în pozițiile 3 și 7 fiind un stereoizomer al acidului chenodeoxicolic.



**Figura nr.12.2 Etape în sinteza acizilor biliari**

Din intestinul subțire acizii biliari primari se reabsorb împreună cu grăsimile și ajung înapoi în ficat, zilnic între 100 - 300 mg, de unde se excretă din nou, realizând un circuit enterohepatic. Aproximativ 90-95% din sărurile biliare sunt reabsorbite la nivelul porțiunii terminale a ileonului, printr-un mecanism de transport activ selectiv și foarte eficient. Sărurile biliare reabsorbite ajung prin intermediul venei porte la nivel hepatic, unde vor fi captate prin

intermediul unor receptori specifici, cu afinitate crescută față de acizii biliari trihidroxilați și conjugați, și cu afinitate mai redusă față de acizii dihidroxilați și neconjugați. În mod fiziologic, acizii biliari parcurg de 5-7 ori circuitul enterohepatic, înainte de a fi eliminați prin fecale. Acizii biliari se deversează în canaliculele biliare printr-un mecanism de transport activ. În bilă formează micelii cu colesterol și cu fosfolipide.

Aproximativ 5% din acizii biliari intestinali ajung la nivelul intestinului gros, unde se formează sărurile acizilor dezoxicolic și litocolic. Litocolatul prezintă o solubilitate scăzută în apă, în cea mai mare parte se elimină prin materiile fecale, aproximativ 1% se absoarbe, în timp ce dezoxicolatul se absoarbe în întregime. Procesul de absorbție este pasiv și nespecific, mai puțin eficient, acționează însă pe toată suprafața colonului.

O alimentație bogată în fibre alimentare, un tranzit intestinal accelerat și o floră microbiană corespunzătoare a intestinului subțire vor acționa în sensul reducerii cantității de acizi biliari reabsorbiți, eliminându-se zilnic aproximativ 300-500 mg de acizi biliare prin materiile fecale.

### 12.1.3.2 Reglarea sintezei și secreției acizilor biliari

Se realizează prin modularea activității enzimelor cheie cu rol în producerea acizilor biliari. HMG CoA (hidroximetilglutaril- coenzim A) reductaza și  $7\alpha$  colesterol hidroxilaza, sunt reprimare de către o cantitate crescută de acizi biliari reabsorbiți din intestin, iar scăderea reîntrăcerii biliare (drenaj biliar, tranzit intestinal accentuat, administrare de colestiramină) stimulează secreția la nivel hepatic prin dereprimarea lor. Scăderea secreției de bilă (ex. inaniție) și a motilității intestinale determină o creștere a producției de acizi biliari. Activitatea celor două enzime poate fi stimulată și pe cale hormonală (hormoni tiroidieni, cortizol) sau de agenți inductori: fenobarbital.

*Formarea fluxului biliar apos* se realizează prin atragerea apei în canaliculele biliare pe baza unui gradient osmotic – **flux biliar dependent de acizii biliari**. Presiunea osmotică va fi mai mare dacă se formează micelii cu dimensiuni reduse (număr mai mare de particule aflate în soluție), deci gradientul osmotic va favoriza formarea fluxului biliar apos.

În cazurile în care scade cantitatea de acizi biliari, curgerea bilei continuă printr-un **mechanism independent de acizii biliari**, asigurat printr-un proces de transport activ de sodiu în canaliculele biliare, activat de ATPaza Na/K dependentă.

Administrarea de teofilină (inhibitor al fosfodiesterazei) stimulează formarea fluxului biliar apos, iar fenobarbitalul (agent inductor al oxidoreductazelor microsomale) determină o creștere a secreției biliare.

### 12.1.3.3 Rolul fiziologic al acizilor biliari

Rolul acizilor biliari în metabolismul lipidelor este de a menține lipidele plasmatiche în soluție apoasă, înglobându-le în micelii, de a favoriza emulsionarea trigliceridelor și de a înlesni hidroliza acestora sub acțiunea lipazei pancreatice. Reprezintă un factor indispensabil pentru absorbția vitaminelor liposolubile și a colesterolului, principala cale de eliminare a colesterolului din organism și reglează propria sinteză printr-un mecanism de feed-back negativ.

Efectele asupra funcției colonului: limitează reabsorbția apei și a electroliților la nivelul mucoasei, având efecte de laxativ fiziologic. O cantitate crescută de acizi biliari (în special formele deconjugate și dehidroxilate), ajunsă la nivelul colonului (de ex. datorită unei reabsorbții scăzute la nivel intestinal) are un efect iritant cu creșterea secreției de apă și electroliți, determinând apariția unei diarei apoase.

#### 12.1.3.4 Determinarea concentrației fiziologice ale acizilor biliari

Actualmente este mai puțin utilizată, având în vedere limitele foarte largi de variație a concentrației acestor compuși. Valorile fiziologice ale acizilor biliari din ser, bilă duodenală și materii fecale sunt redate în *Tabelul 12.1*.

O concentrație a acizilor biliari care nu depășește 4 mmoli/L în sucul duodenal, recoltat după un prânz bogat în grăsimi, se consideră valoare cert scăzută a acizilor biliari.

**Tabelul 12.1 Valorile normale ale acizilor biliari în ser, bilă și materii fecale (3)**

	Interval de referință	Observații
Ser	0-6 $\mu$ moli/L	Acid colic 35% Acid chenodeoxicolic 43% Acid deoxicolic 22%
Bilă din duoden	4,1-30 mmoli/ L	Obținută după un prânz de probă
Materii fecale	0,6-1,3 mmoli/24 ore	Predomină acizii deoxicolic și litocolic

#### 12.1.3.5 Patologia acizilor biliari

*Deficitul de acizi biliari* se întâlnește în cazurile de scădere a reabsorbției biliare sau în afectarea sintezei lor la nivelul ficatului (insuficiență hepatică cronică în special la bolnavii cu ciroză hepatică cu steatoză).

Eliminarea sporită a acizilor biliari prin materiile fecale apare în afecțiunile intestinului subțire: atrofia mucoasei ileonului, dezvoltarea exagerată a florei microbiene intestinale, rezecții de ileon, fistule biliare și administrare de sechestranți ai colesterolului (colestiramină, colestipol).

În urma deficitului de acizi biliari aproximativ 25% din lipidele alimentare vor fi eliminate prin scaun, afectând grav mai ales absorbția vitaminelor liposolubile. Acizii biliari nereabsorbiți vor determina apariția unei diarei apoase, absorbția oxalaților cu oxalurie și formarea calculilor urinari.

Deficitul de reabsorbție a acizilor biliari se poate evidenția prin testul cu  $^{14}\text{C}$  colil- glicină (acid glicolic, marcat cu carbon radioactiv). Se administrează acid biliar marcat și se urmărește radioactivitatea materiilor fecale. În caz de malabsorbție a acizilor biliari nivelul radioactivității din materiile fecale depășește 80% din cantitatea administrată.

#### *Creșterea nivelului acizilor biliari*

Cauza cea mai des întâlnită a creșterii nivelului seric al acizilor biliari este reprezentată de

stările de colestază intra- și extrahepatică. Orice proces de colestază determină creșterea nivelului seric al acizilor biliari de la valorile normale de 0-6  $\mu\text{mol/L}$  până la concentrații de peste 100  $\mu\text{mol/L}$ .

Colestazele extrahepatice sunt determinate de obstrucția mecanică a coledocului. Întreruperea fluxului biliar duce la creșterea nivelului seric al acizilor biliari și a celorlalți compuși eliminați prin bilă: colesterol, fosfolipide, bilirubină conjugată.

Creșterea acizilor biliari în colestazele intrahepatice se realizează prin mecanisme variate. Se consideră anomaliile de hidroxilare și de transport din hepatocite spre canaliculele biliare, difuzarea lor din canalicule în interstițiu, cu scăderea fluxului biliar apos și reducerea secreției de acizi biliari. Scăderea fluxului biliar apos determină stagnarea bilei în canaliculele biliare, cu formarea „trombilor biliari” și lezarea microvililor din canalicule. Pe lângă aceste fenomene trebuie luate în considerare procesele inflamatorii care duc la comprimarea ductelor biliare, lezarea și fibrozarea lor.

În colestazele intrahepatice, în general în perioadele de debut ale bolii, creșterea în ser a acizilor biliari precede apariția icterului. În fazele avansate apare și eliminarea defectuoasă a bilirubinei conjugate, cu dezvoltarea icterului. Alterarea progresivă a funcției hepatocitelor se finalizează cu fibrotizarea parenchimului hepatic, dezorganizarea arhitecturii hepatice și dezvoltarea cirozei biliare.

**Rolul acizilor biliari în formarea litiazei biliare:** modificarea compoziției bilei (scăderea proporției de acizi biliari și/sau fosfolipide), precum și creșterea concentrației în colesterol favorizează precipitarea acestuia și formarea calculilor biliari. În condiții normale colesterolul din bilă este menținut în stare solubilă de către acizi biliari și lecitină, împreună cu care formează miceli, dar modificări relativ mici ale compoziției biliare sunt capabile să declanșeze formarea de cristale, care ulterior se vor transforma în calculi. Aproximativ 10-20% din populația generală prezintă calculi biliari, iar în țările industrializate 85% din calculi sunt de origine colesterolică. Dacă se reușește creșterea conținutului sărurilor biliare în bilă, calculii biliari pot fi dizolvați. Calculii de bilirubinat de calciu apar dacă bilirubina conjugată se deconjugă sub acțiunea glucuronidazei de origine bacteriană. Bilirubina liberă formează cu calciul bilirubinat de calciu, insolubil în bilă.

Alături de modificarea compoziției bilei, în patogeniza litiazei biliare contribuie o serie de alți factori de risc, cum ar fi: hipotonia vezicii biliare, obezitatea la sexul feminin sau procesele inflamatorii ale căilor biliare.

**Toxicitatea acizilor biliari** are la bază proprietățile tensioactive ale acestor substanțe. Astfel participă la patogeniza gastritelor, a ulcerului gastric, a diareilor apoase din disfuncția ileonului, a pancreatitelor și la apariția pruritului la bolnavii cu colestază. În cazul ocluziilor biliare acizii biliari se acumulează în sânge și pe baza acțiunii lor de detergent, provoacă senzația de mâncărime a tegumentelor, reduc tensiunea superficială a urinei eliminate.

Steatorea apare și în bolile ileonului terminal, sau după îndepărtarea chirurgicală a acestuia: se întrerupe circuitul enterohepatic, iar ficatul nu va fi capabil de a compensa pierderile de săruri biliare, afectând grav metabolismul lipidic.

Patologia pancreatică de origine biliară apare mai ales la bolnavii cu calculi biliari, stricături coledociene sau spasme ale sfincterului Oddi, când se produce o creștere a presiunii în căile biliare cu refularea bilei în ductul pancreatic. În consecință apar leziuni ale acinilor pancreatici, dezorganizarea membranelor celulare, lipoliza țesutului adipos peripancreatic și edemațiarea pancreasului, consecutiv activării fosfolipazei A2 și a lipazei pancreatice. În cazurile severe se ajunge la activarea proteazelor, autodigestia glandei, dezvoltarea pancreatitei necrotico-hemoragice. Nivele serice permanent crescute ale acizilor biliari (de exemplu în ciroza biliară) par a contribui la instalarea fibrozei pancreatice.

#### 12.1.4 SISTEMUL VASCULAR HEPATIC

Sângele venos adunat din regiunea splanhnică, conținând substanțele reabsorbite în intestin este transportat în ficat prin sistemul venei porte. Ramificându-se conform structurii lobulare hepatice, ramurile terminale ale venei porte se sfârșesc în sinusoidale interhepatocelulare. Tot în aceste sinusoidale se termină și ramificațiile finale ale arterei suprahepatice (vezi *Figura 12.1*). O proporție de 2/3 din volumul sângelui sinusoidal provine din sistemul portal și 1/3 din artera suprahepatică. Sinusoidalele nu dispun de membrană bazală, sunt delimitate numai de celulele Kupffer și de hepatocite, care (prin marginile lor în perie) la nivelul polului lor vascular, intră în contact direct cu sângele din sinusoidale.

Reglarea circulației hepatice se realizează prin funcționarea sfincterelor valvulare pre- și postsinusoidale. Astfel, ficatul reprezintă și un depozit important de sânge, care în condiții patologice, poate fi și blocat (barajul hepatic, descris de Mauthner). În perioadele postprandiale debitul portal scade, dar această scădere este compensată prin creșterea fluxului arterial.

#### 12.1.5 SISTEMUL MONOCITO-MACROFAGIC

Prin celulele Kupffer, ficatul dispune de 90% din elementele sistemului monocito-macrofagic al organismului. Sistemul reticulo-endotelial al ficatului intervine în modularea proceselor de reparare și restructurare la nivelul țesuturilor lezate. Sistemul reticulo-endotelial hepatic participă la eliminarea agenților patogeni și al diferitelor antigene transportate la nivel hepatic prin intermediul venei porte. Anihilarea antigenelor are loc prin fagocitare de către celulele Kupffer, care produc collagenază, hidrolaze, interleukine, factor de necroză tumorală, etc. Alături de această funcție importantă de apărare celulară nespecifică, hepatocitele mai produc și o gamă largă de reactanți de fază acută, inclusiv antiproteaze. Formarea acestor reactanți este declanșată prin acțiunea activatoare (derepresoare) a interleukinei-6 (IL-6), eliberată din macrofage. Din această cauză, gradul de apărare al organismului împotriva consecințelor distructive ale reacțiilor inflamatoare este substanțial condiționată de starea funcțională a ficatului. Ca urmare, în asemenea cazuri, explorarea funcțiilor hepatice este de o importanță majoră. Aproximativ jumătate din cantitatea totală de limfă din organism se produce la nivelul ficatului.

## 12.2 EXPLORAREA DE LABORATOR A FUNCȚIILOR HEPATICE

Bolile hepatice se clasifică în afecțiuni hepatocelulare, colestază intra- sau extrahepatică și afecțiuni infiltrative. Pentru stabilirea diagnosticului diferențial este nevoie de datele anamnestice (în special în cazurile cu anemie hemolitică, boala Gilbert, sindromul Dubin-Johnson, boala Wilson, hemocromatoză sau deficitul de alfa-1 antitripsină), de examenul fizic și de rezultatele explorărilor paraclinice.

Probele funcționale hepatice cuprind: testele pentru evidențierea leziunilor hepatocelulare; testele pentru identificarea tulburărilor funcționale celulare, inclusiv electroforeza proteinelor plasmatice; testele pentru investigarea epurației pe cale biliară a unor substanțe din plasmă; testele pentru explorarea secreției biliare. Poate fi nevoie de determinări serologice. Printre testele care pot fi necesare dar care nu intră în categoria testelor de rutină pentru explorarea funcției hepatice se numără dozarea cantitativă și fenotiparea alfa-1 antitripsinei, dozarea imunoglobulinelor de tip IgA, IgG și IgM, dozarea ANA, anticorpilor antimitocondriali, anticorpilor anti-muschi neted, anticorpilor antimicrosomiali de tip 1 renali și hepatici, alfa-1 fetoproteinei. Dozarea amoniacului este utilă în cazurile de sindrom Reye, în afecțiunile ciclului ureei sau în anumite acidurii organice. Pentru diagnosticul diferențial al icterelor se recomandă determinarea activității LDH-ului și determinarea izoenzimelor LDH.

Nu există nici un test de laborator capabil să aprecieze global funcția hepatică, sensibilitatea și specificitatea testelor uzuale fiind limitate. În practică se folosesc combinații de teste care, împreună cu datele clinice se utilizează pentru stabilirea diagnosticului și a prognosticului bolii.

**Hepatitele alcoolice** se caracterizează prin creșteri ale AST-ului care depășesc creșterile ALT-ului (raportul de Ritis peste 2,0 și activitatea AST nu depășește 250 U/l). Pentru evidențierea alcoolismului cronic pot fi utile dozarea nivelului plasmatic al transferinei deficitare în carbohidrați, MCV (volumul eritocitar mediu), albumina, folatul, trigliceridele, GGT și bilirubina.

**Colestazele și afecțiunile căilor biliare** determină o creștere a ALP, GGT, bilirubina totală, numărul de eozinofile, acizi biliari în urină. În colestazele extrahepatice ALP depășește de 2-3 ori valoarea superioară a intervalului de referință, AST nu depășește 300 U/l. Colestazele intrahepatice se caracterizează prin nivelele foarte ridicate de ALP.

În **hepatitele virale** AST depășește ALT, dar în bolile hepatice cronice raportul De Ritis nu este foarte informativ.

În cazurile clinice de hepatită în care creșterea nivelului LDH depășește activitatea AST, poate fi utilă determinarea izoenzimelor LDH (izoenzimele LDH 4 și LDH5 fiind de origine hepatică). Un parttern izomorf poate fi întâlnit în mononucleoză infecțioasă, infecție CMV, tumoare, ciroză sau hepatită alcoolică.

Hepatitele virale și cele induse medicamentos pot genera o creștere a activității transaminazelor care depășește de peste 1000 ori valoarea superioară a intervalului de referință în primele 1-2 săptămâni de boală, iar în cazul hepatitelor virale necomplicate revine la valoarea de bază după aprox. 6 săptămâni. Rezultatele pozitive ale testelor de serologie hepatică pot

sustține o hepatită virală. Un rezultat serologic negativ pune în discuție o altă etiologie, de exemplu cea medicamentoasă.

**Hepatitele cronice** includ hepatitele cronice cauzate de virusurile hepatitice B, C, D, și hepatitele autoimune. Clinic, aceste hepatite seamănă cu steatohepatitele alcoolice și non-alcoolice. Steatohepatitele non-alcoolice (NASH) pot avea ca și singură manifestare creșterea activității aminotransferazelor, cu raport De Ritis peste 1.

În **cirozele hepatice** apar de obicei semnele unei imunostimulări: scăderea nivelelor de albumină și alfa-2 globuline, prezența unei gamopatii poli- sau oligoclonale, pod beta-gamma. Gamopatia oligoclonală poate fi prezentă în mai puțin de 50% din cazurile de hepatite autoimune.

**Hepatitele autoimune** se caracterizează prin hipergammaglobulinemie (în peste 80% din cazuri), prezența autoanticorpilor (ANA, anticorpi anti-mușchi neted, anticorpi anti-microsomiali hepatici și renali, anticorpi anti-celulă hepatică solubili), creșterea aminotransferazelor, a bilirubinei, a fosfatazei alcaline, a imunoglobulinelor (în special IgG).

**Hepatitele** dezvoltate pe un **teren ischemic** pot fi întâlnite în stările de insuficiență cardiacă și hipotensiune. Se caracterizează prin valori ale transaminazelor care depășesc 10 000 U/l și LDH extrem crescut. Asemenea valori cescute ale transaminazelor pot fi prezente și în hepatitele cauzate de supradozările de paracetamol sau de infecțiile de herpes simplex.

**Boala Wilson** se manifestă prin afectare hepatică, hemoliză, ceruloplasmină plasmatică scăzută, hipocupremie și hipercuprurie.

În **hemocromatoză** testele funcționale hepatice (AST, ALT, ALP) sunt ușor modificate, se modifică sideremia, transferinemia, nivelul de feritină.

**Deficitul de alfa1-antitripsină** se caracterizează prin prezența unui fenotip alterat de alfa1-antitripsină (homozigotie PiZZ sau alte alele patologice).

### 12.2.1 METODE DE EXPLORARE A LEZIUNILOR HEPATOCELULARE

Au ca scop determinarea activității C- și M-enzimelor (GPT, LDH, aldolaza, respectiv GLDH, GOT – vezi *Capitolele 10.3-10.5*), eliberate în urma leziunilor hepatocelulare. Cele mai utilizate enzime în diagnosticul afecțiunilor hepatice sunt menționate în tabelul 12.II.

AST se găsește în citosolul și în mitocondriile hepatocitelor. Cele mai frecvente cauze ale creșterii nivelului plasmatic al AST sunt alcoolismul cronic și ciroza hepatică. În hepatitele alcoolice  $AST > 250 \text{ U/l}$ , raportul  $AST/ALT > 2,0$ . În necrozele hepatice toxice ALT este la fel de crescută ca și AST sau chiar depășește AST-ul. În hepatitele virale raportul  $AST/LDH$  depășește 3, iar  $AST > 500-3000 \text{ U/l}$ .

Alte cauze ale creșterii AST: fazele incipiente ale hemocromatozei, colecistite, coledocolitază, colangita. În hepatitele ischemice, insuficiență cardiacă și hipotensiune transaminazele depășesc brusc  $10\,000 \text{ U/l}$ . Transaminazele cresc în steatoza hepatică non-alcoolică ( $AST$  și trigliceride crescute), boala Wilson, sindrom Reye, mononucleoza infecțioasă.

Există medicamente care cauzează scăderea AST: allopurinol, ciclosporină, progesteron, etc. Marea majoritate a medicamentelor utilizate determină creșterea nivelului AST: acetami-

**Tabelul 12.II Clasificarea enzimelor serice cu rol în diagnosticul afecțiunilor hepatice, în funcție de specificitate**

Enzima	Colestază	Necroză hepatică	Afecțiune hepatică cronică	Alte afecțiuni (cardiace, musculare sau cerebrale)
<b>Grupa I: Enzime care indică în primul rând colestază hepatică, mai puțin afectare hepatocitară</b>				
ALP, GGT	↑↑↑	↑	↑	±
<b>Grupa II: Enzime care indică în primul rând afectare hepatocitară, mai puțin colestază</b>				
<b>A -Afectare hepatică și boli extrahepatice</b>				
AST, LDH	↑	↑↑↑	↑	↑
<b>B –Specificitate hepatică</b>				
ALT	↑	↑↑↑	↑	↑
<b>C- Specificitate crescută pentru afecțiuni hepatice</b>				
LDH5	↑	↑↑↑	↑	
<b>Grupa III: Fără specificitate hepatică</b>				
CK	N	N	N	↑

N: Valoare de referință

nofen, amiodaronă, amitriptilină, steroizii anabolizanți, antiepilepticele, acidul ascorbic, aspirina, carbamazepina, cefalosporinele, clorambucil, clorotizidul, clorpromazina, ciclosporina, diclofenac, eritromicina, fluconazol, gentamicină, haloperidol, halotan, hidralazin, ibuprofen, indometacina, alfa-2 interferon, izoniazid, izoproteenol, levodopa, metildopa, levodopa, lovastatin, etc. Acetaminofenul (paracetamol) poate cauza hepatotoxicitate gravă, mai ales la alcoolici, chiar în doze medii. Această afectare se poate manifesta prin bilirubinemie totală de 1,3- 23,9 mg/dl, AST de 1.960-29.700 U/l, ALT de 12.000-12.550 U/l. Este caracteristică apariția coagulopatiei și o creștere a nivelului AST care depășește pe cea a ALT-ului.

ALT, alături de AST este un marker al afectării hepatocitare, cu specificitate marcată pentru afectarea hepatică.

ALP se sintetizează în endoteliul canaliculelor biliare și se eliberează în bilă. Nivelul ALP plasmatic crește în afecțiunile hepatice infiltrative, colestatice și inflamatorii. Nivele de ALP pot fi crescute și în cazul obstrucției canaliculelor biliare secundare, când nivelul bilirubinei nu este crescută. Cauzele creșterii nivelelor plasmatiche de ALP pot fi clarificate prin electroforeza izoenzimelor ALP și testarea paralelă a activității GGT.

GGT este o enzimă (peptidază) secretată odată cu bila. Nivelele plasmatiche de GGT cresc în special la bolnavii cu icter obstructiv, colestază intrahepatică și pancreatită. Se recomandă determinarea activității în special la bolnavii cu transaminaze crescute. În obstrucțiile biliare activitatea GGT depășește de 5-50 ori pragul superior al intervalului de referință. În hepatitele virale valorile rareori depășesc de 5-ori pragul superior al intervalului de referință. Nivele sunt crescute și în hepatoame și carcinoame pancreatice.

Creșterea nivelului plasmatic al izoenzimei LDH5 caracterizează leziunile musculaturii striate (traumatisme) și afecțiunile hepatice (stază hepatică, insuficiență cardiacă, hepatită,

ciroză, alcoolism cronic). Creșterea LDH5 este un marker mai specific al afecțiunilor hepatice decât creșterea aminotransferazelor (AST, ALT), în special dacă nivelul plasmatic al CK nu depășește limitele fiziologice.

În cazul leziunilor grave, necrotice, feritina depozitată în hepatocite pătrunde în sânge și duce la creșterea marcată a sideremiei. Cea mai însemnată creștere a sideremiei (prin feritină eliberată în exces și transferina saturată la maxim) se întâlnește în hemocromatoză. În asemenea cazuri, din cauza funcțiilor deficitare ale hepatocitelor, cantitatea reactanților de fază acută în plasmă este semnificativ mai mică.

## 12.2.2 TESTE PENTRU INVESTIGAREA TULBURĂRILOR FUNCȚIONALE HEPATOCITARE

### 12.2.2.1 Investigarea ratei producției și eliberării în sânge a unor enzime de secreție

Sinteza deficitară a factorilor de coagulare vitamina K dependenți (PIVKA) în disfuncțiile hepatice, determină diateze hemoragice. Deficitul de vitamină K se poate datora și unui deficit de absorbție, aceasta fiind o vitamină liposolubilă, a cărei absorbție intestinală este afectată de deficitul de acizi biliari. Deficitele de absorbție pot fi diferențiate de cele cauzate de lipsa vitaminei K astfel: după determinarea timpului de protrombină (Quick), se administrează pacientului parenteral 10 mg vitamina K. În cazul în care la un interval de 72-96 de ore valoarea timpului Quick devine normală, a fost vorba de o reabsorbție insuficientă a vitaminei K. Cazul în care diateza hemoragică persistă și în urma administrării vitaminei K pledează pentru existența tulburărilor funcționale ale hepatocitelor.

În afecțiuni hepatice minore valoarea timpului Quick nu se modifică, dar în cazul hepatitelor acute, toxice sau virale, prelungirea cu mai mult de 5 secunde a timpului Quick denotă o insuficiență hepatică fulminantă.

Timpul de protrombină (timpul Quick) nu este un marker specific funcției hepatice.

Gama-glutamil-transpeptidaza se eliberează din endoteliul vascular și biliar lezat. Creșterea activității enzimei semnalizează o microvasculită sau/și colangită. Valori crescute apar și în perioada tardivă (regenerativă) a infarctului miocardic, în mod caracteristic și la bolnavii cu etilism cronic.

### 12.2.2.2 Investigarea disproteinemiei

Ficatul sintetizează marea majoritate a *proteinelor plasmatiche*:  $\alpha$  și  $\beta$  globulinele (mai puțin  $\gamma$  globulinele, care sunt sintetizate de către limfocitele B), cum ar fi  $\alpha$ 1-antitripsina, ceruloplasmina, respectiv transferina și feritina, care pot fi utilizate în diagnosticul și monitorizarea hemocromatozei. În hemo-cromatoză transferina se saturează cu fier și nivelul plasmatic al feritinei crește considerabil.

Țesutul hepatic are capacitatea de a-și suplimenta sinteza proteică de mai multe ori în stările patologice cu pierderi de proteine. Proteinograma de tipul inflamației acute, subacute și cronice, cu scăderea cantității albuminelor și creșterea alfa, beta și gama-globuline-

lor policlonale (cu baza largă), este caracteristică mai ales în ciroza hepatică, dar și în alte stări patologice caracterizate prin distrucție tisulară. În serul bolnavilor cu hepatită B apare antigenul viral B de suprafață (AgHBs), iar la cei cu tumoră hepatică primitivă, antigenul asociat cancerului,  $\alpha 1$  fetoproteina. Probele de disproteinemie, utilizate anterior ca probe hepatice, din cauza caracterului lor global, lipsit de specificitate, nu se mai folosesc pentru scopuri diagnostice.

*Albumina plasmatică* se sintetizează în cantitate de 10-15 g zilnic de către ficat, reprezentând aproximativ 3% din cantitatea totală de albumină a organismului, iar timpul său de înjumătățire este de 20 de zile, din care cauză afecțiunile hepatice acute nu se reflectă prin scăderea albuminemiei. Nivelul albuminei serice depinde de starea de nutriție al persoanei. Numeroase afecțiuni gastrointestinale și renale cauzează scăderi ale albuminei în ser.

*Imunoglobulinele* serice cresc cantitativ în marea majoritate al afecțiunilor hepatice cronice. Cauza acestei creșteri o constituie afectarea funcțională a sistemului monocito-macrofag sau șuntarea acestui sistem prin șunturile porto-cave, când ficatul nu-și mai poate îndeplini funcția de filtrare a sângelui. Bacteriemia, care apare în mod fiziologic în sângele transportat de către vena portă dinspre colon, produce o stimulare antigenică cronică a țesuturilor limfatice extrahepatice, ceea ce va determina apariția hiper  $\gamma$ -globulinemiei cronice.

Nivelul *globulinelor plasmatic* crește moderat în hepatitele acute și prezintă o creștere marcată în hepatitele cronice active, îndeosebi în formele autoimune.

Creșterea nivelelor imunoglobulinelor plasmatic este puțin specifică, dar ciroza biliară primară se caracterizează prin creșterea fracțiunii IgM. În hepatitele de origine etilică se întâlnesc nivele crescute de IgA, iar hepatitele cronice active se caracterizează prin nivele de IgG crescute.

Evidențierea unor *anticorpi* poate avea rol diagnostic în unele cazuri, cum ar fi hepatitele virale și mononucleoza infecțioasă.

*Autoanticorpii antimitocondriali* apar în mod constant în ciroza biliară primitivă, ei putând fi evidențiați în titru crescut la peste 95% din bolnavii cu ciroza biliară primară. Acești autoanticorpi pot fi evidențiați și la bolnavii cu hepatită cronică activă, hepatită toxică de origine medicamentoasă și în colagenoze. Nu apar în obstrucțiile mecanice ale căilor hepatice sau în colangita primară sclerotizantă, având astfel un rol important în diagnosticul diferențial al acestor boli.

În hepatitele autoimune cronice pot apărea anticorpi formați față de componente ale mușchilor netezi: anticorpi anti-actină sau anticorpi antimicrozomiali. Evidențierea și dozarea acestor autoanticorpi nu are valoare diagnostică și nu contribuie în mod fundamental la stabilirea diagnosticului.

*$\alpha$ -fetoproteina (AFP)* este o proteină oncofetală, se sintetizează în ficatul fetal, nivelul ei plasmatic se normalizează la sfârșitul primului an de viață (<20 ng/mL). În carcinoamele hepatocelulare atinge valori considerabile. Nivelul AFP se corelează cu volumul tumorii, și poate fi folosit în scop de screening în grupurile la risc. Există câteva afecțiuni care se caracterizează prin valori crescute ale AFP (peste 400 ng/mL): teratocarcinoame embrionare,

hepatoblastom, rar în metastazele tumorilor tractului gastro-intestinal și în unele forme ale colangiocarcinoamelor.

În hepatitele fulminante poate depăși nivelul de 1000 ng/mL, în hepatitele acute și cronice se ating nivele mai scăzute, de aproximativ 100-400 ng/mL, care denotă fenomenul de regenerare a hepatocitelor.

### 12.2.2.3 Investigarea dislipidemiei

Creșterea VLDL (trigliceridelor endogene) și scăderea HDL este un semn al inflamației vasculobiliare. În stări toxice (etilism), se reduce capacitatea hepatocitelor de a mobiliza grăsimile, ducând la manifestarea steatozei hepatice. Scăderea raportului între cantitatea colesterolului esterificat și liber (normal 7:3) semnalează o tulburare a funcțiilor hepatocitare. În stări de colestază poate apare în ser o lipoproteină patologică, bogată în fosfolipide: lipoproteina X (LP-X), cu direcție de migrare electroforetică spre catod.

### 12.2.2.4 Toleranța la glucide și derivații acestora

Testul de toleranță la glucoza administrată oral se pozitivează, iar proba de încărcare cu galactoză devine pozitivă: în urina recoltată timp de 5 ore după consumul a 40 g galactoză, se elimină o cantitate mult mai mare de galactoză netransformată în glucoză (peste 3 g).

Capacitatea hepatocitelor de a transforma în glucoză acidul lactic rezultat în glicoliza anaerobă, este limitată. La bolnavi cu insuficiență hepatică, lactacidemia crescută persistă în funcție de gravitatea insuficienței hepatice.

### 12.2.2.5 Explorarea capacității de detoxifiere a hepatocitelor

În acest scop se folosește proba formării acidului hipuric: pacientul ingeră 6 g de benzoat de sodiu. În urina eliminată la 4 ore după administrarea substanței, se determină cantitatea acidului hipuric, care în condiții normale trebuie să depășească valoarea limită de 3,5 g. În cazul funcțiilor hepatice alterate, se elimină o cantitate redusă, proporțională cu gravitatea leziunilor. Proba pozitivă se poate normaliza în urma administrării alături de benzoatul de sodiu a glicinei, necesară pentru conjugarea cu acidul benzoic.

Consecința cea mai gravă a insuficienței hepatice totale o constituie scăderea detoxifierii amoniacului prin afectarea ureogenezei. În condiții normale, majoritatea amoniacului rezultat în periferie este detoxificat la locul de formare (prin interacțiunea cu acidul glutamic rezultând glutamina); excedentul intră în vena portă și este preluat de către ficat. Ca urmare, în insuficiența hepatică crește rapid cantitatea amoniacului în sânge. Sistemul nervos central este foarte sensibil la efectele toxice ale acestei substanțe, deoarece printr-o difuziune neionică, amoniacul traversează direct membranele neuronilor. În condiții normale, amoniacul plasmatic variază între 10 - 70  $\mu\text{mol/L}$  (17- 120  $\mu\text{g/dL}$ ). La valori de peste 75  $\mu\text{mol/L}$  (130  $\mu\text{g/dL}$ ), apar semnele comei hepatice, greu reductibilă (de cele mai multe ori lasă sechele nervoase permanente - encefalopatia hepatică).

### 12.2.3 TESTE PENTRU EXPLORAREA EPURĂRII HEPATICE A UNOR SUBSTANȚE DIN PLASMĂ

Unele substanțe formate și eliberate în țesuturile extrahepatice, ca fosfataza alcalină în țesutul osos și intestinal sau introduse în organism pentru scopuri diagnostice (bromsulfonftaleina = BSP), sunt extrase din sânge de către hepatocite și se excretă în bilă. Determinarea activității serice a fosfatazei alcaline indică gravitatea unei obstrucții biliare. Proba cu BSP se folosește de asemenea pentru investigarea capacității de extracție și epurație a hepatocitelor: dintr-o soluție sterilă de BSP se injectează i.v. 5 mg/kg corp. La 45 minute după administrare, se determină cantitatea de BSP rămasă în sânge. În cazul unei extracții hepatice normale, cantitatea BSP reținută în sânge după 45 de minute, este mai mică decât 5 % din cantitatea totală administrată. Valori de peste 5 % pledează pentru scăderea gradului de extracție hepatică a substanței administrate.

Alte teste care explorează capacitatea de epurare a ficatului: testul de expirare a 14C-aminopirinei (testul demetilării citocrom  $P_{450}$ -dependente), și capacitatea de eliminarea a galactozei, care este un test de fosforilare a galactozei, sau testul formării de monoetil glicin xilidid (MEGX) după administrare de lidocaină intravenos *in bolus*.

Dozarea produșilor de conjugare ai bilirubinei în plasmă, cum ar fi dozarea  $\alpha$ -izoenzimei glutatation-s-transferazei plasmatice pare a fi un test mai sensibil și mai specific al leziunilor hepatice decât dozarea activității aminotransferazelor.

### 12.2.4 TESTE PENTRU EXPLORAREA SECREȚIEI BILIARE

Cantitatea, aspectul și compoziția chimică, celulară și microbiană-parazitară a bilei se examinează cu ajutorul tubajului duodenal: prin intermediul sondei Einhorn, introduse în duoden, se recoltează bila A existentă (secrețiile duodenale), bila B (cistică) obținută în urma provocării contracției vezicii biliare cu sulfat de magneziu și bila C (hepatică) secretată după golirea vezicii biliare. Frațiunile recoltate se examinează biochimic și microscopic; cele obținute în condiții sterile, se examinează și din punct de vedere microbiologic.

Hepatocitele dispun de o capacitate funcțională foarte mare. Păstrarea numai a 10 % din capacitatea lor funcțională totală poate fi suficientă pentru asigurarea necesităților metabolice de bază ale organismului. Din acest motiv, în vederea aprecierii stării funcționale reale a ficatului, este necesară explorarea mai multor parametri.

Secreția acizilor biliari: acizii biliari reabsorbiți din intestin și necaptați la nivel hepatic ajung în circulația sistemică, nivelele serice prezentând o evoluție paralelă cu gravitatea insuficienței hepatice. În insuficiența hepatică cresc mai mult acizii biliari secundari, în timp ce în colestază cresc acizii biliari primari. Diferențierea celor două tipuri de acizi biliari presupune efectuarea unor investigații cromatografice.

## 12.3 PATOCHIMIA ICTERELOR

### 12.3.1 PIGMENȚII BILIARI

Bilirubina rezultă prin degradarea hemului din molecula de hemoglobină, eliberată din hematii îndepărtate din circulație de către elementele sistemului reticulo-endotelial (SRE) (Figura 12.3). Fierul conținut în hem va fi refolosit, iar inelul tetrapirolic va fi degradat de hemoxigenază (un citocrom  $P_{450}$ ), trecând prin produsul intermediar biliverdină (reduc de către biliverdin-reductază) până la bilirubină. Din cantitatea de 250-350 mg de bilirubină produsă pe zi (în primul rând în urma degradării hematiilor îmbătrânite), 15% provine din descompunerea enzimelor heminice (catalaza, peroxidazele, citocromii, triptofan-pirolaza etc.), respectiv din distrugerea eritroblaștilor imaturi în măduva roșie.

Insolubilă în apă, bilirubina "liberă", neconjugată se transportă în sânge sub formă legată de albumină, formă în care nu poate traversa bariera hematoencefalică și nu se excretă în urină (Figura 12.4). Această formă se numește bilirubină indirectă (neconjugată), deoarece reacționează la diazotare numai în urma eliberării prealabile de pe albumină.

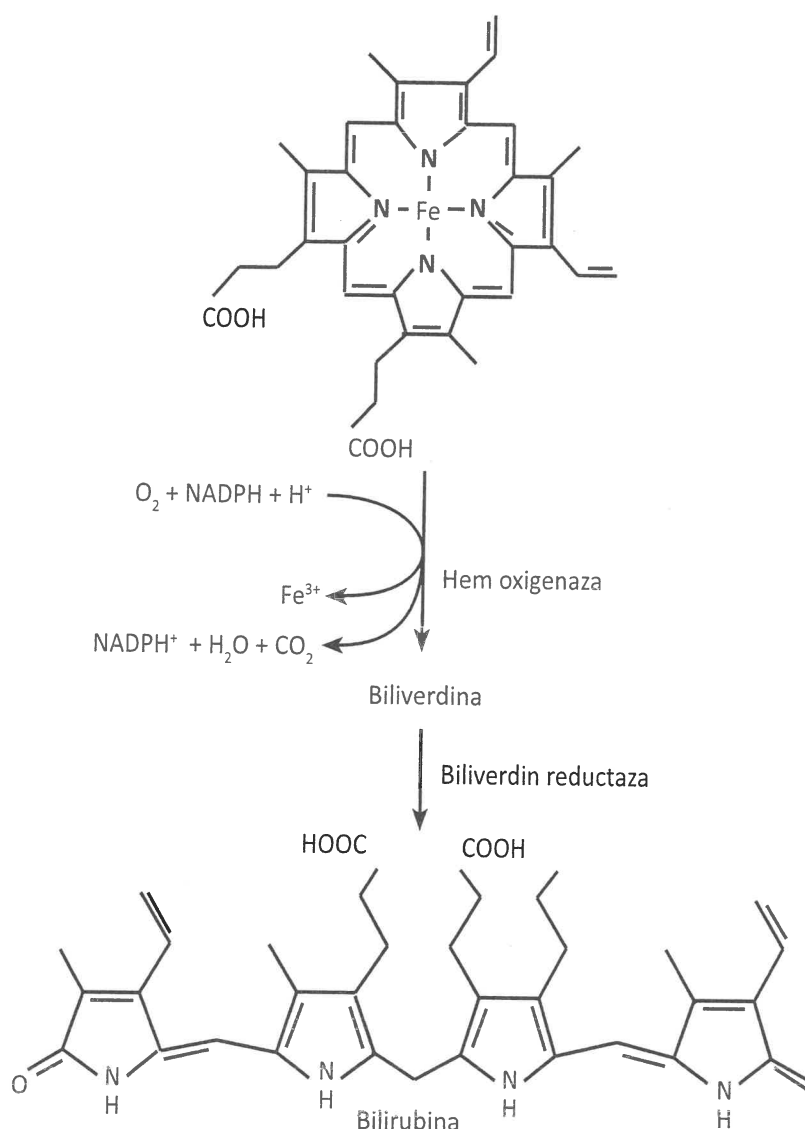
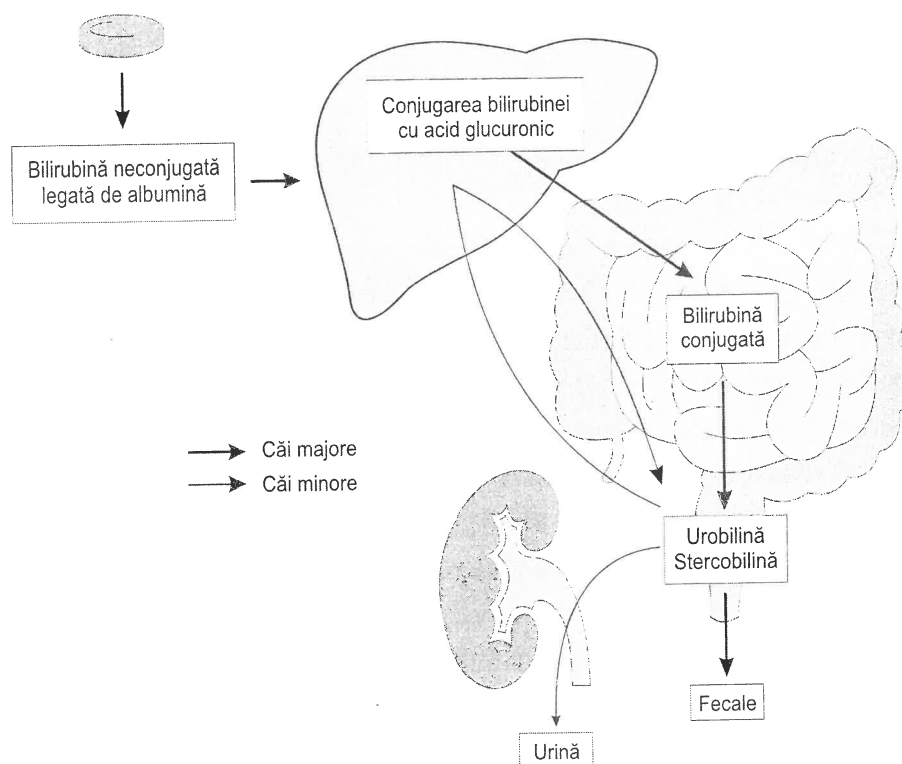


Figura 12.3 Schema reacțiilor de formare a bilirubinei



**Figura 12.4 Formarea și eliminarea fiziologică a bilirubinei**

Hepatocitele preiau bilirubina legată de albumină din sângele sinusoidelor, prin fixarea ei pe 2 proteine de transport intracelular (Y și Z). Aceste proteine transportă bilirubina prin canalele reticulului endoplasmatic neted, în interiorul cărora are loc conjugarea enzimatică a pigmentului cu câte 2 molecule de acid glucuronic, catalizată de UDP-glucuronil – transferază. În urma glucuronării, bilirubina devine solubilă în apă și se excretă în canaliculele biliare și astfel ajunge în intestinul subțire. Excreția bilirubinei în canaliculele biliare este etapa limitantă de viteză a metabolismului bilirubinei. Această fracțiune a bilirubinei se numește bilirubină directă (conjugată), deoarece reacția de diazotare are loc direct. În intestinul subțire, sub acțiunea reducătoare a florei bacteriene, bilirubina se transformă succesiv în mezobilină, apoi în mezobilingen (o substanță incoloră numită impropriu și urobilinogen – Ubg) și în final în stercobilinogen, care se elimină prin materiile fecale sub forma compusului oxidat – Stercobilină (principala formă de eliminare din organism a produșilor de catabolism ai bilirubinei, care imprimă scaunului culoarea brună).

O parte a urobilinogenului se absoarbe din intestin și ajunge în circulația portală, parcurgând astfel circuitul enterohepatic. Ficatul nu captează însă întreaga cantitate de urobilinogen: o mică parte ajunge în circulația sistemică și se excretă în urină. Urobilinogenul se elimină în urină, într-o cantitate care nu depășește 3,5 - 4 mg/zi.

În condiții normale, aproximativ 95% din bilirubina plasmatică se găsește sub formă neconjugată, care nu se filtrează la nivel glomerular (fiind legată de albumină), deci nu apare în urina persoanelor sănătoase. Bilirubinuria reflectă creșterea concentrației plasmatice a bilirubinei conjugate, constituind un semn patologic.

Afecțiunile hepatice nu sunt în mod obligatoriu însoțite de hiperbilirubinemie (de exemplu în cirozele hepatice compensate, bilirubina poate fi normală) și nu reflectă întotdeauna o afecțiune hepatică (putând fi cauzată de un carcinom de pancreas în stadiu avansat).

Plasma normală conține între 8,6 - 21  $\mu\text{mol/L}$  (0,5-1,2 mg/dL) bilirubină. Valorile moderat crescute (25-50  $\mu\text{mol/L}$ , respectiv 1,5-3 mg/dL) ale bilirubinemiei determină subicter, deoarece nu duc la depuneri vizibile de bilirubină în tegumente și țesuturi. Icterul se manifestă la valori de peste 50  $\mu\text{mol/L}$  (3 mg /dL) ale bilirubinemiei.

### 12.3.2 CLASIFICAREA ICTERELOR

Icterele sunt cauzate de creșterea concentrației de bilirubină din plasmă, manifestată prin apariția unei colorații gălbui la nivelul pielii, a sclerelor și la nivelul țesuturilor. Această colorație devine vizibilă prima dată la nivelul sclerelor, la lumină naturală, dacă nivelul bilirubinei plasmatice depășește 2-2,5 mg/dL (34-43  $\mu\text{mol/L}$ ).

Scopul dozării bilirubinei totale din ser este diagnosticarea și monitorizarea bolilor hepato/biliare și hemolitice.

Interval de referință: adulți 0,3-1,0 mg/dl, aproximativ 70% fiind bilirubina indirectă (ne-conjugată). La nou-născuți valorile limită ale intervalului de referință se determină în funcție de vârstă (figura 12.5)

Bilirubinemia de peste 15 mg/dl la nou-născuți la termen și de 10-15 mg/dl la prematuri reprezintă posibile valori de alertă.

Cauzele hiperbilirubinemiei: boli hepato-biliare, malnutriție, malabsorbție, anemii hemolitice, embolie pulmonară/ infarct pulmonar, insuficiență cardiacă, medicamente.

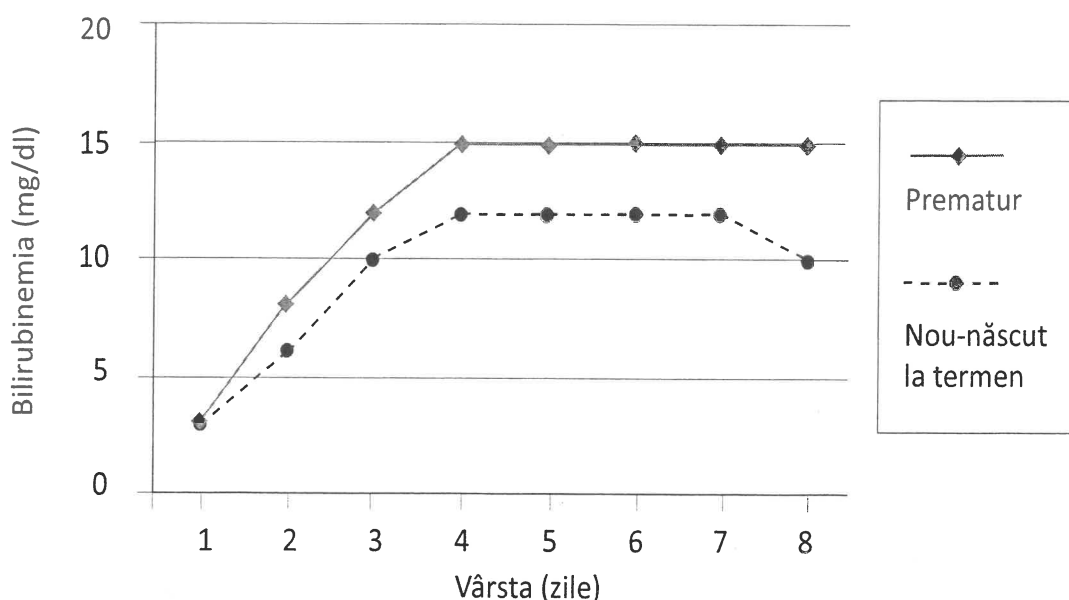


Figura 12.5 Pragul superior al intervalului de referință al bilirubinei la nou-născuți, în prima săptămână de viață (mg/dl)

Cauzele hiperbilirubinemiilor:

- boli hepato-biliare: vezi clasificarea icterelor.
- boala Wilson (insuficiență hepatică acută cu hiperbilirubinemie  $>30$  mg/dl, indice ALP/ bilirubină  $<2,0$ ).
- malnutriție, înfometare (de peste 36 ore) sau anorexie prelungită determină creșteri moderate ale bilirubinemiei.
- afecțiuni hematologice: vezi clasificarea icterelor
- infarct sau embolie pulmonară,
- insuficiență cardiacă congestivă
- medicamente: vezi medicamentele care cauzează afectări hepatocitare.

Un indice bilirubină totală în lichidul de ascită/ bilirubină serică  $>6,0$  permite diferențierea exudatelor (procese maligne) de transudate cu o precizie de aproximativ 80%.

Clasificarea cea mai frecvent utilizată a icterelor este aceea pe baza mecanismului de apariție:

- Ictere prehepatice (creșterea producției de bilirubină, cu predominanța bilirubinei neconjugate);
- Ictere hepatice (datorate capacității hepatice scăzute de a prelua, conjuga sau elimina bilirubina - în care atât bilirubina neconjugată, cât și cea conjugată sunt crescute);
- Ictere posthepatice (datorate obstrucțiilor pe căile biliare - cu predominanța bilirubinei conjugate).

O altă clasificare a icterelor ia în considerare tipul de bilirubină prezentă în cantitate crescută în plasmă. Astfel se vorbește de hiperbilirubinemie neconjugată, hiper-bilirubinemie conjugată și mixtă. În cele mai multe cazuri, se dezvoltă o hiperbilirubinemie mixtă, deoarece afecțiunile hepatice și obstrucția căilor biliare sunt manifestări ale aceleiași boli. Evidențierea în laborator a fracțiunilor bilirubinei (bilirubină directă și indirectă) este importantă în vederea diagnosticului diferențial al bolilor care evoluează cu hiperbilirubinemie conjugată sau neconjugată. În cazul afecțiunilor hepatocelulare și a celor cu obstrucție biliară cuantificarea celor două fracțiuni ale bilirubinei nu contribuie în mod esențial la stabilirea diagnosticului.

### 12.3.2.1 Hiperbilirubinemiile neconjugate

Dacă hiperbilirubinemia este cauzată de creșterea bilirubinei neconjugate, bilirubina totală rareori depășește  $100 \mu\text{mol/L}$  ( $5,84 \text{ mg/dL}$ ) la adult (*Figura 12.6*). Cauzele cele mai frecvente ale hiperbilirubinemiilor neconjugate sunt **stările de hemoliză** (afecțiuni imunologice, hematii sau hemoglobine cu structură anormală, hemoliza extravasculară) și **anomaliile genetice ale preluării hepatice a bilirubinei neconjugate**. Clasificarea icterelor cu bilirubină neconjugată în funcție de caracterul înăscut sau dobândit este prezentată în *Tabelele 12.III și 12.IV*. Hemoliza intravasculară are ca rezultat eliberarea hemoglobinei în plasmă, unde aceasta este oxidată la methemoglobină sau este captată de haptoglobină și transportată la ficat. Hemoliza extravasculară (mai frecventă decât prima) se realizează de către fagocitele SRE, în interiorul cărora se formează bilirubina neconjugată, care este apoi preluată de albumină și

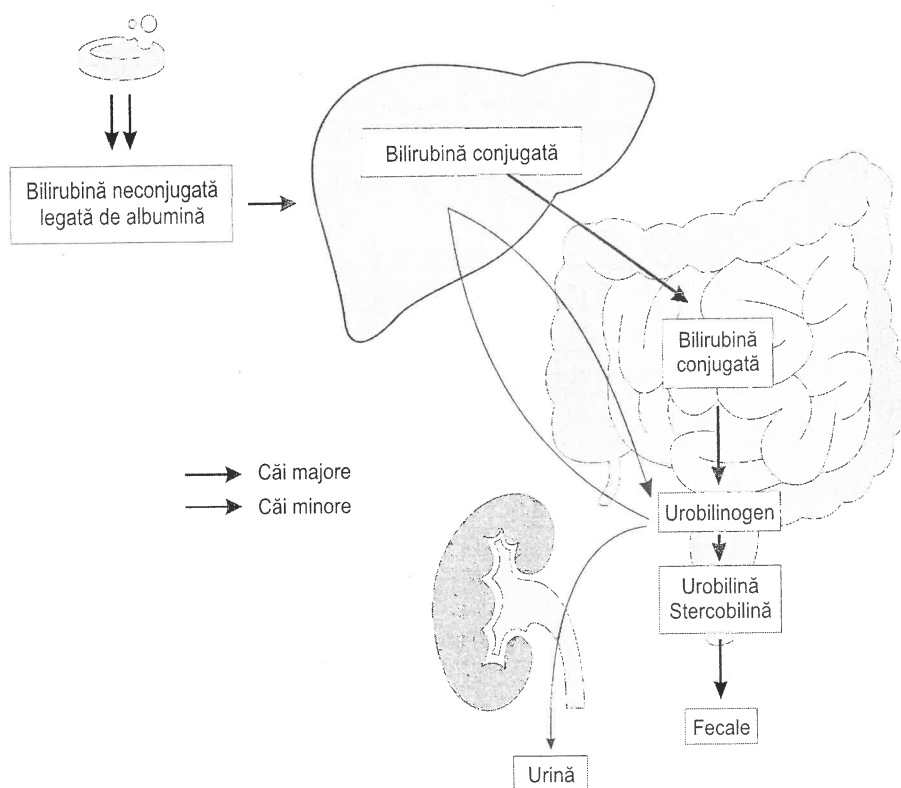
**Tabel 12.III Cauzele hiperbilirubinemiilor dobândite (hiperbilirubinemii neconjugate).**

Cauze	Patologie
Producție crescută	Anemii hemolitice: anemii hemolitice autoimune (lupus eritematos sistemic, droguri)
	Eritropoeză inefectivă: deficit de vitamină B12 și foliați
Captare afectată	Droguri: rifampicină, substanțe de contrast
	Fiziologic: icterul nou-născutului
	Hepatită virală
	Boli cronice hepatice
Conjugare defectuoasă	Șunt portocaval
	Icterul fiziologic al nou-născutului
	Incompatibilitate ABO
	Icterul la laptele de mamă
Hepatopatii cronice	Hepatite virale
	Defecte în sistemul de transport intrahepatocitar sau canalicular
	Hepatite virale
	Fibroză cistică
	Colestază benignă din timpul sarcinii
	Droguri
	Defecte la nivelul ducturilor biliare interlobulare/septale
	Atrezie biliară intrahepatică
	Ciroză biliară primară
	Colangită sclerozantă primară
	Atrezie biliară extrahepatică
	Calculi în ductul biliar comun
	Carcinom al vezicii biliare
	Colangiocarcinom
	Carcinom al ductului biliar comun sau al ampulei Vater
	Carcinom de cap de pancreas

**Tabel 12.IV Cauzele hiperbilirubinemiilor ereditare (hiperbilirubinemii neconjugate).**

Cauze	Patologie
Producție crescută	Anemii hemolitice ereditare: anemii hemolitice extravasculare (sferocitoză congenitală, sickle cell disease)
	Eritropoeză inefectivă: beta-talasemie severă
Captare-conjugare defectuoasă	Sindrom Gilbert
Conjugare defectuoasă	Sindrom Gilbert, sindrom Crigler-Najjar
Hiperbilirubinemie conjugată	Sindrom Dubin-Johnson, sindrom Rotor

transportată la ficat pentru conjugare. Hiperbilirubinemia apare dacă rata formării bilirubinei depășește capacitatea de captare al ficatului. Nivelul plasmatic al bilirubinei în general nu depășește 3-5 mg/dL (51-86  $\mu\text{mol/L}$ ). Dacă bolnavul prezintă concomitent și o afecțiune hepatică, chiar moderată, icterul va fi mult mai pronunțat, iar în plasmă apar creșteri ale nivelelor de bilirubină conjugată și neconjugată, deoarece este afectată și excreția bilirubinei în canaliculele biliare.



**Figura 12.6 Icterul prehepatic – hemolitic**

Icterul tranzitoriu al nou-născutului apare în mod fiziologic în zilele 2-4 după naștere, datorită imaturității sistemului enzimatic hepatic, de conjugare a bilirubinei (predomină forma indirectă a bilirubinei) și durează 8-10 zile. În mod normal concentrația bilirubinei nu depășește 8-10 mg/dL (125-160  $\mu$ mol/L) – poate fi mai sever însă, la copiii născuți prematur. Valorile crescute ale bilirubinei indirecte pot deveni periculoase (de obicei dacă depășesc 15-17 mg/dL) datorită faptului că bilirubina neconjugată (liposolubilă) este toxică pentru creier (kernicter). Fototerapia (UV) transformă bilirubina în fotoizomeri nontoxici, hidrosolubili, care pot fi eliminați prin bilă. Icterul precoce al nou-născutului (în primele 24 ore) sau tardiv (după ziua a 10-a de la naștere) sunt patologice, putând fi cauzate de stări de hemoliză patologice sau de defecte ale căilor biliare.

Alte cauze ale icterului neonatal: galactozemie, sepsis, hepatită, sifilis, toxoplasmoză, rubeolă, infecție CMV, deficitul de G-6-P DH sau de piruvat kinază.

Anumite medicamente competiționează cu bilirubina pentru locusurile de legare de pe albumină, ocupându-le pe acestea. Această bilirubină devenită „liberă” trece prin bariera hemato-encefalică, cauzând intoxicația sistemului nervos central.

Anomaliile genetice ale preluării și conjugării bilirubinei de către ficat, sunt prezente la aproximativ 5% din populația generală.

**Icterul la laptele matern (sindromul Lucey-Driscoll):** apare după vârsta de 2-3 săptămâni la nou-născuți sănătoși, alăptați cu lapte matern. Printre factorii declanșatori se consideră: substanțe care influențează negativ excreția de bilirubină, activitatea scăzută a glucuronil transferazei și prezența hormonilor steroidici în laptele matern. Starea generală a copiilor afectați este de obicei bună, răspunde favorabil la suspendarea alăptării sau înlocuirea laptelui de mamă.

**Sindromul Gilbert** este o afecțiune cu importanță clinică minoră, care se datorează unui deficit funcțional ușor al glucuronil transferazei. Simptomul principal îl constituie hiperbilirubinemia indirectă moderată și izolată, care de multe ori impune diferențierea de o hepatită cronică. În acest sens se poate folosi testul de administrare de acid nicotinic, care determină creșterea sintezei de bilirubină la nivel hepatic, care se manifestă prin creșterea bilirubinei neconjugate. La persoanele cu sindrom Gilbert această creștere a bilirubinemiei este mult accentuată față de cea văzută la persoanele sănătoase.

Această afecțiune în cele mai multe cazuri este descoperită la adulți tineri, care se prezintă la consultație medicală pentru acuze necaracteristice. Se transmite autozomal recesiv, fiind cea mai frecventă cauză ereditară de hiperbilirubinemie indirectă / neconjugată.

**Sindromul Crigler-Najjar** are la bază un deficit genetic al UDP-glucuronil transferazei, transmis autozomal recesiv. Se descriu două forme: tipul I (deficit total), cu hiperbilirubinemie gravă. Bolnavii suferind de această formă decedază de obicei în primul an de viață prin icter nuclear. În tipul II (deficit parțial, cu scăderea semnificativă a activității enzimatice), hiperbilirubinemia este mai puțin gravă,  $<20 \text{ mg/dL}$  ( $<342 \mu\text{mol/L}$ ). Acest tip de icter poate fi tratat prin administrare de fenobarbital, deoarece inducția enzimatică crește activitatea enzimei. În general, boala evoluează fără afectare neurologică.

Hiperbilirubinemia de șunt primară este o afecțiune rară, familială, benignă.

### 12.3.2.2 Hiperbilirubinemiile mixte conjugate și neconjugate

Sunt cauzate de disfuncții hepatocitare generalizate, în care apar și alte modificări biochimice și serologice caracteristice hepatolizei (Figura 12.7).

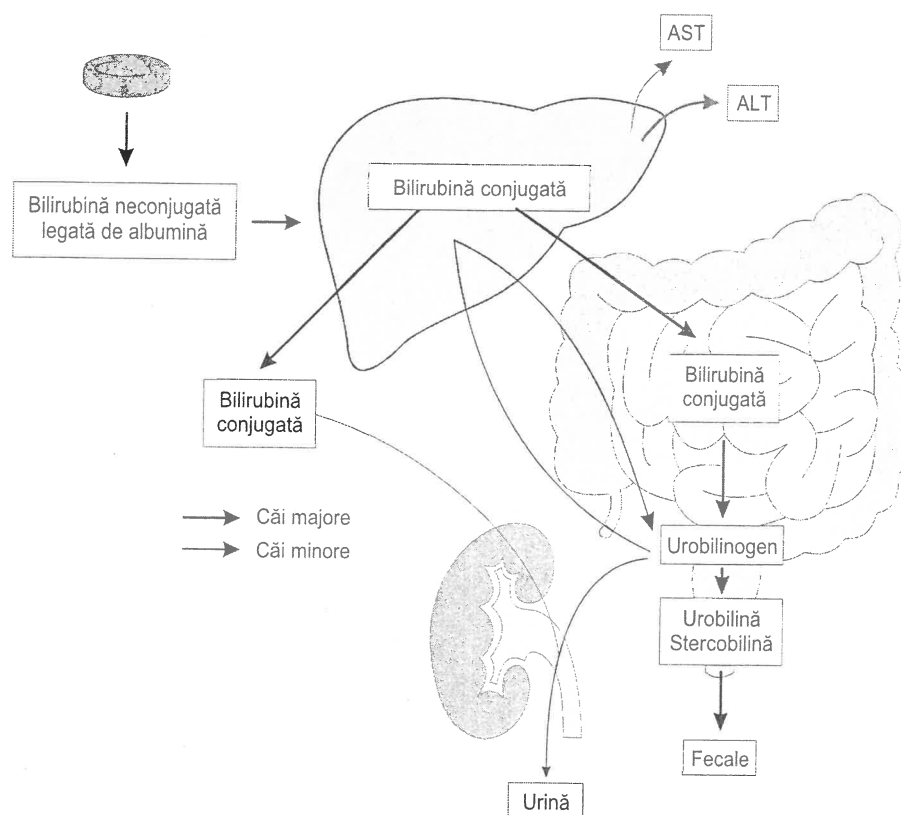


Figura 12.7 Icterul hepatic

### 12.3.2.3 Hiperbilirubinemiile conjugate

Sunt cauzate de eliberarea în circulația sanguină a bilirubinei din hepatocitele afectate sau din canaliculele sistemului biliar, datorită unei obstrucții biliare. Mecanismele care duc la apariția colestazei sunt multiple: afectarea funcțională a enzimelor hidrolitice microzomale, scăderea activității ATP-azei Na-K dependente, necesare menținerii fluxului biliar din canaliculele biliare, modificarea structurii membranei celulare și a vîscozității acestor membrane, afectarea funcției microfilamentelor și resorbția accentuată a componențelor bilei. În obstrucțiile biliare parțiale sau totale bilirubina nu ajunge în intestin, nu se formează stercobilinogen, iar scaunul va avea o culoare deschisă (Figura 12.8). Se dezvoltă o hiperbilirubinemie mixtă, bilirubina conjugată se evidențiază în urină în cantitate crescută. Scaunul poate devini hipocolic, deoarece în intestin ajunge o cantitate scăzută de bilirubină. Lipsa acizilor biliari afectează absorbția lipidelor și a vitaminei K, determinând steatoree și hipoprotrombinemie. Stările de colestază îndelungată pot contribui la dezvoltarea osteoporozei sau a osteomalaciei prin afectarea absorbției calciului și a vitaminei D. Hiperlipidemia plasmatică este cauzată de lipsa eliminării colesterolului și a fosfolipidelor, respectiv de creșterea sintezei hepatice a colesterolului și esterificarea colesterolului în plasmă. În plasmă se regăsește fracțiunea lipoproteinei-X, o fracțiune patologică de LDL. Bilirubina conjugată va fi excretată în urină, conferind urinei o culoare brună-portocalie caracteristică.

#### Hiperbilirubinemiile conjugate necolestatice

**Sindromul Dubin-Johnson** se produce datorită incapacității de secreție a bilirubinei conjugate din microzomii hepatici în canaliculele biliare. Secreția acizilor biliari nu este afectată,

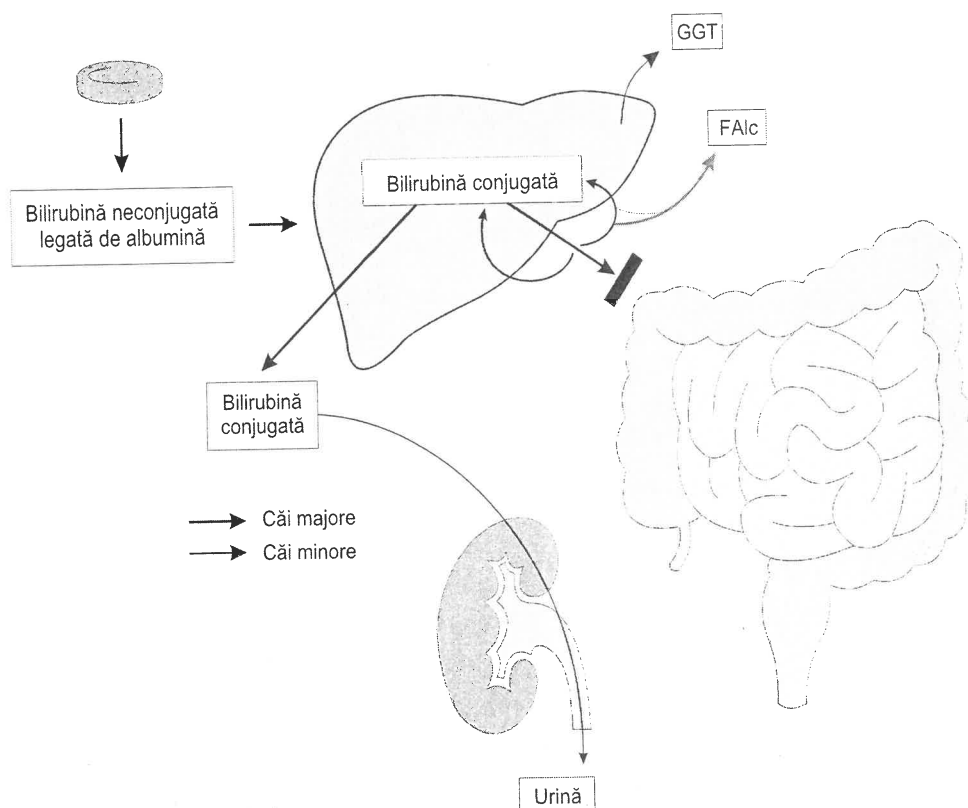


Figura 12.8 Icterul posthepatic

în timp ce secreția unor anioni organici și a bilirubinei este afectată, aceasta din urmă depunându-se intrahepatocitar. Se transmite autosomal recesiv și determină apariția unui icter fără acuze clinice.

**Sindromul Rotor** se aseamănă cu sindromul Dubin-Johnson, dar evoluează fără depunere de pigment. Dozarea fracțiunii conjugate și a celei neconjugate este deosebit de importantă în special în diagnosticul diferențial al icterelor neonatale.

Dacă nivelul bilirubinemiei plasmatice nu depășește 100  $\mu\text{mol/L}$  (5,89 mg/dL) și celelalte teste funcționale hepatice au valori normale, se consideră că avem de a face cu o hiperbilirubinemie neconjugată, ceea ce trebuie confirmată și prin dozarea bilirubinei urinare (în această situație, bilirubina urinară trebuie să fie absentă).

Rolul determinărilor uzuale de laborator în stabilirea diagnosticului este limitat. Este caracteristică creșterea activității fosfatazei alcaline (sinteză hepatică accentuată și excreție redusă), nivelul plasmatic al bilirubinei reflectă mai mult gravitatea afecțiunii, dar nu oferă informații în legătură cu etiologia bolii. Activitatea aminotransferazelor depinde de etiologie, nivelele plasmatice sunt în general moderat crescute. Creșteri exprimate ale activității acestor enzime se corelează cu prezența unor afecțiuni hepatocelulare, dar pot fi cauzate și de colestază extrahepatică (de exemplu colestază acută de origine litiazică.)

Creșterea concomitentă a amilazei pancreatice denotă colestază extrahepatică.

La bolnavii cu hiperbilirubinemie conjugată persistentă poate fi pusă în evidență o a treia fracțiune a bilirubinei, cea legată de albumină prin legături covalente (bilirubină- $\delta$ ), cu timp de înjumătățire similar cu cel al albuminei. Această fracțiune persistă în plasmă și după rezolvarea afecțiunii hepatice sau a obstrucției biliare, ceea ce explică cazurile de hiperbilirubinemie persistentă în lipsa bilirubinuriei.

Câteva elemente de diagnostic diferențial al icterelor sunt redată în *Tabelul 12.V*.

**Tabel 12.V Diagnosticul diferențial al icterelor**

Parametru	Ser		Urină		Fecale	ALT	FALc
	Bi totală	Bi conj	Bi	Ubg	Culoare		
Stare							
Normal	0,5-1,2 mg/dL	0-0,2 mg/dL	negativ	0,5-3,5 mg/zi	brună	<39 U/L	<190 U/L
Icter prehepatic	↑	normal	negativ	↑	brună	normal	normal
Ictere hepatice							
Afecțiuni hepatocelulare	↑	↑	pozitiv	↓/normal	brun deschis	↑↑	↑
S. Gilbert	↑	normal	negativ	↓/normal	brună	normal	normal
S. Crigler-Najjar	↑	↓	negativ	↓	brun deschis	normal	normal
S. Dubin - Johnson	↑	↑	pozitiv	↓/normal	brun deschis	normal	normal
Icter posthepatic	↑	↑	pozitiv	↓/absent	deschis/ decolorat	normal	↑↑

### 12.3.2.4 Clasificarea icterelor în funcție de etiologie

În funcție de etiologie, icterele pot fi prin șunt, de producție, de transport, de conjugare, de secreție și de stază.

1. Icterele prin șunt (sunt forme rar întâlnite) apărute în urma unor afectări medulare ale eritropoiezei, care duc la distrugerea precoce a elementelor roșii imature.
2. Icterele de producție apar în urma unor hemolize masive, din cauza unor anomalii corpusculare sau extracorpululare (toxice, autoimune, hemoglobinopatii) ale hematiilor. În sânge crește cantitatea bilirubinei indirecte, fără bilirubinurie.
3. Icterele de transport (de tipul Gilbert sau Meulengracht) se caracterizează prin scăderea sau uneori chiar absența proteinelor de transport intracelular al bilirubinei. În sindromul Gilbert crește în primul rând bilirubina indirectă, probele funcționale hepatice sunt negative, în urină nu apare bilirubină, ceea ce o face ușor diferențiabilă de o hepatită acută. Lipsa anemiei și a reticulocitozei fac diferențierea față de hemoliza intravasculară. Imaginea histologică a ficatului este normală.
4. Icterele de conjugare se manifestă din cauza absenței uridil – glucuronil – transferazei. Această enzimă lipsește din hepatocitele fătului și formarea ei este indusă de creșterea bruscă a bilirubinemiei în urma degradării masive a hematiilor fetale după naștere. Deficitul congenital al enzimei determină sindromul Crigler-Najjar.
5. Icterele de secreție sunt caracterizate printr-un transport normal și printr-o conjugare bună a bilirubinei în hepatocite. La nivelul polului biliar excreția bilirubinei în bilă este însă deficitară, ca în cazul sindromului Dubin-Johnson (cu depunerea lipofuscinei în hepatocite). Acest sindrom este caracterizat prin creșterea bilirubinei directe, care se excretă și în urină. Activitatea aminotransferazelor și a fosfatazei alcaline este în general normală. În urină se inversează raportul izomerilor I și III al coproporfirinei.
6. Icterele de stază apar în urma obstrucției parțiale sau totale a căilor biliare, ducând la manifestarea colestazei intra- sau extrahepatice. În caz de obstrucție biliară totală, bila nu ajunge în intestin. Ca urmare, nu se va produce nici Ubg, care astfel va lipsi din urină cu desăvârșire.

Principalele modificări biochimice în cele mai frecvente afecțiuni hepatice, sunt redate în *Tabelul 12.VI*.

## 12.4 PREZENTĂRI DE CAZ

### 12.4.1 CIROZĂ BILIARĂ PRIMITIVĂ CU ICTER COLESTATIC

Femeie în vârstă de 38 ani se prezintă la serviciul de gastroenterologie cu stare generală bună, dar cu prurit generalizat, de intensitate crescândă în ultimele 12 luni. Nu consumă alcool, anamnestice nu se evidențiază contact cu bolnavi cu hepatită, intervenții medicale, călătorie în străinătate.

Rezultatele examinărilor de laborator în ser:

- Proteine totale 90 g/L
- Albumină 30 g/L

**Tabel 12.VI Modificarea unor parametri biochimici în diverse afecțiuni hepatice**

Test	Boala						
	Hepatită acută	Hepatită cronică activă	Hepatită cronică persistentă	Ciroză	Hepatită toxică alcoolică	Colestază	Malignități și infiltrații
Bilirubină	N/↑↑	N/↑	N	N/↑	↑/↑↑	↑/↑↑↑	N
Urobilinogen	↑↑↑	N/↑	↑	N	↑↑	Absent	N/↑
Transaminaze	↑↑↑	↑↑	↑	N/↑	↑↑/↑↑↑	N/↑	N/↑
F Alc	↑	N&	N	N/↑↑	N/↑	↑↑↑	↑↑
γ-GT	↑	N/↑	N/↑	N/↑↑	↑↑	↑↑↑	N/↑
Albumină	N	N/↓	N	N/↓	N/↓	N	N/↓
γ-Globuline	N	↑↑	↑↑	↑↑	N	N	N
Timp Quick	N/↑*	N/↑	N	N/↑*	N/↑	N/↑#	N

& Poate fi crescută dacă e prezentă ciroza

\* Nu se corectează cu vitamina K parenteral

# Corectabil cu vitamina K parenteral

- Bilirubină 15 mg/dL
- Fosfatază alcalină 500U/L
- AST 100 U/L
- GGT 230 U/L

#### Interpretarea cazului:

Creșterea activității fosfatazei alcaline denotă un icter colestatic, nivelul scăzut al albuminei plasmatică sugerează afectarea funcției hepatice. Hiperproteinemia plasmatică (din care 60 g/L este reprezentat de globuline) ridică suspiciunea de boală autoimună. Diagnosticul de ciroză biliară primitivă a fost confirmată prin evidențierea unui titru crescut de imunoglobuline de tip IgM, a prezenței anticorpilor antimitocondriali și prin examen histologic al țesutului bioptic hepatic.

#### 12.4.2 SINDROM GILBERT

După un episod recent de gripă, un tânăr se prezintă la medicul de familie cu un icter moderat. Pentru a exclude o eventuală hepatită acută se recoltează sânge pentru examinări de laborator.

Rezultatele examinărilor de laborator în ser:

- Bilirubină 3,5mg/dL
- Fosfatază alcalină 70 U/L
- AST 34 U/L
- Hemoglobină 15 g/L
- Reticulocite 1%

Urină:

- Bilirubină, UBG normal

**Interpretarea cazului:**

Nu se evidențiază semne de citoliză hepatică, absența bilirubinei urinare exclude hiperbilirubinemia conjugată plasmatică. Hemoglobina normală și numărul normal de reticulocite exclud procesul de hemoliză. Astfel prin excludere, se stabilește diagnosticul de sindrom Gilbert.

**12.4.3 CARCINOM DE CAP DE PANCREAS**

Un pensionar se prezintă la medicul de familie cu dureri epigastrice care iradiază în spate, fără asociere evidentă cu mesele. Tratamentul cu antiacide nu contribuit la scăderea durerilor, după câteva săptămâni bolnavul se prezintă din nou la consultație cu dureri mai intense. Bolnavul a scăzut în greutate, în ultimele săptămâni urina s-a închis la culoare și scaunul a devenit acolic. La examenul clinic s-a constatat pe lângă scăderea în greutate și prezența unui icter.

Examinări de laborator în ser:

- Proteine totale 70 g/L
- Albumină 38 g/L
- Bilirubină 20 mg/dL
- Fosfatază alcalină 530 U/L
- AST 87 U/L
- GGT 200 U/L
- Urină: Bilirubină: +++, UBG - absentă

Examenul ecografic a evidențiat canale biliare lărgite. Examenul baritat demonstrează existența unei umbre extinse la nivelul porțiunii distale a duodenului, care a fost interpretat ca tumoare de cap de pancreas. Examenul CT abdominal, iar ulterior laparotomia confirmă diagnosticul de carcinom de cap de pancreas.

**Interpretarea cazului:**

Semnele clinice sugerează carcinom de cap de pancreas care obstruează ductul biliar. Rezultatele examinărilor de laborator pledează pentru un icter obstructiv. Pe baza acestor rezultate hepatopatia nu poate fi confirmată dar nici nu se exclude. Diagnosticul de carcinom de cap de pancreas este susținut de rezultatele examinărilor imagistice și paraclinice, dar obstrucția poate fi produsă în aceeași măsură de calculi care obstruează papila Vater, de tumoare care metastazează în nodulii limfatici din hilul hepatic sau de colestază intrahepatică.

**12.4.4 CIROZĂ HEPATICĂ ALCOOLICĂ**

O femeie de vârstă medie se internează în spital cu hematemeză. Endoscopia evidențiază varice esofagiene, care au fost tratate prin scleroterapie. I se recomandă bolnavei să evite consumul de alcool. Peste doi ani pacienta se prezintă din nou cu icter, somnolență și semnele clinice ale unei hepatopatii.

Examinări de laborator în ser:

- Albumină 30 g/L

- Bilirubină 15 mg/dL
- Fosfatază alcalină 400 U/L
- AST 200 U/L
- GGT 320 U/L

La electroforeza proteinelor plasmatice se evidențiază punte beta2-gama.

**Interpretarea cazului:**

Albumina scăzută, bilirubina crescută și modificările enzimatiche susțin diagnosticul de ciroză hepatică și citoliză hepatică consecutivă consumului de alcool.

#### 12.4.5 COLESTAZA POSTOPERATORIE

Un bărbat în vârstă se internează în spital cu icter și simptomatologie de abdomen acut. Clinic s-a constatat peritonită generalizată, examenul radiologic a pledat pentru perforție de organ intern. Laparotomia a evidențiat un diverticul fisurat pe colonul sigmoid. S-a efectuat lavaj peritoneal și s-a practicat o colostomie. După 72 de ore bolnavul prezintă în continuare stare alterată, cu hipotensiune refractară la aministrare de lichide prin perfuzie și substanțe inotrope.

Examinări de laborator:

- Leu:  $12.000 \times 10^6/L$
- Bilirubină 5 mg/dL
- AST 130 U/L
- Fosfatază alcalină 200 U/L

**Interpretarea cazului:**

Fosfataza alcalină crescută sugerează existența unei colestaze, AST-ul crescut poate fi cauzat de citoliză hepatică sau de existența unui proces de citoliză la nivelul altor țesuturi. Bolnavul este hipotensiv și se găsește în stare septică. Colestaza postoperatorie în cazul acesta este multifactorială, poate fi cauzată de capacitatea excretorie scăzută a ficatului, obstrucția intrahepatică sau modificările survenite în compoziția bilei.

#### Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – Medical Biochemistry, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. - Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
3. Cucuianu M. Fiziopatologia biochimică a secreției biliare In Crîșnic I., Cucuianu M., Pleșca-Manea L. eds.: Biochimie clinică. Fundamentare fiziopatologică. University Press, Arad, 2001: 217-258.
4. Fischbach F. – A Manual of Laboratory Diagnostic Tests, Ed. 3, Lippincott Company, 1988.
5. Howanitz J., Howanitz P. – Laboratory Medicine, Churchill Livingstone, 1991.
6. Kaplan A.L., Pesce J.A. – Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation, Mosby Co, 1984.
7. Laker M.F. – Clinical Biochemistry for Medical Students, W.B.Saunders Company, 1996.
8. Marshall WJ. A máj. In Marshall WJ.ed. Klinikai kémia, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2003:99-

118.

9. McClatchey K.D. – Clinical Laboratory Medicine, Williams & Wilkins, 1994.
10. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu-Gheorghiu M. – Biochimie medicală, Ed. Medicală, 1998, 2000.
11. Zakim D., Boyer T.D. – Hepatology. A Textbook of Liver Disease, Ed.4, Philadelphia: WB Saunders Company, 2002.
12. Zamfirescu-Gheorghiu M., Popescu A. - Tratat de Biochimie medicală, vol I-II, Ed. Medicală, 1991.
13. [www.informed.hu/&prk=30474474&larticle=78032&tPath=/szakmai\\_oldalak/fekete\\_msd/section04/ch048/](http://www.informed.hu/&prk=30474474&larticle=78032&tPath=/szakmai_oldalak/fekete_msd/section04/ch048/), The Merck Manual, ed.all-a, 2000.
14. Jacobs D. S., Oxley D. K., DeMott W. R. - Laboratóriumi vizsgálati kézikönyv tömören, Ed. 2, Lexi-Comp's Clinical Reference Library, 2002.
15. Karlson P., Gerok W., Groß W. - Patobiokémia. Bevezetés a patobiokémiába egyetemi hallgatók és orvosok számára. Ed. Medicina, Budapest, 1989.

# 13

## Hemoproteine și metabolismul fierului. Aspecte fiziologice și patologice

Enikő Nemes-Nagy

Hemoproteinele reprezintă un grup de heteroproteine (metaloproteine cu fier, specializate în transportul, depozitarea și utilizarea oxigenului) cuprinzând mioglobina și hemoglobina, citocromii transportori de electroni și diverse oxidaze. Gruparea prostetică a acestora este hemul.

### 13.1 HEMOGLOBINA ȘI MIOGLOBINA

Hemoglobina și mioglobina sunt proteine globulare colorate datorită dublelor legături conjugate din cadrul hemului, de aceea ele se mai numesc cromoproteine. Hemoglobina are formă oligomerică (este formată din 4 protomeri), transportă oxigenul de la plămâni, prin sânge, la țesuturile periferice, iar mioglobina (este monomer) are rolul de a stoca oxigenul în interiorul celulelor musculare. Hemoglobina intervine și în transportul bioxidului de carbon și al protonilor de la țesuturile periferice la plămâni.

#### 13.1.1 ELEMENTE STRUCTURALE

Mioglobina este alcătuită dintr-o singură catenă proteică formată din 153 resturi de aminoacizi. Hemoglobina adultului (HbA) este formată din 4 lanțuri de globină, 2 $\alpha$  (lanțurile alfa conțin 141 aminoacizi) și 2 lanțuri  $\beta$  (conțin 146 de aminoacizi), iar unele forme fiziologice de hemoglobină pot conține alte lanțuri non  $\alpha$  ( $\gamma, \delta, \epsilon$ ), în cele embrionare apar și lanțuri  $\zeta$ . Fiecare lanț globinic cuprinde 8 segmente, notate cu litere de la A la H (*Figura 13.1*). Hemoglobina (Hb) și mioglobina (Mb) conțin aceeași grupare prostetică (hemul), alcătuită din protoporfirină IX și  $\text{Fe}^{2+}$ . Protoporfirina conține un nucleu tetrapirolic, inelele pirolice fiind legate între ele prin punți metinice (*Figura 13.2*). Fiecare nucleu pirolitic are 2 substituenți, în ordine metil (M), vinil (V) pe inelul I, M, V pe inelul II, M, propionil (P) pe inelul III, și P, M pe inelul IV.  $\text{Fe}^{2+}$  leagă reversibil oxigenul în raport molar 1:1, fără transfer de electroni și nu se oxidează în  $\text{Fe}^{3+}$ , fiindcă astfel Hb și-ar pierde capacitatea de a transporta oxigenul și în urma reacțiilor s-ar forma anionul superoxid, un radical liber foarte nociv:



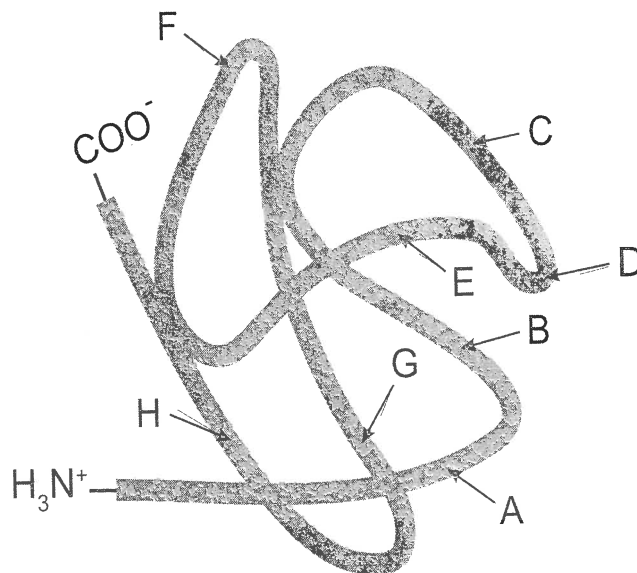


Figura 13.1 Structura terțiară a Mb și monomerului de Hb

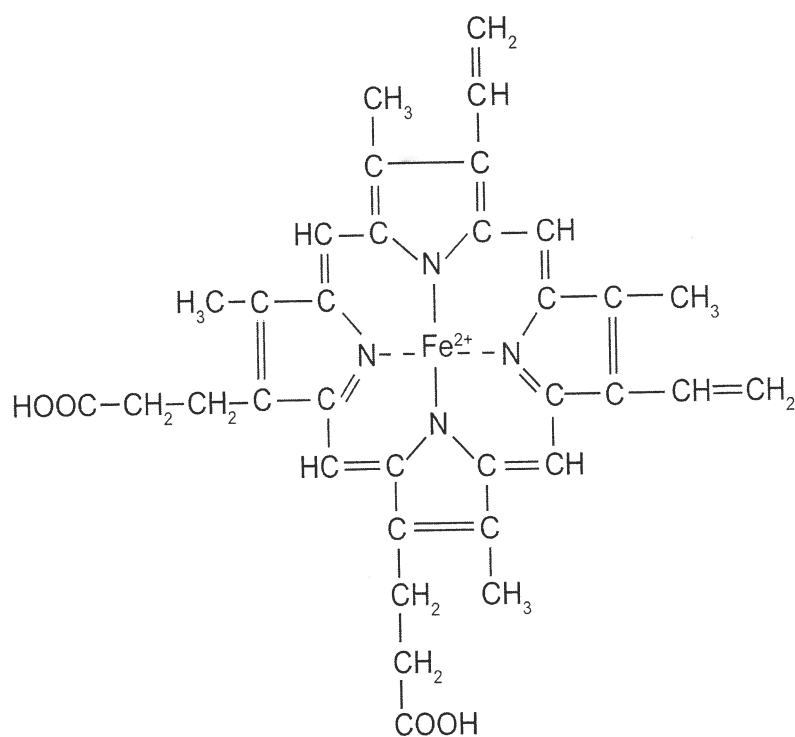


Figura 13.2 Structura hemului din Hb, Mb

Pentru a împiedica aceste reacții redox, hemul este învelit de catenele de globină, care formează o pungă de oxigenare hidrofoabă în vecinătatea hemului, împiedicând pătrunderea apei, protejând starea inferioară de oxidație a fierului.

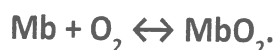
Ionul  $\text{Fe}^{2+}$  formează patru legături cu atomii de azot ai tetrapiroulului, și încă două legături coordinative cu atomii de azot ai tetrapiroulului, și încă două legături coordinative cu histidina proximală (His F8) și respectiv cu cea distală (His E7). În interiorul moleculei apar radicali nepolari, hidrofobi (cu excepția celor 2 histidine care coordonează fierul), iar spre exterior se

poziționează radicalii polari, hidrofilii în contact cu mediul apos sanguin. În deoxihemoglobină fierul din mijlocul grupării prostetice se află deasupra planului hemului.

### 13.1.2 OXIGENAREA HEMOGLOBINEI ȘI MIOGLOBINEI

Oxigenarea mioglobinei respectă legea acțiunii maselor (aceasta fiind un monomer): curba de oxigenare are aspect hiperbolic. Hemoglobina, fiind o proteină oligomerică la care protomerii acționează prin cooperativitate pozitivă, realizând un efect alosteric homotrop (efectorul este chiar ligandul), are o curbă de oxigenare de aspect sigmoid (*Figura 13.3*). Ca urmare a diferenței de presiune parțială a oxigenului la nivelul plămânilor (100 mmHg) și a capilarelor din țesuturile extrapulmonare, cum ar fi cele musculare (20 mmHg), hemoglobina poate ceda 35-45% din oxigenul legat, așadar este un transportor eficient de oxigen (presiunea parțială a O<sub>2</sub> la care Hb este saturată în proporție de 50% este p<sub>50Hb</sub> = 26 mmHg); în aceleași condiții de presiune parțială a oxigenului mioglobina ar putea ceda doar 12% din oxigenul asociat, așadar nu ar fi un transportor corespunzător; ea are rolul de a stoca temporar oxigenul în celule.

Oxigenarea mioglobinei se poate scrie sub forma reacției:



Constanta de echilibru K a oxigenării este:

$$K = [\text{MbO}_2] / ([\text{Mb}] \cdot [\text{O}_2]),$$

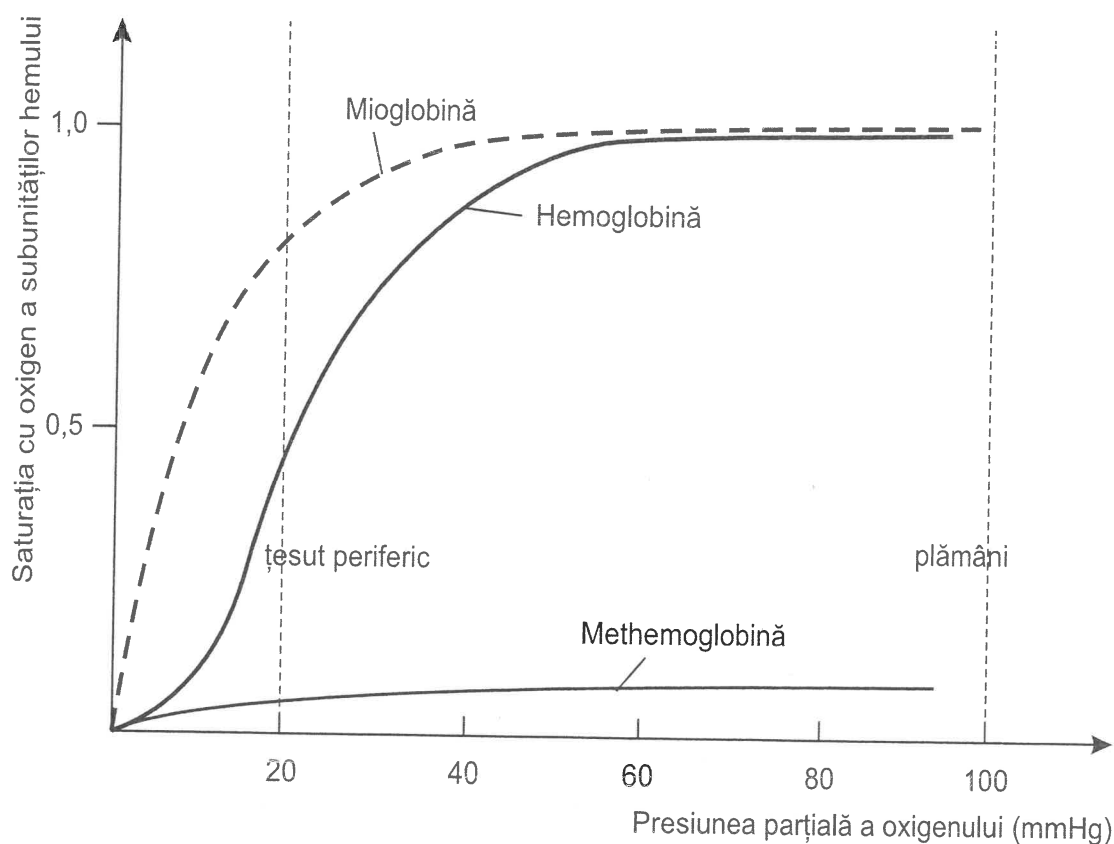


Figura 13.3 Curbele de oxigenare ale mioglobinei și hemoglobinei

fracția de oxigenare  $Y$  a mioglobinei este:

$$Y = [\text{MbO}_2]/([\text{MbO}_2] + [\text{Mb}]),$$

valoarea maximă a fracției de oxigenare fiind 1, atunci când toate moleculele de mioglobină sunt oxigenate. Substituind prima ecuație în a doua obținem:

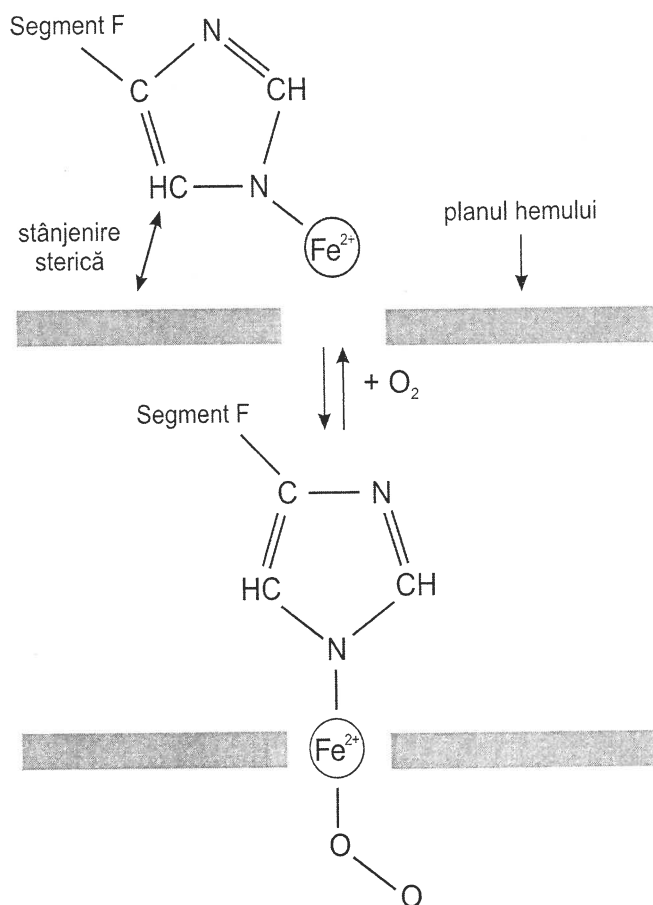
$$Y = (K \cdot [\text{O}_2]) / (K \cdot [\text{O}_2] + 1).$$

Întrucât oxigenul molecular este în stare gazoasă, este convenabil să exprimăm concentrația sa în termenii presiunii parțiale -  $p\text{O}_2$  - astfel obținem ecuația:

$$K \cdot p\text{O}_2 / (K \cdot p\text{O}_2 + 1) = p\text{O}_2 / (p_{50} + p\text{O}_2),$$

unde  $p_{50}$  este presiunea parțială a oxigenului la care jumătate din moleculele de mioglobină sunt oxigenate ( $p_{50}\text{Mb} = 2,8 \text{ mmHg}$ ).

În cazul moleculei de hemoglobină, prima dată se oxigenează unul dintre protomerii  $\alpha$  (protomerii  $\beta$  au inițial punga de oxigenare blocată cu un rest de valină). În urma procesului, fierul aparținând acestui protomer se deplasează în poziție coplanară cu hemul (*Figura 13.4*), ceea ce modifică poziția segmentului F8 și are ca urmare deblocarea pungilor de oxigenare

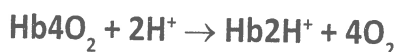


**Figura 13.4** Modificarea poziției ionului  $\text{Fe}^{2+}$  față de planul nucleului tetrapirolic al hemului, în timpul oxigenării (segmentul F aparține moleculei de globină, în imagine fiind redat doar radicalul histidinei proximale)

ale protomerului  $\beta$ , prin trecerea dintr-o stare tensionată într-una relaxată (cu afinitate de 5000 de ori mai mare pentru oxigen), astfel unghiul dintre cei doi dimeri crește cu  $15^\circ$  (Figura 13.5). Primul protomer se oxigenează cel mai greu, al doilea și al treilea protomer - mai ușor, iar ultimul - practic instantaneu (fenomen definit „cooperativitate pozitivă”). Tetramerul de hemoglobină este saturat cu 4 molecule de oxigen. Oxigenarea este acompaniată de modificări conformaționale importante și de ruptura unor punți saline existente între zonele carboxi- și amino-terminale ale subunităților de Hb.

Oxigenarea hemoglobinei este influențată de efecte alosterice heterotrope, la care efectul care modifică centrul de reacție este diferit de ligand (în limba greacă *allos* = altul, *stereos* = spațiu), în urma unor modificări ale structurii terțiare/cuaternare a proteinei. Acești liganzi sunt protonii,  $\text{CO}_2$  și 2,3-difosfogliceratul (2,3-DPG). Mioglobina nu este o proteină alosterică, afinitatea ei față de  $\text{O}_2$  este foarte puțin influențată de acești efectori.

**Efectul Bohr** constă în influența pH-ului și a presiunii parțiale a  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ) asupra oxigenării hemoglobinei. Scăderea pH-ului și creșterea  $\text{pCO}_2$  scad afinitatea hemoglobinei pentru oxigen, ceea ce ajută eliberarea oxigenului legat de hemoglobină la nivelul țesuturilor periferice. Prin oxigenare la nivel pulmonar, hemoglobina devine un acid mai tare ( $\text{pK}_a$  7,16) comparativ cu hemoglobina care se întoarce din țesuturile periferice ( $\text{pK}_a$  7,3); 1  $\text{O}_2$  deplasează 0,6 protoni de pe hemoglobină. Această reacție poate fi descrisă prin ecuația următoare:



Datorită proceselor metabolice din țesutul muscular, temperatura crește și mediul se acidifică (datorită acumulării de acid lactic și acid piruvic), astfel reacția de mai sus are loc de la stânga la dreapta, iar în țesutul pulmonar (unde pH-ul și  $\text{pO}_2$  mai crescute decât în țesuturile extrapulmonare) reacția este deplasată în sens invers.

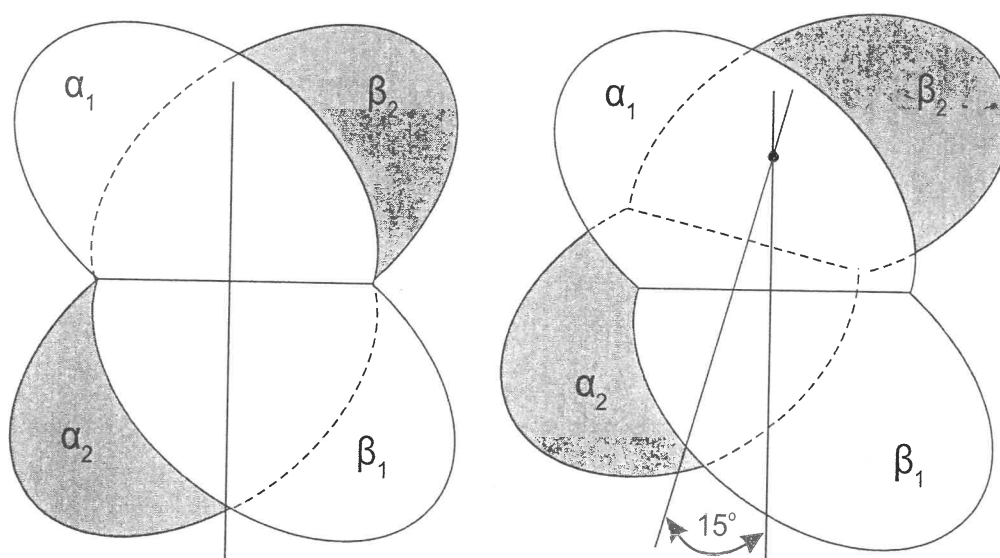
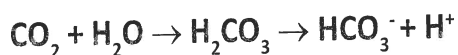


Figura 13.5 Reprezentare schematică a modificării structurii cuaternare a hemoglobinei prin oxigenare

Aproximativ 80 % din  $\text{CO}_2$  rezultat în urma proceselor metabolice reacționează cu apa, sub acțiunea catalitică a anhidrazei carbonice eritrocitare, formând acid carbonic care disociază în ioni bicarbonat și protoni.



Bicarbonatul intră în plasmă, alcătuind mai mult din 50% din rezerva alcalină a sângelui, iar protonii sunt captați de molecula de hemoglobină.

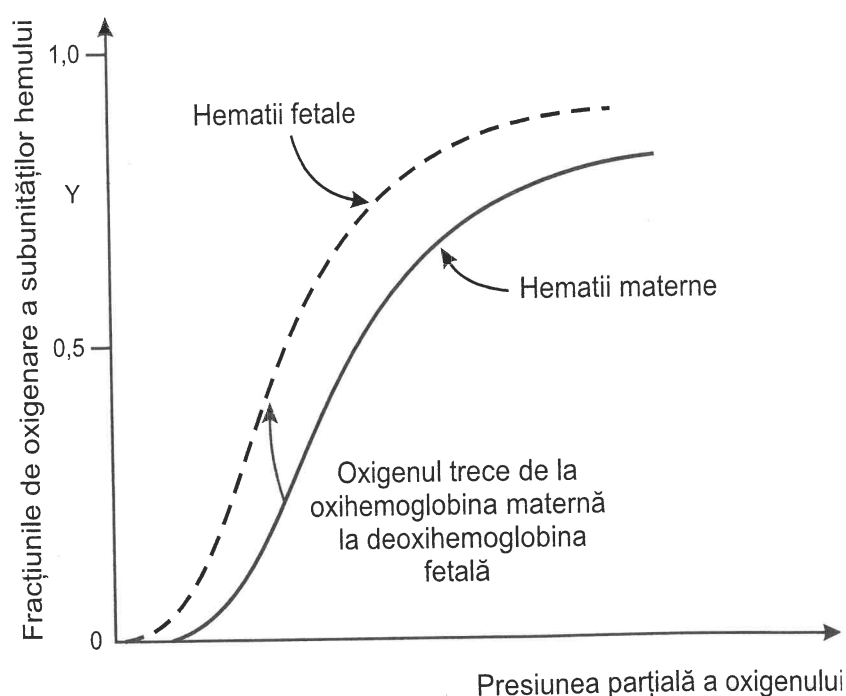
La nivelul capilarelor pulmonare, protonii eliberați în cursul oxigenării hemoglobinei, reacționează cu ionii bicarbonat pentru a reface acidul carbonic care, la rândul său sub acțiunea aceleiași enzime, eliberează  $\text{CO}_2$  care va fi eliminat apoi prin expirație.



Aproximativ 15 % din  $\text{CO}_2$  transportat în sânge este legat direct de lanțul de globină, iar 5% este dizolvat în plasmă.

**Efectul 2,3-difosfogliceratului** asupra moleculei de hemoglobină constă în scăderea afinității față de oxigen de 26 de ori. Acest compus se sintetizează în cantități mari în eritrocite (provine dintr-un intermediar glicolitic: 1,3-difosfoglicerat) prin șuntul Rapoport-Luebering, și are rolul de a poziționa curba de disociere a oxihemoglobinei în intervalul fiziologic de  $\text{pO}_2$ , printr-o interacțiune între centrii de legare ai 2,3-DPG și centrii de oxigenare. Cele 4 sarcini negative ale 2,3-DPG se leagă ionic de protomerii beta ai deoxihemoglobinei, facilitând eliberarea oxigenului, prin stabilizarea formei deoxi a Hb. 2,3-DPG este descompus în mod ireversibil în sângele conservat.

Hemoglobina fetală leagă mai slab 2,3-DPG decât Hb maternă, astfel are afinitatea pentru oxigen mai mare, și poate facilita transferul de oxigen din sângele matern spre cel fetal (Figura 13.6). Explicația biochimică a acestei diferențe constă într-o diferență structurală:



**Figura 13.6** Curbele de disociere ale oxihemoglobinelor maternă și fetală

HbF are în poziția H21 a lanțului  $\gamma$  un rest de serină (conținând grupare hidroxil) în loc de aminoacidul bazic histidină din lanțul  $\beta$  (în HbA), astfel nu mai poate forma o punte salină cu 2,3-DPG.

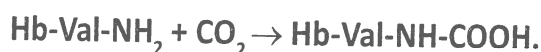
Adaptarea la mare altitudine are la bază pe termen scurt (alături de o creștere ușoară a numărului de eritrocite și a concentrației de hemoglobină eritrocitară, care necesită timp mai lung), sinteza crescută de 2,3-DPG în eritrocite, care re poziționează curba de disociere a oxihemoglobinei în funcție de valorile mai mici ale  $pO_2$ . Răul de altitudine se datorează vitezei relativ mici de sinteză a 2,3-difosfogliceratului.

### 13.1.3 DERIVAȚII HEMOGLOBINEI

#### 13.1.3.1 Derivați fiziologici

**Oxihemoglobinele.** Hemoglobina poate lega 1, 2, 3 sau 4 molecule de oxigen. Prin oxigenare se schimbă culoarea sângelui din purpuriu închis (sânge venos) în roșu aprins (sânge arterial). OxiHb și deoxiHb au spectre de absorbție diferite, astfel ele se pot doza spectrofotometric. Toate hemoproteinele prezintă și o bandă de absorbție comună la 400 nm, denumită bandă Soret.

**Carbaminohemoglobina.** Aproximativ 15% din cantitatea totală de  $CO_2$  din sânge se combină cu Hb, reacționând cu resturile de valină de la capătul amino terminal al celor 4 protomeri ai hemoglobinei:



Oxigenul deplasează  $CO_2$  de pe Hb, fenomen denumit efect Haldane.  $CO_2$  este componenta acidă și respiratorie a sistemului tampon al bicarbonaților.

#### 13.1.3.2 Derivați patologici

**Carboxihemoglobina (COHb).** Afinitatea monoxidului de carbon (CO) pentru Hb este de 218 de ori mai mare decât a oxigenului, cauzând reducerea concentrației de oxihemoglobină și scăderea cantității de oxigen disponibil pentru țesuturi. Eliberarea CO din carboxihemoglobină este un proces mult mai lent comparativ cu disocierea oxigenului din oxihemoglobină. În mod normal, mai puțin de 2% din cantitatea totală de Hb a locuitorilor din mediul (mai poluat) urban, se găsește sub formă de COHb, în sângele fumătorilor însă, proporția fiind mult mai mare (până la 10%). În cazul intoxicației cu CO, prin creșterea  $pO_2$  în aerul inspirat, se poate îndepărta acest compus de pe hemoglobină.

**Methemoglobina (MetHb).** În acest tip de hemoglobină fierul feros ( $Fe^{2+}$ ) este oxidat în fier feric ( $Fe^{3+}$ ), astfel pierzând capacitatea de a transporta oxigenul. În condiții normale doar 1% din Hb prezentă în sânge se găsește sub formă de methemoglobină, acest procent foarte mic este menținut de methemoglobin-reductază, care convertește fierul feric în fier feros ( $Fe^{3+} + 1e^- \rightarrow Fe^{2+}$ ). La persoanele cu deficit înnăscut sau dobândit (prin ingestia masivă a unor substanțe, de ex. sulfonamide) de methemoglobin-reductază, cantitatea de MetHb crește, manifestarea clinică majoră fiind cianoza.

Nitrații prezenți în apa consumată în concentrații de peste 10 mg/l pot provoca, în special la sugarii cu vârsta sub 6 luni, stare de methemoglobinemie („blue baby sindrome”). Valoarea pH-ului din suc gastric al acestora este mult mai ridicat comparativ cu cel al adulților, în aceste condiții bacteriile care convertesc nitrații în nitriți pot prolifera ușor. Ajuns în sânge, nitritul oxidează fierul în methemoglobină, iar copiii mici sunt deficitari în activitatea methemoglobin reductazei. Clinic apare cianoză la nivelul mâinii și a picioarelor, respectiv în zona periorală, asociat frecvent cu tulburări respiratorii, diaree, vome, uneori letargie, hipersalivație, tulburări de conștiență, convulsii și chiar moarte. Schimbarea sursei de apă rezolvă de obicei problema în decurs de 2-3 zile, în cazuri grave se recurge la administrare de albastru de metilen intravenos.

În formele toxice, ca urmare a hemolizei, apare methemalbumina, care determină culoarea brună a plasmelor; urina poate fi de asemenea colorată în brun, datorită eliminării pe această cale a MetHb libere. În hemolizele masive poate apare chiar **hematină liberă** (hem oxidat) sanguină. În formele toxice (nu și în cele congenitale) administrarea de acid ascorbic sau albastru de metilen, contribuie la reducerea fierului din structura MetHb.

**Sulfhemoglobina** este un derivat verde al hemoglobinei, care apare după expunerea la compuși solubili sau la medicamente cu sulf, când un atom de sulf este încorporat în inelul porfirinic al hemoglobinei. Capacitatea hemoglobinei de a lega oxigenul scade, dar capacitatea de a ceda oxigenul țesuturilor este crescută – deplasare la dreapta a curbei de oxigenare a hemoglobinei (efect similar cu cel al 2,3 – DPG-ului).

**Glicohemoglobina.** Proportional cu valorile glicemiei, are loc un proces neenzimatic de glicozilare a tuturor proteinelor plasmatiche; având durata de viață a hematilor (3-4 luni), Hb este proteina preferată pentru studiul fenomenului de glicozilare în monitorizarea diabeticiiilor. Grupările amino terminale ale lanțurilor  $\beta$  reacționează cu glucoza, formând baze Schiff și apoi un compus mai stabil chimic – compus Amadori (HbA1c). Hemoglobina glicozilată este un parametru foarte util în urmărirea echilibrului metabolic glucidic al pacienților diabetici, valorile normale fiind cuprinse între 4-6% (se exprimă în procente din Hb totală). Cu cât glicemiile pacientului în lunile precedente analizei au fost mai ridicate, cu atât nivelul HbA1c va fi mai mare. Obiectivul tratamentului la diabetici este menținerea valorii HbA1c sub 7%. Între 7-9% vorbim despre echilibru metabolic satisfăcător, peste 9-12% considerăm echilibrul precar și tratamentul trebuie revizuit, iar peste 12% este necesară spitalizare și intervenție promptă, fiind pericol iminent de decompensare, cu apariția complicațiilor acute ale diabetului zaharat, iar pe termen lung crește riscul complicațiilor cronice.

#### 13.1.4 PORFIRINE – PORFIRII

##### 13.1.4.1 Porfirine și tulburări ale metabolismului acestora

Porfiriile reprezintă un grup de boli în care există un deficit al unei enzime implicate în biosinteza hemului, ducând la acumularea unor intermediari ai acestei căi metabolice. Acești intermediari sunt excretați în cantități excesive prin urină, fecale sau ambele. Simptomato-

logia bolii depinde de natura precursorului de hem care se acumulează. În porfiriile acute excesul de precursori porfirinici (acidul 5-amino-levulinic și porfobilinogenul) se asociază cu manifestări neuroviscerale episodice, aceste acutizări ale bolii fiind provocate de unele medicamente, factori hormonal, alcool, inanție, stres sau infecții. În porfiriile non-acute și în cele acute cu manifestări la nivelul pielii, acumularea porfirinelor duce la fotosensibilizare și leziuni cutanate.

Diagnosticul acestor boli depinde în mare măsură de analizele de laborator care pot demonstra acumularea intermediarului respectiv în proba biologică adecvată. Progresele tehnice în domeniul geneticii moleculare fac posibilă investigarea porfiriilor la nivel molecular și oferă informații valoroase în investigarea familiilor cu porfirii.

#### 13.1.4.2 Fiziologia sintezei hemului

Denumirea porfirinelor provine din cuvântul grecesc porphyra (purpuriu), datorită culorii acestor structuri tetrapirolice cu duble legături conjugate. Porfirinogenii la rândul lor nu conțin duble legături conjugate astfel sunt incolori.

Biosinteza hemului pornește de la succinil-CoA intramitocondrială (intermediar al ciclului citric) și glicină, se formează acidul  $\delta$ -amino levulinic (ALA), apoi procesul continuă în citoplasmă prin formarea progresivă a nucleului tetrapirolic, iar ultimele etape au loc din nou în mitocondrie.

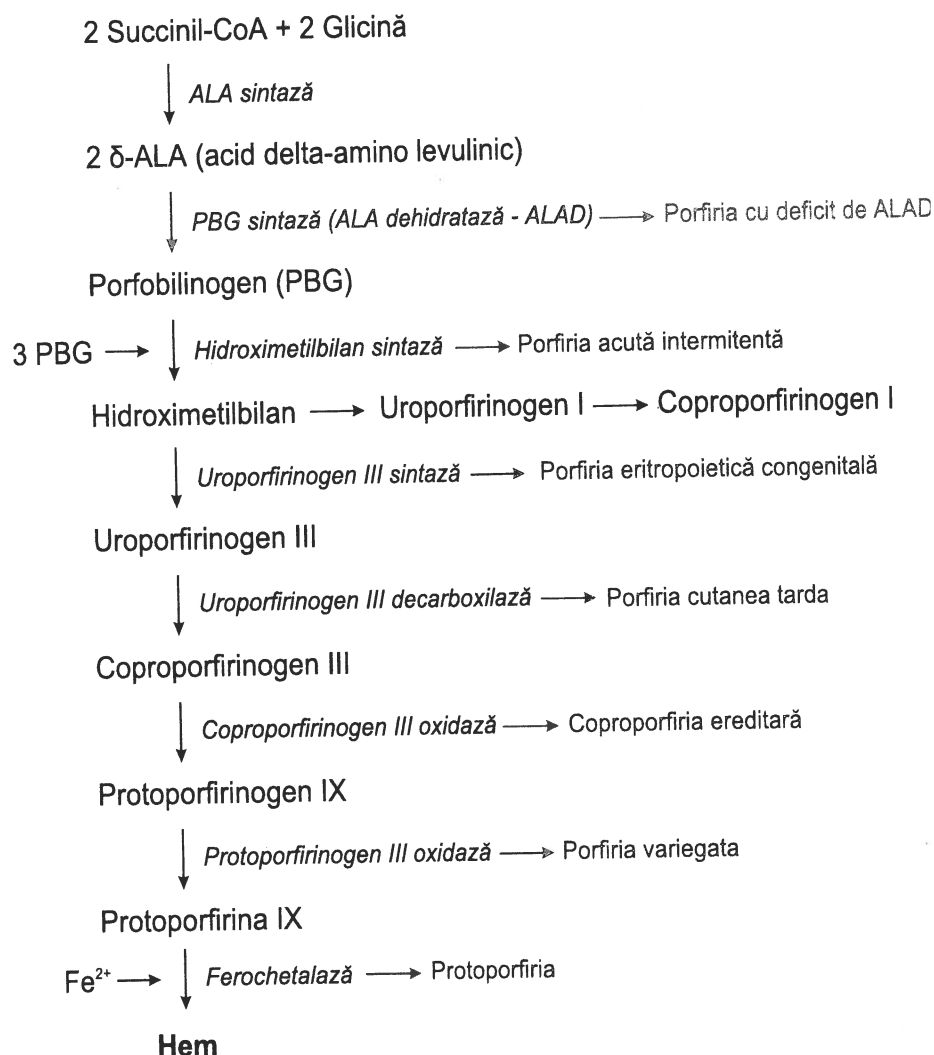
Enzima cheie a procesului este ALA-sintaza, care reglează viteza biosintezei hemului. Produsul final, hemul este inhibitor alosteric al acestei enzime, dar ea este supusă și reglării prin inducție-represie enzimatică. Numeroase medicamente (de ex. barbituricele) induc ALA-sintaza pentru creșterea producției de citocrom P<sub>450</sub>, care participă la detoxifierea organismului.

#### 13.1.4.3 Aspecte patologice

Porfiriile sunt boli genetice dominant autosomale, cu excepția porfiriei eritropoietice congenitale, care este de tip recesiv. Deficitele enzimatic care duc la diferitele tipuri de porfirii sunt redate în *Figura 13.7*.

Semnele și simptomele clinice care apar în porfirii se datorează fie acumulării de metaboliți care preced blocajul enzimatic, fie deficienței produșilor metabolici care succed acest blocaj. Astfel, în porfirie acută intermitentă blocajul enzimatic determină acumularea ALA și PBG în lichidele și țesuturile organismului. Efectul toxicității acestor metaboliți asupra nervilor abdominali și sistemului nervos central determină simptome specifice precum dureri abdominale și tulburări neuropsihice, datorate în mare măsură similitudinii structurale între neurotransmițătorul GABA și intermediarul  $\delta$ -ALA, cel din urmă acționând ca inhibitor competitiv, blocând parțial acțiunea acidului gama-amino-butiric asupra receptorilor săi.

Blocajele enzimatic care determină acumularea porfirinogenilor cauzează fotosensibilitatea. Expunerea la lumină (~400 nm) a porfirinogenilor îi aduce într-o stare excitată în care reacționând cu oxigenul, rezultă radicali ai acestuia, care produc prin stres oxidativ liza lizozomilor și a altor organite celulare cu eliberare de enzime care cauzează alterări ale pielii (cicatrici). Cea mai des întâlnită formă patologică este *porfirie cutanea tarda*.



**Figura 13.7** Etapele biosintezei hemului și bolile apărute în urma deficitelor enzimatic

Porfiriile cutanate se manifestă printr-o varietate de leziuni tegumentare de tip acut (eritem solar, leziuni veziculare, buloase sau ulcerate) respectiv de tip cronic (zone de atrofie sau hiperpigmentare, cicatrici, hipertricoză facială).

Porfiriile pot fi clasificate pe baza organului/ celulelor preponderent afectate, unde este activă sinteza hemului (măduva osoasă hematogenă și ficatul), astfel porfiriile pot fi eritropoietice, hepatice și eritrohepatice. Exemple de porfirii, simptomele acestora și analizele de laborator corespunzătoare sunt redată în *Tabelul 13.1*.

În prezent, tratamentul porfiriilor este simptomatic, dar în viitor sunt speranțe legate de terapia genică. Bolnavii cu porfirii trebuie să evite alcoolul și medicamentele inductoare de citocrom P<sub>450</sub>. Fumatul constituie o sursă de hidrocarburi aromatice care stimulează citocromul P<sub>450</sub> din ficat, crescând astfel riscul acutizării porfiriei. Pacienții cu fotosensibilitate pot utiliza beta-carotenul sau alți antioxidanți pentru prevenirea formării radicalilor liberi, diminuând astfel simptomele bolii, respectiv se recomandă evitarea expunerii la soare. În cazul pacienților prezentând porfirii cu manifestări neuroviscerale în etapa de acutizare se recomandă administrare de glucoză intravenos (300 g/zi) cu efect inhibitor asupra ALA-sinta-

Tabelul 13.1. Tipuri de porfirii – simptome și date de laborator

Tipul (clasa) de porfirii	Simptome	Teste de laborator
Porfirie intermitentă acută	Dureri abdominale, tulburări neuropsihice	PBG urinar + (prezent) Uroporfirină urinară +
Porfirie congenitală (eritropoietică)	Fotosensibilitate	PBG urinar – (absent) Uroporfirină urinară +
<i>Porfirie cutanea tarda</i> (hepatică)	Fotosensibilitate	PBG urinar – Uroporfirină urinară +
Coproporfirie ereditară (hepatică)	Fotosensibilitate, dureri abdominale, tulburări neuropsihice	PBG urinar + Uroporfirină urinară + Coproporfirină fecală +
<i>Porfirie variegata</i> (hepatică)	Fotosensibilitate, dureri abdominale, tulburări neuropsihice	PBG urinar + Uroporfirină urinară + Coproporfirină fecală +
Protoporfirie (eritrohepatică)	Fotosensibilitate	Protoporfirină fecală + Protoporfirină eritocitară +

zei, iar tratamentul de elecție este administrarea intravenoasă de hematină (sau hemarginat), care suprimă hiperproducția de ALA și PBG (porfobilinogen) prin efectul inhibitor asupra ALA-sintazei hepatice. Se mai utilizează analogi sintetici ai hemului care inhibă hem oxigenaza. Bolile hepatice pot induce de asemenea manifestările clinice la pacienții cu porfirii, așadar tratamentul hepatopatiilor este benefic în ameliorarea simptomelor și prevenirea recidivelor.

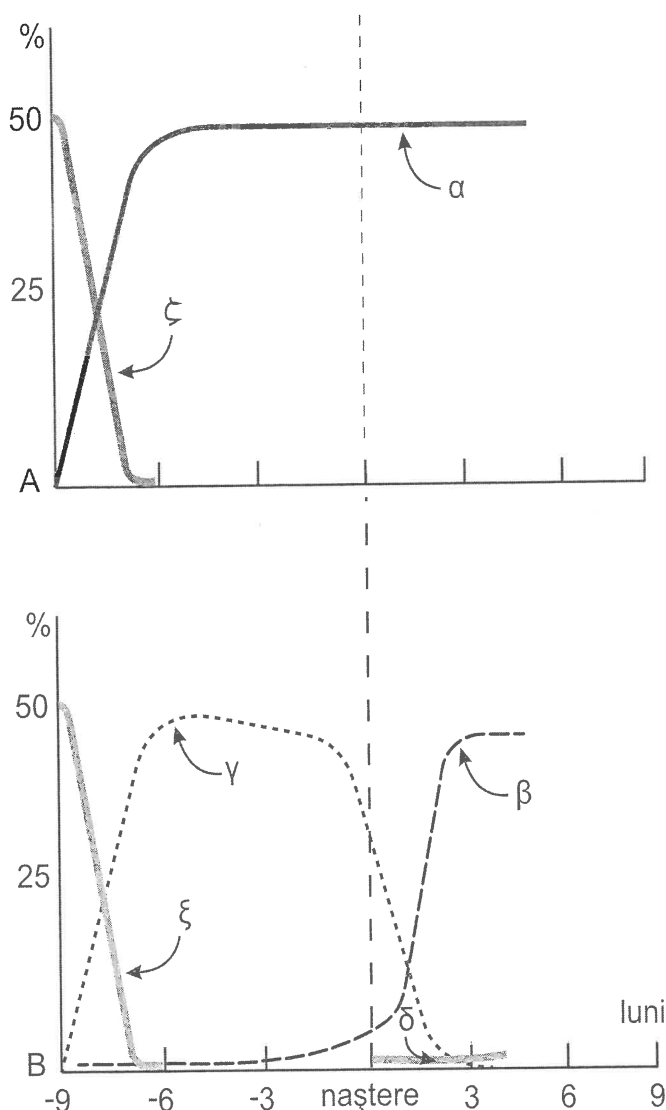
Pentru diagnosticul porfiriilor au fost propuse teste de primă intenție (determinarea precursorilor porfirinici ca ALA și PBG urinar la pacienții cu simptome neuroviscerale și măsurarea fluorometrică a porfirinelor totale din plasmă în cazul suspiciunii de porfirie cutanată) și analize de linia a doua, mai costisitoare (de ex. HPLC), care se aplică dacă unul din testele de screening au fost pozitive, în vederea determinării tipului de porfirie, lucru esențial pentru tratament și sfatul genetic.

Anomalii ale metabolismului porfirinelor pot fi cauzate de intoxicațiile cu plumb (plumbul înlocuiește zincul din centrul activ al ALAD), arsenice sau alte metale grele, tirozinemii cu acumulare de succinilacetonă (inhibitor competitiv al ALAD), insuficiență renală (eliminare deficitară a porfirinelor hidrosolubile), tulburări hepatobiliare, etc.

### 13.1.5 POLIMORFISMUL HEMOGLOBINELOR. HEMOGLOBINOPATIILE

Hemoglobina **HbA** ( $\alpha_2\beta_2$ ) reprezintă peste 95% din Hb circulantă a adultului. În afară de această formă, sângele adulților mai conține 2-3 % **HbA<sub>2</sub>** ( $\alpha_2\delta_2$ ) și mai puțin de 1 % HbF (hemoglobină fetală) cu formula oligomerică  $\alpha_2\gamma_2$ .

La naștere, **HbF** reprezintă 80 % din Hb totală, în decurs de 1 an scăzând apoi sub 1%. În afară de hemoglobinele adultului și HbF, mai există 3 tipuri de hemoglobine embrionare: **Gower I** ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), **Gower II** ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) și **Portland** ( $\zeta_2\gamma_2$ ). În Figura 13.8 este prezentată evoluția sintezei protomerilor hemoglobinei în perioada pre – și perinatală. Se observă că intensificarea sintezei protomerului  $\beta$  coincide cu reducerea sintezei protomerului  $\gamma$ , ceea ce reprezintă o înlocuire a HbF cu HbA.



**Figura 13.8** Variația sintezei tipurilor de globină pe parcursul vieții intrauterine și în primul an după naștere

Mutațiile hemoglobinei pot fi calitative (modificarea punctiformă a secvenței de aminoacizi din cadrul lanțului globinic – substituții, inserții, deleții, sau diferențe mai mari, lanțuri prea scurte sau prea lungi datorate localizării defectuoase ale codonului stop, etc.) sau cantitative (deficitul de sinteză a unei catene întregi). Mutațiile calitative pot interesa suprafața moleculei de hemoglobină, sau pot fi în interior, îndeosebi la nivelul pungii de oxigenare. S-au evidențiat mai multe sute de anomalii ale moleculei de hemoglobină, de celabile prin electroforeză.

### 13.1.5.1 Hemoglobinopatii calitative

Dintre mutațiile de suprafață, cea mai răspândită este mutația la nivelul lanțurilor β în poziția 6, unde în locul unui rest de glutamat apare valină. Hemoglobina rezultată se numește **HbS**, notată prescurtat HbS (*Gluβ6* → *Val*), iar patologia rezultată - siclemie, anemie falciformă.

HbA: Val-His-Leu-Thr-Pro-**Glu**-Glu-Lys-  
 HbS: Val-His-Leu-Thr-Pro-**Val**-Glu-Lys-  
 Poziția: 1 2 3 4 5 6 7 8

Pe suprafața HbS, în locul unui radical polar (Glu) se găsește unul nepolar (Val), astfel tetramerul HbS are în exterior două zone de asociere prin forțe hidrofobe, create de radicalii Val  $\beta 6$ , precum și două situsuri hidrofobe, complementare steric cu acestea, situate între segmentele E și F (Ala 70, Phe 85, Leu 88) ale catenelor  $\beta$ . Datorită potrivirii sterice a situsurilor Val  $\beta 6$  în situsurile complementare, moleculele de deoxi-HbS au tendința să se asocieze ("polimerizeze") prin forțe hidrofobe (Figura 13.9).

Precipitatele fibrilare de polideoxi-HbS rezultate prin polimerizare deformează eritrocitele, acestea adoptând forma de seceră (*falcium* în limba latină). Moleculele de oxi-HbS nu prezintă pe suprafața lor zone complementare, astfel ele nu se pot polimeriza. Precipitatele de polideoxi-HbS se dizolvă prin oxigenare. Procesul de polimerizare al deoxi-HbS este unul de nucleație. Etapa limitatoare de viteză, mai lentă, reprezintă formarea unui nucleu prin

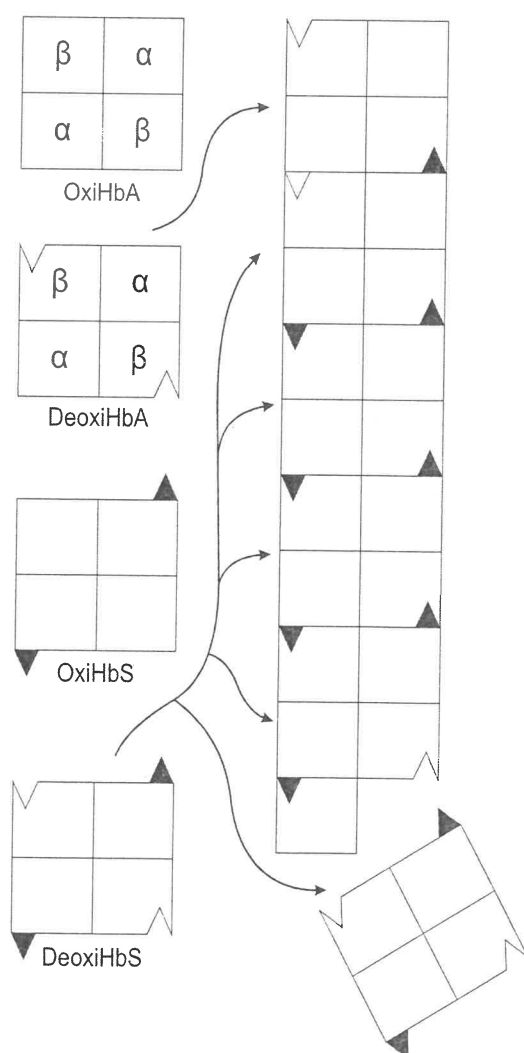


Figura 13.9 Formarea polimerilor deoxiHbS. Triunghiurile pline sunt situsuri hidrofobe de asociere, cele goale sunt situsuri hidrofobe complementare

asocierea a cca. 10 molecule de deoxi-HbS, în jurul căruia vor crește în scurt timp fibrele de polideoxi-HbS.

Un eritrocit conținând deoxi-HbS nu suferă deformare dacă timpul de nucleație este mai lung decât timpul necesar deplasării eritrocitelor de la capilarele periferice la alveolele pulmonare, unde se pot reoxigena. Timpul de nucleație este dependentă de concentrația deoxi-HbS. Heterozigoții, la care deoxi-HbS reprezintă 50 % din total, au doar 1 % din eritrocite cu aspect falciform. În condițiile privării de  $O_2$  (la altitudine mare sau la efort) crește concentrația formei deoxigenate a HbS, scade timpul de nucleație, cauzând creșterea proporției eritrocitelor falciforme, astfel heterozigoții devin simptomatici. Efectul inhibitor pe care îl exercită deoxi-HbA din sângele heterozigoților asupra procesului de polimerizare a deoxi-HbS este un factor important datorită căruia heterozigoții prezintă un timp de nucleație relativ lung comparativ cu homozigoții.

În urma precipitării HbS din eritrocite membrana lor devine mai fragilă și mai rigidă, datorită deformabilității scăzute ele nu pot trece ușor prin capilare și datorită formei lor agregă, determinând insuficiența circulatorie a organelor, care crează hipoxie ce agravează starea bolnavului. Fragilizarea are drept consecință reducerea timpului de viață a eritrocitelor, provocând hemoliza timpurie a acestora, ducând la apariția unei anemii hemolitice, dar care nu deranjează viața normală a acestor heterozigoți. Heterozigoții și homozigoții HbS sunt rezistenți la malarie, afecțiune larg răspândită în Africa și țările riverane Mării Mediterane - boală parazitară provocată de *Plasmodium falciparum*, agentul patogen inoculat de țânțarul anofel. Dacă eritrocitele au HbS-mutantă ele nu pot fi infectate. Rezistența la malarie a acestei forme patologice de hemoglobină a determinat o selecție în populația regiunilor afectate de această boală parazitară a heterozigoților HbS.

Există zone și în România, mai ales în sudul țării, unde putem întâlni bolnavi suferind de siclemie. Diagnosticul se poate pune prenatal, iar la nou-născuți semne precoce ale bolii pot fi tumefieri ale membrelor superioare în primele 2-6 zile. La gravidele afectate de hemoglobinopatie S poate apare o anemie severă, insuficiență cardiacă, preeclampsie. La nevoie, acestor femei li se va administra concentrat eritrocitar.

Alte mutații cu frecvență destul de ridicată sunt **hemoglobinopatiile C** ( $Glu\beta 6 \rightarrow Lys$ ) în Africa, **D** ( $Glu\beta 121 \rightarrow Gln$ ) în Iran (Punjab), India și **E** ( $Glu\beta 26 \rightarrow Lys$ ) în Asia, la care substituțiile interesează câte un rest de acid glutamic din diferite poziții ale catenei  $\beta$ .

Modificarea secvenței de aminoacizi în poziții din interiorul hemoglobinei destabilizează toată molecula. Producții proveniți din degradarea acestor hemoglobine mutante formează *corpusculi Heinz*, precipitate granulare adsorbite pe suprafața internă a membranei eritrocitare, crescând astfel permeabilitatea acesteia, provocând hemoliză prematură manifestată prin **anemie hemolitică**. Un exemplu tipic este hemoglobinopatia  $Phe\beta 42 \rightarrow Ser$ . Înlocuirea Phe cu Ser din punga hidrofobă face posibilă intrarea apei, ceea ce determină ieșirea hemului din pungă.

Substituțiile cu tirozină ale unui radical de histidină de la nivelul centrului de legare a  $O_2$  (E7 sau F8) - care stabilizează hemul în stare oxidată ( $Fe^{3+}$ ) - anulează capacitatea de oxige-

nare a hemoglobinei, astfel aceste mutații sunt asociate cu **methemoglobinemie**. Bolnavii prezintă cianoză datorită prezenței deoxi-HbM în sângele arterial.

### 13.1.5.2 Hemoglobinopatii cantitative

În talasemii anomalia privește rata de sinteză a unor protomeri, provocând anemii de severitate diferită. Este posibil diagnosticul prenatal în aceste boli. Starea de homozigot de **talasemie  $\alpha$**  (lipsa totală a sintezei catenelor  $\alpha$ ) este incompatibilă cu viața (apare hydrops fetal), fiindcă toate tipurile de hemoglobină ale adultului (HbA, A<sub>2</sub>), respectiv HbF și Gower II conțin acest protomer.

În cazul **talasemiei  $\beta$**  gravitatea deficitului de sinteză poate fi diferită în funcție de starea de homo- sau heterozigot. Această boală oferă de asemenea rezistență la malarie.

### 13.1.5.3 Metode de investigare a anomaliilor hemoglobinei

Pentru decelarea hemoglobinopatiilor, se recomandă o serie de investigații printre care se numără în **prima etapă**: hemograma completă, electroforeza la pH 9.2, teste de solubilitate și de ciclizare, respectiv cuantificarea HbA<sub>2</sub> și HbF. Dacă în urma acestor analize inițiale se constată anomalii ale hemoglobinei, **etapa a doua** constă din electroforeză la pH 6,2, separarea lanțurilor globinice, focusare izoelectrică, etc. Dacă se suspectează prezența unei Hb instabile sau cu afinitate alterată pentru oxigen, se recomandă încălzirea probei și testul de stabilitate cu izopropanol. În completarea acestor analize, este necesară investigarea metabolismului fierului la pacientul respectiv, prin dozarea feritinei (nivelul său ne arată starea depozitelor de fier) sau determinarea indexului de saturare a transferinei.

Tehnicile analitice utilizate în studiul hemoglobinopatiilor includ în afară de cele enumerate, metode imunologice și tehnici foarte sensibile de separare, cum ar fi cromatografia lichidă de înaltă presiune (HPLC), electroforeza capilară, spectrometria de masă și analiza ADN-ului.

### *Recoltarea probelor*

Probele de sânge pentru investigarea unei eventuale hemoglobinopatii se recoltează pe anticoagulant, preferabil pe EDTA. Pentru a minimaliza formarea produșilor de degradare, se recomandă păstrarea probelor de sânge la 4°C și prelucrarea probelor în termen de 5 zile.

### *Elemente de diagnostic în hemoglobinopatii*

**Hemograma completă** constă din numărarea elementelor figurate (hematii, leucocite, plachete), calcularea indicilor eritrocitari și analiza frotiului periferic.

Indicii eritrocitari și aspectul hematiilor pe frotiu sunt esențiale pentru diagnosticul talasemiilor. Hemoglobinopatiile calitative au un impact mai mic asupra indicilor eritrocitari, dar pot prezenta anomalii morfologice pe frotiul periferic.

La pacienții suferind de talasemie, concentrația hemoglobinei și volumul mediu eritocitar (MCV) sunt scăzute. Unele studii recente ridică suspiciunea de talasemie în toate cazurile în care MCV este sub 72 fL (interval normal: 80-100 fL). Schema de investigare se va derula în sensul confirmării talasemiei și nu în sensul anemiei feriprive dacă media hemoglobinei

corpusculare (MCH) se situează sub 27 pg (interval normal 26-35 pg). În talasemii numărul hematiilor este peste intervalul normal sau în zona superioară a valorilor fiziologice, în timp ce parametrul este normal în majoritatea hemoglobinopatiilor calitative și scăzut în anemii feriprive respectiv, în anemiile din bolile cronice, paralel putându-se observa scăderea concentrației hemoglobinei. În anemiile microcitare, inclusiv cele prin deficit de fier, dimensiunile hematiilor variază (anizocitoză).

În  $\beta$ -talasemii, pe frotiul periferic, hematiile au aspect hipocrom, un înalt grad de anizopoikilocitoză, hematii în țintă, în picătură, ovalocite și punctații bazofile. La homozigoții de Hb S pe frotiu apar eritrocite falciforme alături de sferocite și microcite hipocrome (*Figura 13.11*). Eritrocite în țintă putem vedea pe frotiurile homozigoților cu Hb E și Hb C, alături de incluzii cristaline (cu Hb C) (*Figura 13.12*).

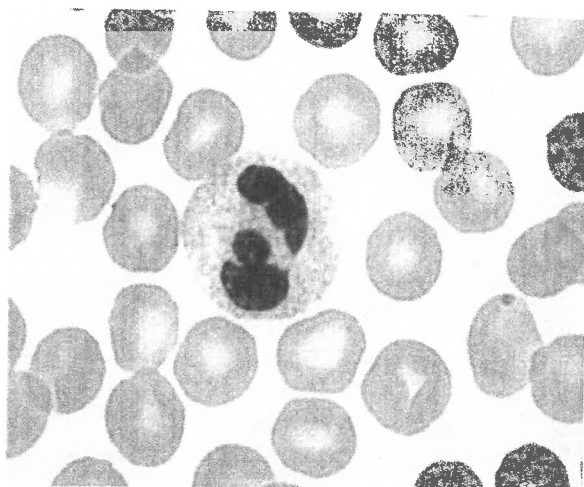
**Electroforeza alcalină** (la pH 9,2) în gel de agaroză folosind soluție de tampon barbital, este metoda cea mai comună de screening inițial pentru identificarea hemoglobinopatiilor. Benzile se pot vizualiza cu coloranți pentru proteine cum ar fi Ponceau S (culoare roșie-rozacee) sau Amido Black (colorație albastră) (*Figura 13.13*). Diversele forme de hemoglobină migrează în funcție de încărcătura lor electrică, Hb H fiind cea mai rapidă (se situează cel mai aproape de anod). Ordinea descrescătoare a migrării spre anod este: Hb H - Hb N - Hb I - Hb J - Hb A - Hb F - Hb S (co-migrează cu Hb D și Hb G) - Hb C (co-migrează cu Hb E, O, A<sub>2</sub>).

**Electroforeza acidă** (la pH 6,4) utilizând tampon citrat, se aplică atunci când pe traseul de electroforeză alcalină s-a evidențiat o bandă de hemoglobină anormală. Mediul preferat este gel de agaroză, cel mai des se utilizează colorantul Acid Violet. Ordinea descrescătoare a migrării spre anod este Hb C - Hb S - Hb A și Hb F. Hemoglobinele D, G, I, J, O, A<sub>2</sub> și E co-migrează cu Hb A. Pe baza poziției benzilor obținute la cele două tipuri de electroforeză, se poate pune diagnosticul prezumptiv de hemoglobinopatie.

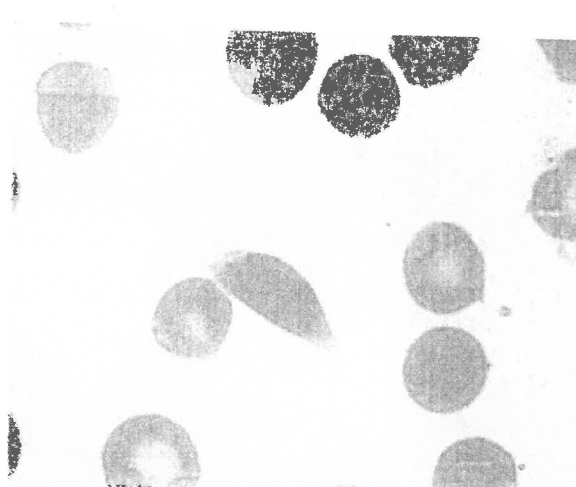
**Electroforeza cu focusare izoelectrică.** Diagnosticul definitiv, inclusiv cuantificarea diverselor tipuri de hemoglobină cu ajutorul densitometriei, se poate realiza cu ajutorul electroforezei cu focusare izoelectrică, care are putere de rezoluție mai mare decât electroforeza convențională, dar este mai laborioasă și mai costisitoare. La această metodă se utilizează geluri de poliacrilamidă sau acetat de celuloză, și se realizează un gradient de pH cu ajutorul unor materiale amfotere cu pH-uri diferite incluse în benzi în cadrul gelului. O variantă automatizată a acestei metode este electroforeza *capilară de focalizare izoelectrică*.

**Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC)**, utilizând o rășină schimbătoare de cationi, ne oferă posibilitatea cuantificării hemoglobinei F, eventual și a formei A<sub>2</sub>, respectiv poate evidenția o serie de alte variante patologice de hemoglobină (Hb S, D, E, C) pe baza timpului lor diferit de eluție, și poate releva fenotipurile de talasemie  $\alpha$  (*Figura 13.14*). Această metodă se poate utiliza și pentru determinarea valorii hemoglobinei glicozilate (HbA<sub>1c</sub>) la pacienții diabetici cu scopul evaluării echilibrului metabolic glucidic (*Figura 13.15*).

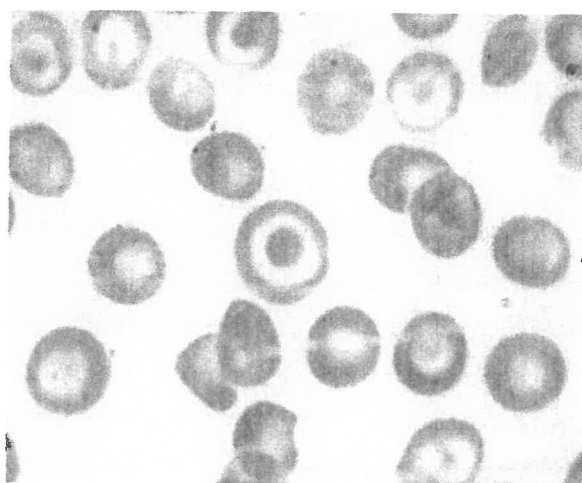
Uneori se utilizează **teste speciale** cum ar fi *testul de siclizare*, util în confirmarea hemoglobinopatiei S. În cadrul acestei analize, se recurge la deoxigenarea și liza hematiilor cu o soluție de metabisulfid de sodiu în tampon fosfat, ceea ce cauzează turbiditatea probelor



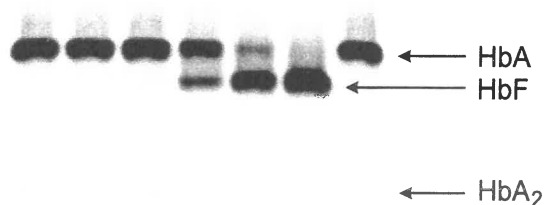
**Figura 13.10** Frotiu periferic normal (colorație MGG) cu multe hematii de aspect fiziologic (normocite), un leucocit polimorfonuclear și câteva plachete (colecția Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș)



**Figura 13.11** Frotiu periferic la un heterozigot de HbS: hematii în seceră, microcite, sferocite (colecția Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș)



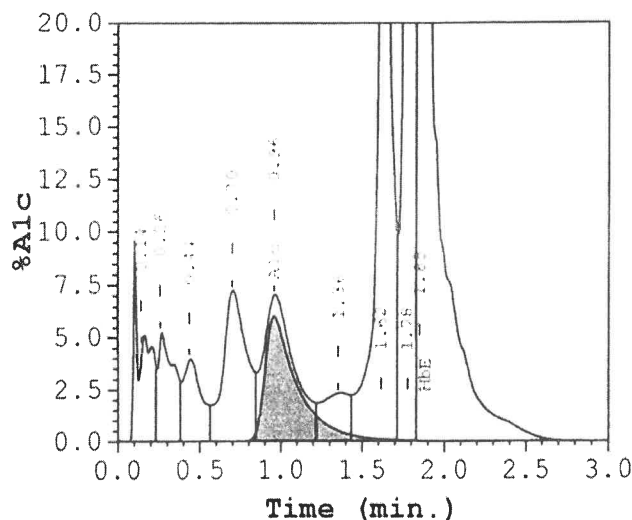
**Figura 13.12** Frotiu periferic la un heterozigot cu Hb C: se vede un eritrocit în țintă (colecția Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș)



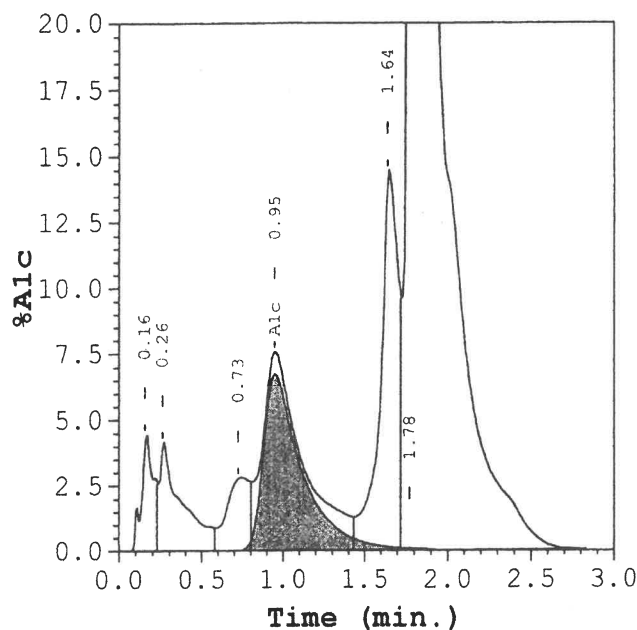
**Figura 13.13** Electroforeză alcalină, colorație cu Amido Black (colecția Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș)

care conțin HbS și incapacitatea de a citi un text aflat în spatele eprubetei. La fiecare test se va efectua obligatoriu un control pozitiv și unul negativ. La o probă cu hemoglobina normală hemolizatul este suficient de transparent ca să se poată citi un text prin el.

*Testele pentru identificarea hemoglobinelor instabile* se efectuează din probe de sânge proaspete, utilizând căldura sau izopropanolul pentru a precipita Hb instabilă. Se cunosc peste 100 de hemoglobine instabile, rezultate ale unor mutații punctiforme de înlocuire a unor resturi de aminoacizi apolari cu cei polari în cadrul lanțurilor  $\alpha$  sau  $\beta$  la nivelul pungii hidrofobe a hemului. Izopropanolul apolar slăbește legăturile din interiorul moleculei de Hb, diminuând stabilitatea acesteia. Hb normală (Hb A) precipită în 40 de minute la 37°C în prezența soluției de 17% de izopropanol în tampon TRIS de pH 7,4. Hemoglobinele in-



**Figura 13.14** Cromatogramă HPLC la un heterozigot cu Hb E  
(colecția Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș)



**Figura 13.15** Cromatogramă HPLC la un pacient diabetic  
(colecția Laboratorului Central al Spitalului de Urgență Tîrgu Mureș)

stabile precipită de regulă în decurs de 5 minute în aceste condiții. Hemoglobina normală este stabilă în cazul încălzirii la 50°C, în timp ce hemoglobinele instabile precipită în diverse cantități la această temperatură.

În cadrul *analizei lanțurilor de globină*, prima etapă este disocierea hemului de catenele polipeptidice din hemolizat folosind ureea și ditiotritolul. Lanțurile globinice sunt apoi separate prin electroforeză la pH acid și bazic. Metoda HPLC poate fi utilizat de asemenea pentru separare. Lanțurile globinice vor fi identificate prin compararea timpului lor de retenție sau a mobilității lor electroforetice cu probe de referință.

#### 13.1.5.4 Aspecte clinice

Talasemiile și hemoglobinopatiile constituie două categorii distincte de boli genetice, în ciuda unor manifestări clinice similare cum ar fi anemia de diferite grade de severitate.

**Talasemiile** au la bază tulburarea sintezei unor lanțuri globinice induse de o varietate de cauze, cum ar fi deleții ale genelor, mutații nonsens, mutații care afectează transcripția, etc. Denumirea lor provine din cuvântul grecesc *thalassa* (= mare), fiindcă primele cazuri decelate de  $\beta$ -talasemie au fost descrise la copii din zona Mării Mediterane.

Hemoglobinopatiile reprezintă cele mai comune boli genetice care interesează o singură genă, consecința modificărilor apărute în secvența de aminoacizi din cadrul lanțurilor globinice este apariția multiplelor variante de hemoglobină.

### **$\alpha$ -Talasemiile**

Mutațiile pot afecta una sau mai multe dintre cele 4 gene responsabile de sinteza catenelor  $\alpha$  globinice. Prin convenție termenul de  $\alpha^0$ -talasemie se utilizează atunci când cele două gene afectate se află pe același cluster de gene ( $-/\alpha\alpha$ ). Termenul de  $\alpha^+$ -talasemie se utilizează atunci când deleția afectează gene aflate pe cluster opuse ( $-\alpha/-\alpha$ ). Deleția unei singure gene ( $\alpha\alpha/-\alpha$ ) se numește  $\alpha$ -talasemie minoră. Manifestările clinice ale  $\alpha$ -talasemiei variază de la stări incompatibile cu viața până la anemii ușoare.

*Hemoglobina Bart* rezultă în urma deleției tuturor celor 4 gene responsabile de sinteza catenelor  $\alpha$  globinice, astfel organismul respectiv este incapabil să producă lanțuri  $\alpha$  globinice necesare sintezei Hb A, F și  $A_2$ . La feții afectați apare un exces de lanțuri  $\gamma$ -globinice care se asociază formând un tetramer denumit Hb Bart. Gravidele a căror feți suferă de această boală prezintă de regulă între săptămânile 20 și 26 de gestație hipertensiune și polihidramnios, iar ecografia relevă hydrops fetal. Probele de sânge prelevate de la acești feți prin cordocenteză arată de regulă anemie severă (Hb sub 8 g/dL). Este important să se excludă celelalte cauze de hydrops fetal prin efectuarea testelor TORCH (toxoplasmoză, rubeolă, citomegalovirus și herpes simplex). Hydropsul fetal duce aproape invariabil la deces intrauterin sau în perioada de nou născut (la câteva ore după naștere). Tratamentul cu transfuzii intrauterine are un succes foarte limitat, pot apare numeroase complicații cum ar fi retardarea în creștere sau leziuni cerebrale severe datorate probabil anemiei severe intrauterine.

*Boala hemoglobinei H* este cauzată de deleția la nivelul a trei gene  $\alpha$  globinice ( $-/-\alpha$ ) și se caracterizează printr-o anemie cronică de severitate variabilă cu formarea unor tetrameri de catene  $\beta$  cu solubilitate redusă denumite Hb H. Pe frotiu se pot observa hematii conținând incluzii punctiforme. Tratament cu transfuzii este indicat doar în condiții speciale (boli acute, sarcină, expunere la medicamente sau oxidanți care destabilizează Hb H, provocând precipitarea acestei forme patologice de hemoglobină).

*$\alpha$ -Talasemia majoră* este rezultatul deleției la nivelul a două gene ale lanțurilor  $\alpha$ . Acestea pot fi deleții cis ( $-/\alpha\alpha$ ) sau trans ( $-\alpha/-\alpha$ ). Pacienții prezintă doar o anemie ușoară.

*$\alpha$ -Talasemia minoră* ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) este de obicei asimptomatică clinic și hematologic.

### **$\beta$ -Talasemiile**

Tulburarea genetică care afectează sinteza catenelor  $\beta$  duce la apariția  $\beta$ -talasemiilor, boală cu frecvență ridicată în bazinul Mării Mediterane, în Africa și în unele regiuni din Asia. Ma-

nifestările clinice variază de la anemii ușoare până la condiții severe necesitând transfuzii pe parcursul întregii vieți.

*$\beta$ -Talasemia majoră* ( $\beta^0$ -talasemia) rezultă mai ales prin mutații care afectează sinteza catenelor  $\beta$  la nivelul translației. Manifestările clinice apar sub vârsta de un an, incluzând distrofie și creșterea circumferinței abdominale. Apar baze frontale (proeminente rotunde la nivelul frunții) datorate îngroșării oaselor craniene, paloare, proeminența maxilarului superior. Acestea apar în urma expansiunii măduvei osoase hematogene din cauza eritropoiezei ineficiente cu producerea tetramerilor de lanțuri  $\alpha$  foarte instabile. Splina, ficatul și cordul pot fi mărite datorită hematopoezei extramedulare.

La pacienții afectați apare anemie severă (Hb între 3-6,5 g/dl), pe frotiu se poate observa anizocitoză (hematii cu mărimi diferite) cu numeroase microcite, celule în țintă, policromazie (aparitia unor hematii tinere - policromatofile - în sângele periferic, cu diametru mai mare decât hematiile normale, colorate albastru-violaceu), ocazional sferocite (hematii mici, intens colorate, fără paloare centrală), schizocite (fragmente neregulate de eritrocite) sau hematii nucleate (forme imature). Hematiile afectate prezintă o fragilitate osmotică ridicată. Bilirubinemia este ușor ridicată, urina conține cantități crescute de urobilinogen și urobilină, are culoare maronie închisă. Pe electroforeză forma dominantă este Hb F, vârful Hb A este absent, iar fracțiunea Hb A<sub>2</sub> este reprezentat variabil. Terapia constă din transfuzii repetate alături de chelatori de fier (cu scopul întârzierii apariției hemosiderozei), deseori se recurge la splenectomie. Pubertatea apare tardiv, incomplet sau poate fi chiar absentă la unii pacienți.

*$\beta$ -Talasemia intermediară* ( $\beta^+$ -talasemia) apare în cazul reducerii semnificative a producerii lanțurilor  $\beta$ -globinice cu scăderea consecutivă a cantității Hb A. Manifestările clinice pot fi de severitate diferită. Terapia cu hidroxiuree este des utilizată cu scopul creșterii producerii de Hb F. Pe cromatogramele efectuate cu HPLC se observă un vârf mare de Hb F și unul mic de Hb A. Concentrația hemoglobinei este redusă (6-10 g/dl), caracteristicile hematiilor pe frotiul periferic sunt cele descrise la  $\beta^0$ -talasemie.

*$\beta$ -Talasemia minoră* este adesea asimptomatică, cu excepția perioadelor de stres hematopoietic cum ar fi sarcina sau infecțiile. Frotiul periferic arată microcitoză, ocazional hipocromie, poikilocitoză (hematii cu modificări de formă) sau celule în țintă.

*$\delta\beta$ -Talasemia* are prevalență mare în bazinul Mării Mediterane, în special în Italia și Grecia. Apare în urma deleției genelor lanțurilor  $\delta$  și  $\beta$ , se caracterizează printr-o cantitate redusă de Hb A<sub>2</sub> și creșterea concentrației de Hb F.

*Persistența ereditară de hemoglobină fetală* este asimptomatică clinic, se caracterizează prin creșterea concentrației Hb F datorită sintezei reduse de catene  $\beta$  și intensificarea compensatorie a sintezei catenelor  $\delta$ . Hb F poate fi chiar 35% din Hb totală.

Sunt peste 900 de **hemoglobinopatii** descrise până în prezent, dintre care doar 9 au semnificație clinică. Migrarea populațională din regiunile cu frecvență ridicată a hemoglobinopatiilor (Asia de Sud-Est și Africa) către regiunile cu incidență mică a acestora (Vestul și centrul Europei, America) au crescut numărul de cazuri înregistrate în aceste zone. Unele variante de hemoglobină interferează cu metodele HPLC care cuantifică Hb A1c.

Din punct de vedere genetic, hemoglobinopatiile pot fi cauzate de diverse tipuri de mutații. Există o bază de date accesibilă pe internet (pe web site-ul <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>) unde se pot găsi mutațiile corespunzătoare diferitelor hemoglobinopatii.

Hemoglobinopatia S a fost descrisă anterior. Există și forme hibride, cum ar fi boala caracterizată prin **Hb SC**, unde catenele  $\beta$  suferă substituție în poziția 6 fie cu valină (Hb S), fie cu lizină (Hb C). De asemenea, au fost descrise cazuri de **Hb SD**, cu manifestări clinice similare, dar mai blânde comparativ cu homozigoții de siclemie.

**Homozigoții de Hb C, Hb D și E** prezintă de regulă anemie ușoară sau moderată, în timp ce heterozigoții sunt asimptomatici.

La pacienții cu **Hb Lepore** lanțurile  $\alpha$  sunt normale, iar cele non- $\alpha$  sunt hibride având structură asemănătoare cu catenele  $\delta$  în porțiunea N terminală și cu lanțurile  $\beta$  la capătul C terminal, ca rezultat al unui crossing over dintre genele acestora. Există 3 forme distincte de Hb Lepore: Hollandia, Baltimore și Boston-Washington. Pe HPLC găsim o falsă creștere a Hb A<sub>2</sub> (peste 10% din Hb totală), datorită faptului că se co-eluează cu Hb Lepore. Pe electroforeză alcalină se observă o bandă în poziție S (Hb Lepore-Baltimore-Washington) sau între S și A, iar la electroforeză acidă apare o bandă în poziție A la toate cele trei forme. Efectuând hemograma, la homozigoți se observă scăderea concentrației hemoglobinei, MCV și MCH, manifestările clinice fiind similare cu cele descrise la  $\beta$ -talasemie majoră sau intermediară. La heterozigoți modificările hematologice sunt ușoare, manifestarea bolii seamănă cu  $\beta$ -talasemia minoră.

## 13.2 METABOLISMUL FIERULUI

În condiții normale în majoritatea celulelor din organism și în lichidele extracelulare sunt prezente cantități foarte mici de fier. Acest element este bine conservat, zilnic se pierde mai puțin de 0,1% din cantitatea totală de fier din organism, în special prin celulele descuamate.

### 13.2.1 DISTRIBUȚIA FIERULUI ÎN ORGANISM

Fierul este prezent în organism în numeroase compartimente printre care se numără cromoproteinele, fierul de stocaj, fierul tisular, existând o dinamică permanentă între acestea.

#### 13.2.1.1 Fierul din hemoglobină și mioglobină

Fiecare mililitru de eritrocite conține 1 mg de fier, astfel un adult de 70 de kg (care are aproximativ 2 litri de masă eritrocitară) conține 2 g de fier în componența hemoglobinei. Mioglobina seamănă foarte mult cu o subunitate de hemoglobină.

#### 13.2.1.2 Depozitele de fier

Fierul este stocat în organism sub formă de feritină și hemosiderină. Feritina constă dintr-un nucleu de fier ( $\text{FeOOH}$  – oxihidroxid feric) cu înveliș proteic (apoferitină), iar hemosiderina se formează în urma înglobării feritinei în lizozomi, acesta constituind punctul final de stocaj intracelular al fierului. Eliberarea fierului din feritină include o etapă de reducere în urma

căreia fierul feric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) din forma stocată se transformă în fier feros ( $\text{Fe}^{2+}$ ) care difuzează în exteriorul celulei.

*Feritina* se găsește aproape în toate celulele organismului. Mai ales în hepatocite și în macrofagele măduvei osoase, dar și în alte organe, feritina asigură o rezervă de fier disponibilă oricând pentru formarea Hb sau a altor hem-proteine, într-o formă în care fierul este separat de lichidele organismului, neprovocând distrugerii oxidative, ceea ce s-ar produce dacă el ar fi sub formă ionică. La un adult sănătos de sex masculin cantitatea totală de fier depozitat este de aproximativ 800 mg.

Cantități foarte mici de feritină se găsesc și în ser, în concentrații proporționale cu depozitele de fier, astfel dozarea feritinei serice este un parametru biochimic fidel, larg utilizat pentru evaluarea stocurilor de fier din organism.

*Hemosiderina* este feritină agregată, parțial deproteinizată, insolubilă în soluții apoase, spre deosebire de feritina solubilă. Fierul este eliberat lent din agregatele de hemosiderină, probabil datorită raportului mic dintre suprafață și volum. Hemosiderina predomină, asemănător feritinei, în celulele hepatice, ale splinei și măduvei osoase.

Evaluarea hematologică a rezervelor de fier din organism se efectuează prin examinarea microscopică a măduvei osoase (se aleg frotiuri conținând grunji striviți), cu ajutorul metodei de colorare Perls (fixare în vapori de formol, colorare cu ferocianură de potasiu acidă și safranină). Această metodă evidențiază hemosiderina medulară colorată în albastru sub formă de granule mici în eritroblaști (sideroblaști) și eritrocite (siderocite), respectiv sub formă de granule mari sau sub formă difuză în macrofage (MF).

Sideroblaștii variază între 10-60%. Hemosiderina din macrofage se exprimă semicantitativ față de normal (absentă, cantitate normală sau crescută). Această metodă este foarte sensibilă pentru identificarea rezervelor de fier din măduva osoasă și permite diferențierea anemiei feriprive față de celelalte tipuri de anemii hipocrome, apărute prin blocarea sintezei hemului, ducând la creșterea fierului neheminic (Tabel 13. II).

### 13.2.1.3 Fierul tisular

Numeroase enzime și coenzime din cadrul celulelor necesită fier, ca și parte integrantă a moleculei, ori drept cofactor. Exemple notabile ar fi peroxidazele și citocromii, ambele fiind hem-proteine. Compartimentul tisular al fierului conține numai cca. 8 mg de fier, dar

**Tabelul 13.II. Criterii de diferențiere a diverselor tipuri de anemii hipocrome cu ajutorul aspectului hemosiderinei medulare**

Tip de anemie	Grad hipocromie	Sideremia	Sideroblaști	Hemosiderina în MF
Anemie feriprivă	marcată	scăzută	<10%, sau absenți	absentă
Anemie din infecții, neoplazii	moderată	scăzută	scăzuți sau absenți	crescută
Talasemii	marcată	crescută	crescuți	crescută
Anemie din saturnism	moderată	crescută	crescuți	crescută
Anemii sideroblastice	marcată	crescută	inelari, crescuți	foarte crescută

are importanță metabolică critică. Unele activități enzimatice diminuează precoce în cursul deficitului de fier.

#### 13.2.1.4 Rezerva labilă

Constă dintr-o cantitate de aproximativ 80 mg de fier, nu are o delimitare anatomică exactă, poate fi cuantificată cu ajutorul fierului marcat radioactiv prin determinări cinetice.

Celulele internalizează fierul prin intermediul *receptorului de transferină* de la suprafața lor. Numărul acestor receptori este proporțional cu necesitatea de fier a celulei. Un produs proteolitic al receptorului de transferină circulă în plasmă, acest compus poartă numele de *receptor solubil al transferinei*, nivelul său fiind proporțional cu cantitatea totală de receptor de transferină celular.

*Hepcidina* este un hormon polipeptidic sintetizat la nivel hepatic, care are rolul de a lega, internaliza și degrada un canal membranar denumit feroportina, canal responsabil pentru exportul fierului din enterocite și celulele sistemului reticulo-endotelial. Hepcidina are rol regulator asupra fierului plasmatic, inhibând eliberarea fierului în circulație (vezi și 6.4.4.4).

### 13.2.2 TRANSPORTUL FIERULUI

Fierul este transportat în plasmă legat de transferină, o  $\beta_1$ -globulină cu două locuri de legare a fierului. Complexul format dintre  $\text{Fe}^{3+}$  și apotransferină se numește transferină. În urma legării transferinei la receptorul său specific de pe suprafața celulelor, complexul transferină-receptor se internalizează într-o vacuolă care va fi acidifiată, eliberând astfel fierul de pe transferină, iar apoproteina se reciclează.

### 13.2.3 REGLAREA HOMEOSTAZIEI FIERULUI

Reglarea cantității de fier din organism depinde aproape integral de modularea absorbției sale la nivelul intestinului subțire.

Din cantitatea de 10-15 mg de fier ingerat zilnic prin dietă, se absoarbe doar aproximativ 1 mg la nivelul duodenului, sub formă anorganică de fier feros ( $\text{Fe}^{2+}$ ) sau sub formă de hem ca atare. Cantități mari de fier ușor de asimilat găsim în special în alimentele de origine animală: ficatul, carnea (conține Mb), gălbenușul de ou, cantități mai mici găsim în varză, spanac, etc. Numeroase proteine iau parte la reglarea homeostaziei fierului: transferina, feroportina, ceruloplasmina,  $\beta_2$ -microglobulina etc. La nivelul intestinului subțire, există o blocadă a mucoasei, care nu permite absorbția unor cantități prea mari de fier, proteina din peretele celular saturându-se cu fier. La pacienții cu anemii feriprive absorbția fierului este de obicei crescută pentru a completa nevoile ridicate ale organismului.

### 13.2.4 METODE ANALITICE

În laboratoarele clinice se poate determina concentrația serică a fierului, capacitatea de legare a fierului, saturația transferinei, nivelul feritinei serice și dozarea receptorilor solubili ai transferinei.

### 13.2.4.1 Dozarea fierului seric (sideremie)

În majoritatea metodelor standardizate principiul dozării constă din următoarele etape: eliberarea fierului din legătura sa cu transferina prin scăderea pH-ului serului, urmat de reducerea fierului feric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) la cel feros ( $\text{Fe}^{2+}$ ) și complexarea sa cu un cromogen de tipul orto- sau bathofenantrolinei, ferozinei sau  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilului, cu absorbanță ridicată la o lungime de undă corespunzătoare, proporțională cu concentrația fierului.

Metodele se pot efectua manual sau într-o manieră automatizată, cele care includ etape de deproteinizare ne dau de regulă rezultate mai ridicate față de cele care nu conțin această etapă, așadar valorile de referință trebuie stabilite de fiecare laborator în parte. În general, se consideră fiziologice sideremii între 90-160  $\mu\text{g/dL}$  la bărbați și între 80-130  $\mu\text{g/dL}$  la femei, adică 14-28  $\mu\text{mol/L}$  respectiv 13-27  $\mu\text{mol/L}$ .

### 13.2.4.2 Capacitatea totală de legare a fierului (TIBC = total iron binding capacity)

Se determină prin adăugarea unei cantități suficiente de  $\text{Fe}^{3+}$  ca să se satureze locurile de legare a fierului de pe transferină. Excesul de fier este înlăturat, după care se determină din nou concentrația fierului. Cu ajutorul acestor date obținute se poate calcula saturația transferinei utilizând formula de mai jos:

$$\text{Saturația transferinei (\%)} = (100 \times \text{sideremie}) / \text{TIBC}$$

Valorile normale ale saturației transferinei se situează între 20-60%.

### 13.2.4.3 Dozarea feritinei

Se poate realiza prin diverse metode moderne, incluzând cele imunoradiometrice, ELISA, imunochemiluminiscentă sau dozări imunofluorometrice. Valorile de referință diferă în funcție de metoda utilizată, astfel fiecare laborator trebuie să-și stabilească intervalul fiziologic. În general se consideră normale valorile prezentate în cadrul *Tabelului 13.III*.

Dozarea **receptorului solubil al transferinei** se poate realiza din ser sau plasmă, există posibilitatea utilizării metodei ELISA.

Dozarea **hepcidinei** se efectuează din ser sau urină, metoda cea mai accesibilă este cea imunoenzimatică ELISA.

**Tabelul 13.III** Intervalele de referință pentru valorile feritinei serice în funcție de vârstă și sex

Categorie de pacient	Valoare normală ( $\mu\text{g/L}$ )
Nou născut	25-200
Sugar de 1 lună	200-600
Sugar de 2-5luni	50-200
Copil 6 luni-15 ani	7-140
Bărbat adult	20-250
Femeie adultă	20-200

### 13.2.5 SEMNIFICAȚIA VALORILOR PATOLOGICE DE LABORATOR

Nivelul **sideremiei** este scăzut la majoritatea pacienților cu anemii feriprive și la cei care prezintă boli inflamatorii acute sau cronice, imunizări, infarct miocardic acut, boli maligne. La cei cu anemie feriprivă se observă creșterea compensatorie a nivelului transferinei, în schimb în bolile inflamatorii din cadrul unor infecții acute și cronice macrofagele înglobează fierul împreună cu apotransferina, ducând astfel la scăderea nivelului acestei proteine. Internalizarea fierului în macrofage are scopul de a limita accesul microorganismelor la acest element, necesar pentru multiplicarea lor. Din acest considerent, nu se recomandă administrarea tratamentului cu preparate de fier în prezența unor infecții intercurrente.

Valori scăzute ale fierului seric putem găsi și la pacienții suferind de alte forme de anemie în primele zile de tratament, de exemplu la cei cu anemie pernicioasă sub tratament cu ciancobalamină, explicația fiind consumul crescut de fier în urma hematopoiezei accelerate (în aceste circumstanțe se poate observa pe frotiul periferic criza reticulocitară, adică apariția în cantități mari a formelor eritrocitare tinere în sânge). Nivelul sideremiei scade în urma pierderilor de sânge, prin hemoragii de diverse cauze. La bărbați majoritatea hemoragiilor sunt de origine digestivă, iar la femei de origine genitală.

**Valori ridicate** ale sideremiei întâlnim în anemiile aplastice, sideroacrestice (sidero = fier, acro = vârf, în limba greacă), în care există un deficit de utilizare a fierului în urma unor tulburări genetice care afectează sinteza hemului. Sideremii ridicate apar în cazul intoxicației cu fier pe cale orală sau parenterală și în hepatite acute. Consecința supraîncărcării organismului cu fier este apariția hemosiderozei și hemocromatozei (diabet de bronz), cu afectarea ficatului (ciroză hepatică) și a pancreasului din cauza depozitelor excesive de fier.

În mod normal doar o treime din locurile de legare al fierului de pe apotransferină sunt ocupate cu  $\text{Fe}^{3+}$ , așadar transferina are o capacitate de rezervă considerabilă de legare a fierului. TIBC este măsura concentrației maxime de fier care poate fi legată de transferină. TIBC este adesea crescută în deficit de fier și scăzută în boli maligne sau boli inflamatorii cronice, respectiv în hemocromatoze.

**Feritina** este prezentă în ser în cantități infime. Deși face parte dintre proteinele de fază acută, ea reflectă de regulă în linii mari conținutul în fier al organismului. Nivelul feritinei plasmatice scade foarte precoce în cazul unui deficit de fier, mult mai repede comparativ cu scăderea hemoglobinei, micșorarea hematiilor sau scăderea sideremiei.

O serie de boli cronice se caracterizează prin creșterea nivelului feritinei, cum ar fi infecțiile și inflamațiile cronice (de ex., poliartrita reumatoidă), bolile renale sau ale cordului, tumorile maligne (în special limfoame, leucemii, cancer de sân, neuroblastom). Valori crescute ale feritinei întâlnim de asemenea în hepatite virale sau după leziuni toxice ale ficatului, în urma eliberării de feritină din celulele hepatice lezate. Asocierea deficitului de fier cu una dintre aceste condiții patologice poate duce la o valoare normală a feritinei la pacientul respectiv, ceea ce îngreunează diagnosticul. Valori crescute ale feritinei plasmatice se pot observa și în cadrul bolilor de stocaj al fierului, totuși dozarea acesteia nu se recomandă ca și test screening pentru identificarea stadiilor precoce de hemocromatoză, fiind o analiză mai puțin

sensibilă decât sideremia, TIBC sau determinarea procentajului de saturație a transferinei.

Determinarea **receptorilor solubili de transferină** este o analiză modernă care ne dă informații despre componenta funcțională a homeostaziei fierului, ea crește în carența de fier și scade în caz de supraîncărcare. Poate oferi un ajutor în diferențierea anemiei feriprive de anemia din bolile cronice, în special dacă se evaluează sub forma unui index. Luând în considerare și concentrația feritinei.

Concentrația **receptorului solubil al transferinei** din circulație este proporțională cu rata eritropoiezei, deoarece utilizarea fierului este mai pronunțată la nivelul celulelor precursorare eritroide. Nivelul său este ridicat în anemia feriprivă datorită competiției celulelor în vederea obținerii fierului necesar.

Inflamația și starea de saturație a depozitelor de fier stimulează sinteza **hepcidinei**. Creșterea necesarului de fier pentru eritropoieză, precum și hipoxia inhibă sinteza hepcidinei în ficat. În numeroase afecțiuni (hemocromatoza ereditară, anemia feriprivă, anemia din boli cronice și inflamatorii) este afectat mecanismul reglator al hepcidinei.

### 13.2.6 INFORMAȚII PRACTICE, COMENTARII

Cu excepția utilizării spectroscopiei de absorbție atomică, hemoliza discretă nu influențează dozarea sideremiei, datorită faptului că fierul nu iese din hemoglobină în urma tratamentului acid. Totuși, probele care prezintă hemoliză masivă trebuie refuzate, fiindcă la acestea o cantitate mică de fier s-ar putea elibera din Hb.

La recoltarea probelor se va evita contaminarea cu fier a seringilor sau eprubetelor pentru a evita obținerea unor valori fals crescute ale sideremiei. Nivelul sideremiei, TIBC și saturația transferinei sunt influențate de diverși factori. Există variații diurne, dimineața obținem valori normale, apoi observându-se scăderea valorilor pe parcursul zilei; la femei se constată nivele ușor crescute ale sideremiei în perioada premenstruală, iar în timpul menstruației apar valori puțin mai scăzute; contraceptivele orale (în urma conținutului de progesteron) provoacă uneori creșteri marcate ale parametrilor enumerați. În cursul sarcinii sideremia poate fi elevată datorită progesteronului, sau din contră poate fi scăzută ca urmare a deficitului de fier.

Din cauza scăderii preciziei de dozare a feritinei la valori foarte ridicate, probele la care s-au măsurat valori de peste 800  $\mu\text{g/L}$  se vor dilua până se obțin valori în intervalul 200-400  $\mu\text{g/L}$ .

### 13.2.7 CONSIDERENTE CLINICE

**Deficitul de fier** este una dintre tulburările cu prevalența cea mai mare din patologia umană. Este des întâlnit la copii, femei tinere și persoane în vârstă, dar poate apare la orice vârstă și în cadrul persoanelor din orice statut social. La copii boala este cauzată de regulă de un deficit în dietă, deoarece laptele conține puțin fier. La adulți, cauza este aproape fără excepții pierderea cronică de sânge sau nevoile crescute de fier din contextul sarcinii. La femeile gravide, din cauza necesarului crescut de fier, se recomandă suplimentarea acestui element, în special în ultimele două trimestre ale sarcinii. La sugari până la vârsta de 6 luni alimentația naturală previne apariția anemiei feriprive, datorită prezenței lactoferinei, o proteină

specifică laptelui de femeie (absentă de exemplu în laptele de vacă), care are capacitate de legare a fierului. După vârsta de 6 luni toți sugarii, inclusiv cei alăptați, trebuie să primească alimente cu conținut ridicat de fier, cum ar fi gălbenușul de ou sau ficatul.

Absorbția fierului este mai bună dacă se asociază cu agenți reducători (de exemplu vitamina C), care transformă fierul feric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) în fier feros ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Tratamentul cu fier nu se va opri în momentul vindecării anemiei, ci se va continua până la refacerea rezervelor de fier pentru a evita reapariția anemiei feriprive.

**Hemosideroza** este termenul utilizat pentru supraîncărcarea organismului cu fier fără leziuni tisulare asociate. Apare local în zonele de sângerare sau de inflamație, sau poate fi extinsă la persoanele care au primit cantități masive de fier sub formă medicamentoasă sau în urma unor transfuzii repetate de sânge.

**Hemocromatoza** reprezintă o condiție patologică în care organismul acumulează cantități excesive de fier, face parte dintre bolile genetice cele mai comune. Simptomele hemocromatozei includ triada clasică de bronzare tegumentară, ciroză și diabet zaharat. Manifestările bolii pot include cardiomiopatii și aritmii, tulburări endocrine și artropatii.

**Hemocromatoza ereditară** rezultă în urma unor modificări ale proteinelor care au rol important în reglarea homeostaziei fierului. Forma care apare la adulți a fost supranumită *hemocromatoză primară sau idiopatică*, este o boală legată de locusurile HLA aflate pe cromozomul 6. O formă mai severă, cu debut precoce este *hemocromatoza juvenilă*, există și tipuri de hemocromatoză în care depozitele excesive de fier apar predominant în macrofage, nu în parenchimul hepatic, cum ar fi varianta legată de *deficitul de feroportină*.

*Hemocromatoza ereditară (idiopatică)* este forma clasică de supraîncărcare cu fier. Se datorează unei tulburări înnăscute de absorbție a fierului, dar mecanismul patogenetic exact nu se cunoaște. Mutația genei HFE este un polimorfism des întâlnit în cadrul populației din Europa de Nord (10-15% sunt heterozigoți, iar homozigoții apar cu frecvența de 5/1000). Mutația este asociată cu receptorul de transferină, dar mecanismul prin care acesta cauzează absorbția crescută a fierului este necunoscut. Peste jumătate dintre homozigoți prezintă valori crescute ale saturației transferinei și/sau a feritinei, dar hemocromatoza severă, conform studiilor recente, se manifestă doar la un număr mic de subiecți afectați de această mutație, majoritatea homozigoților fiind asimptomatici.

*Hemocromatoza juvenilă* este o afecțiune congenitală rară, care seamănă clinic cu hemocromatoza ereditară, dar debutează mult mai precoce și persoanele afectate au o tendință mai mare de a dezvolta tulburări endocrine și cardiace comparativ cu cei suferind de forma adultă descrisă anterior. Mutația nu este la nivelul genei HFE, dar locul exact al alterării genetice nu este încă identificat (se bănuiește că ar fi pe cromozomul 1).

**Hemocromatoze secundare** apar în urma administrării masive sau absorbției crescute de fier. Pacienții suferind de unele forme de anemii care necesită transfuzii sanguine repetate pot dezvolta hemocromatoză, de asemenea și cei care primesc din cauza unei anemii tratamente cu fier dar fără să aibă deficit de fier. Cele mai des întâlnite cauze ale hemocromatozei secundare sunt talasemia majoră și stările de mielodisplazie, dar pot apare și în contextul unui deficit de piruvat-kinază sau în cadrul unor anemii diserythropoietice congenitale.

### 13.2.8 ANEMII CU STOCARE EXCESIVĂ DE FIER

Cea mai comună cauză de supraîncărcare cu fier este talasemia, în special în zonele unde această boală are prevalență mare. Complicațiile cardiace în urma supraîncărcării cu fier sunt cele mai frecvente cauze de deces în  $\beta$ -talasemia majoră.

*Anemiile sideroblastice* reprezintă un grup de tulburări cu supraîncărcare de fier, majoritatea lor neavând cauza descifrată. În forma ereditară a acestei tulburări există un deficit al sintetazei acidului 5-aminolevulinic în precursorii eritrocitari din cauza unor mutații care afectează genele implicate în sinteza acestei enzime. Stocarea excesivă de fier este des întâlnită la pacienții cu anemie diseritropoietică congenitală, și poate apare la cei cu deficite enzimatice eritrocitare, în particular cei cu deficit de piruvat kinază.

## 13.3 DEGRADAREA HEMULUI. ICTERE

Hemul provenit din diferitele hemoproteine se catabolizează printr-un mecanism unic dar cu viteze diferite în primele etape. La om și la animale de experiență cărora li s-a administrat glicină sau acid  $\delta$ -aminolevulinic marcați radioactiv s-a constatat apariția în timp a două maxime de producere a bilirubinei, principalul intermediar în degradarea hemului. Primul maxim apare la cca. trei zile și el corespunde formării și degradării parțiale a hemoproteinelor nehemoglobinice, în particular a citocromului  $P_{450}$  și a catalazei. La om, al doilea maxim, care cuprinde circa 75% din radioactivitatea administrată, apare după 120 zile. Această bilirubină derivă numai din degradarea Hb știut fiind că durata de viață a eritrocitelor este de cca. 120 zile.

### 13.3.1 ETAPELE DEGRADĂRII HEMULUI

Catabolismul hemoglobinei eritrocitare începe odată cu ruperea membranelor hematiilor îmbătrânite. Hb eliberată în plasmă este fagocitată de macrofagele sistemului reticulo-endotelial, în special ale ficatului, splinei și ganglionilor limfatici.

Etapă următoare a catabolismului hemului are loc în ficat; deci bilirubina formată în alte țesuturi decât ficatul este transportată spre acesta. Datorită insolubilității ei, transportul prin sânge se face sub formă de complex solubil bilirubină-albumină serică, capacitatea de legare a bilirubinei neconjugate de către albumina serică este limitată. Dacă bilirubina produsă în alte țesuturi decât în ficat depășește capacitatea de transport de către sânge, ea difuzează în țesuturi. Deosebit de gravă este difuzia acestei forme de bilirubină liposolubilă în țesutul nervos central, unde se poate depune în nucleii de la baza creierului provocând icter nuclear care poate fi fatal sau poate cauza grave sechele neurologice. Bilirubina neconjugată nu apare în urină, fiind legată de albumina transportoare, nu poate trece filtrul renal.

Bilirubina este extrasă din sânge de către ficat, pătrunderea în hepatocite a bilirubinei se face în formă liberă, albumina transportoare rămânând în plasmă.

În vederea excreției biliare a bilirubinei, ea este trecută din nou într-o formă solubilă; de această dată are loc esterificarea unuia sau ambelor resturi propionil cu acidul glucuronic. Introducerea radicalilor glucuronil se face prin reacția bilirubinei cu UDP-glucuronatul

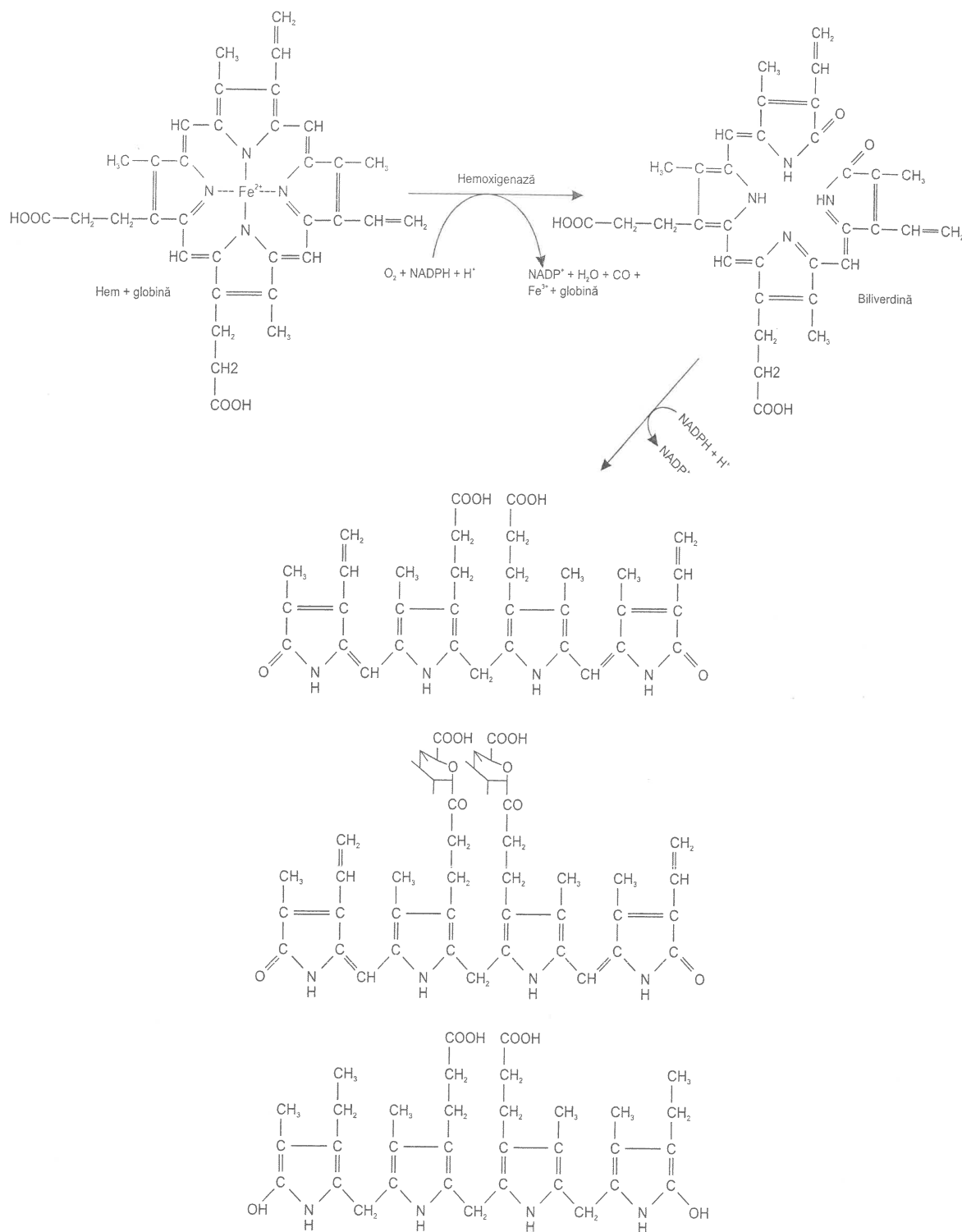


Figura 13.16 Etapele catabolismului hemului

catalizată de UDP-glucuronil-transferază, enzimă care face parte integrantă din membrana microzomială. Se obțin bilirubin-monoglucuronidul și bilirubin-diglucuronidul care împreună se numesc bilirubina conjugată.

În ficat forma principală a bilirubinei conjugate este de monoglucuronid. În prezent se știe că în ficat există mai multe glucuronil transferaze. Bilirubina conjugată este transportată în

canaliculele biliare. Capacitatea de transport este mică în raport cu cea de conjugare, astfel încât ea constituie un mecanism limitativ cu repercursiuni asupra întregului metabolism al bilirubinei. Spre deosebire de hepatocite, în bilă cea mai mare parte a bilirubinei este sub formă de diglucuronid.

Ultimele etape ale degradării hemului au loc în intestin unde bilirubina conjugată ajunge prin intermediul bilei. În ileonul terminal și în intestinul gros, resturile de acid glucuronic sunt îndepărtate, bilirubina liberă este supusă unor reacții de reducere succesive catalizate de reductaze produse de bacterii. Primul compus obținut prin reducere care, datorită lipsei conjugării, nu are culoare, este urobilinogenul (UBG).

Cea mai mare parte a urobilinogenului este reabsorbit din intestin; ajuns prin circulația portală la ficat este reexcretat prin bilă. O mică parte din urobilinogenul reabsorbit se elimină pe cale renală. Urobilinogenul se transformă în stercobilinogen, apoi în stercobilină, care dă culoarea fecalelor. Acești compuși împreună cu bilirubina se numesc *pigmenți biliari*.

Din punct de vedere clinic este deosebit de important raportul bilirubină neconjugată / bilirubină conjugată din plasmă (30/1). Concentrația celor două forme se stabilește pe baza reacției cu acidul diazobenzensulfonic (reacția Van den Berg); fracțiunea care formează imediat cu acest reactiv un compus de cuplare de culoare roșu-purpuriu se numește *bilirubină directă*, cea care reacționează numai după adaosul de metanol (sau acetona) se numește *indirectă*. Bilirubina directă corespunde formei conjugate, cea indirectă este forma neconjugată, legată de albumina serică. Cele două tipuri dau împreună bilirubina totală.

## 13.4 INCOMPATIBILITATEA DE RH ȘI DE GRUPĂ ABO

### 13.4.1 INCOMPATIBILITATEA DE RH

Din populația globului 85% sunt persoane Rh pozitive. La cei cu Rh negativ pot apare anticorpi care aglutinează hematiile în urma transfuziei de sânge Rh pozitiv sau datorită transfuziei feto-maternale în cazul în care mama este Rh negativă iar fătul Rh pozitiv.

În cadrul sistemului Rh, sunt 6 antigene: Cc, Dd și Ee, cel mai puternic este D, apoi C, E, c, e și d. Sensibilizarea apare în 95% dintre cazuri datorită incompatibilității D-d. Persoanele Rh pozitive pot fi homozigoți (DD) sau heterozigoți (Dd), cei Rh negativi au structura antigenică dd. Incompatibilitatea de Rh apare într-un procentaj diferit în funcție de formula antigenică a tatălui. Dacă tatăl este Rh pozitiv homozigot (DD) și mama Rh negativă (dd), toți copiii cuplului respectiv vor fi heterozigoți Rh pozitivi (Dd). Dacă tatăl este heterozigot Rh pozitiv (Dd) și mama Rh negativă, șansele copiilor de a fi Rh negativi (dd) sunt 50%.

### 13.4.2 MECANISM, IMPLICAȚII BIOCHIMICE ȘI HEMATOLOGICE

Prima etapă constituie pătrunderea antigenelor D din circulația fetală în cea maternă (faza placentară). În urma dezlipirii placentei hematiile fetale ajung în vasele sanguine uterine. Transfuzia feto-maternă poate avea loc prin avort spontan sau provocat sau chiar și în cursul amniocentezei dacă se lezează placenta. În frotiul periferic matern se poate vizualiza pre-

zența hematiilor conținând Hb F, care se colorează diferit de eritrocitele conținând Hb A (se utilizează colorația Kleihauer). La prima sarcină chiar dacă există incompatibilitatea de Rh fătul rămâne sănătos (dacă mama nu s-a sensibilizat în prealabil).

Anticorpii antiD sunt imunoglobuline (Ig) de două tipuri:

- în prima jumătate a sarcinii se formează Ig cu masă moleculară mare (IgM), care nu trec prin placentă;
- în a doua jumătate a sarcinii apar Ig cu masă moleculară mică (IgG), care pot trece bariera placentară și provoacă hemoliza hematiilor fetale.

Cantități mari de Ig provoacă hydrops fetal și placentar cu moarte intrauterină, cantități mai mici provoacă anemii. Creșterea consecutivă a nivelului eritropoietinei duce la intensificarea hematopoiezei extramedulare, apar mulți eritroblaști, ceea ce se poate vizualiza examinând frotiul periferic al nou născutului afectat (denumirea mai veche a acestei stări patologice a fost erythroblastosis fetalis). Din cauza intensificării hematopoiezei extramedulare apare hepatomegalia, ficatul își păstrează funcția hematogenă în detrimentul maturizării sale. Aproape în toate organele putem constata hematopoieză ectopică, în cazuri grave chiar și în placentă.

Cantitățile mari de hematii lizate duc la creșterea nivelului bilirubinei în sângele fetal. Datorită imaturității ficatului fetal, enzima glucuronil-transferază nu este activă, așadar bilirubina excretată prin bilă este sub formă neconjugată, și se reabsoarbe din intestin intrând într-un circuit enterohepatic. Cea mai mare parte a bilirubinei ajunge prin placentă în circulația maternă, iar o mică parte ajunge în lichidul amniotic împreună cu ceilalți pigmenti biliari. Concentrația pigmentilor biliari din lichidul amniotic este proporțională cu gradul hemolizei, așadar prin metode spectrofotometrice putem determina cantitatea bilirubinei și astfel se poate aprecia severitatea cazului, calculând diferența față de valorile normale.

Din cauza deficitului de maturare al ficatului va fi compromisă sinteza proteinelor (mai ales a globulinelor) din cadrul acestui organ, astfel scade nivelul proteinelor din sânge având drept consecință diminuarea presiunii coloid-osmotice, care menține lichidul în spațiul intravascular. Drept urmare va crește permeabilitatea vaselor cu formare de edeme: în cazuri mai ușoare edemele apar la nivelul membrelor inferioare, al organelor genitale, iar în cazuri mai grave toate organele vor fi afectate, vor fi acumulări de lichide și în cavități (ascită în abdomen și hydrotorax în cavitatea pleurală).

#### 13.4.3 IMPLICAȚII BIOMEDICALE

Simptomatologic, se vor observa abdomenul și toracele proeminent, edemul subcutanat, edemul facial, membrele lucioase, pielea tensionată. Placenta va fi friabilă, palidă, groasă. În condiții normale raportul de masă placentă/făt este 1/7; în funcție de severitatea cazului acest raport poate deveni 1/5 sau în caz extrem chiar 1/1.

Prevenție: Se recomandă testarea grupelor ABO și a factorului Rh la fiecare gravidă. Dacă mama are sânge de grupa O sau este Rh negativă, atunci se recoltează sânge și de la tată; dacă el este Rh pozitiv, avem incompatibilitate de Rh între soți care poate să aibă repercusiuni asupra fătului. Se urmărește titrul de anticorpi antiD, dacă anticorpii arată o creștere

sau o scădere bruscă, poate însemna iminența decesului fătului. Leziunile hemolitice rar sunt proporționale cu titrul de anticorpi. În literatura de specialitate s-a descris așa numita „reacție anamnestică”, adică în timpul unei noi sarcini titrul de anticorpi de la sarcina precedentă crește în ciuda faptului că fătul este Rh negativ. Investigația de laborator cea mai utilă este analiza lichidului amniotic.

**Anamneză:** Este important de știut dacă dintr-o sarcină precedentă s-a născut un copil afectat de incompatibilitatea de Rh, fiindcă la o sarcină ulterioară, dacă fătul este Rh pozitiv, leziuni de aceeași gravitate apar cu 2-3 săptămâni înainte față de perioada în care au apărut la prima sarcină.

**Investigații paraclinice:** La examenul ultrasonografic se vede hydropsul fetal și placentar (edemul extins): fătul este în poziția Buddha (membrele vor fi departe de corp datorită edemelor), apare o „aureolă” la nivelul capului (din cauza edemului pielii capului pielea se distanțează de craniu). Placenta edemațiată este groasă (peste 5-6 cm), se constată excesul lichidului amniotic (polyhydramnios) și diametrul abdominal va depăși cu mult pe cel parietal (normal raportul lor este 1:1).

În urina și sângele mamei crește nivelul hCG (hormon coriogonadotrop uman) datorită creșterii masei placentare.

Concentrația hemoglobinei (Hb) din sângele cordonului ombilical arată cel mai bine severitatea afecțiunii hemolitice, dar prelevarea probei necesită o tehnică specială de recoltare. *Tabelul 13.IV* arată protocolul de conduită în funcție de valorile Hb fetale.

Dacă incompatibilitatea de Rh coexistă cu incompatibilitatea ABO afectarea fătului va fi mai ușoară, fiindcă se vor sintetiza simultan două tipuri de anticorpi, astfel anticorpii antiD vor fi în cantități mai mici.

**Profilaxia bolii hemolitice la făt:** administrarea de Ig G antiD în primele 72 de ore după naștere inhibă izoimunizarea mamelor Rh negative și previne boala hemolitică la următorul făt Rh pozitiv.

Doza administrată este de 200 µg IgG antiD după naștere incompatibilă, 50 µg după avort dacă acesta s-a produs (sau a fost provocat) în primele 12 săptămâni de sarcină, dacă sarcina depășește 3 luni se recomandă doza obișnuită după naștere (200 µg).

### 13.4.3.1 Incompatibilitatea ABO

Antigenele A și B ajung din circulația fetală în sângele mamei, iar mama va secreta aglutinine antiA și/sau antiB care ajung în organismul fătului, dar nu provoacă afectări importante înainte de naștere. Sensibilizarea duce la icter hemolitic la nou născut.

**Tabelul 13.IV Valorile Hb fetale și conduita terapeutică în incompatibilitatea Rh**

Valorile Hb fetale	Gradul de severitate	Conduita terapeutică
Sub 8 g/dL	Afectare severă, iminență de deces al fătului	Inițierea nașterii sau efectuarea transfuziei intrauterine
Între 8-11 g/dL	Afectare de severitate moderată	Inițierea nașterii între săptămâna 35-37
Între 11-14 g/dL	Afectare de severitate mică	Naștere între săptămâna 37-39
Peste 14 g/dL	Nu este pericol pentru făt	Naștere la termen

În cazul incompatibilității ABO dintre mamă și tată, se recomandă urmărirea titrului de anticorpi antiA/antiB; vorbim despre sensibilizare dacă titrul depășește 1/256. Dacă apare un icter sever la nou născut, se poate efectua exsanguino-transfuzie.

### 13.5 PREZENTĂRI DE CAZ

#### 13.5.1 ANEMIE FERIPRIVĂ

Pacientă de 38 ani, acuză hipermenoree și menoragie de aproximativ 6 luni, fatigabilitate, irascibilitate, palpitații, căderea părului, unghii friabile.

**Examen obiectiv:** Tegumente și mucoase palide, piele uscată cu fisuri, ragade la comisurile labiale, koilonichie și striiațiuni ale unghiilor.

##### Analize de laborator:

- Fe seric: 35  $\mu\text{g/dL}$  [normal: 50-150  $\mu\text{g/dL}$ ]
- Hb: 10 g/dL [normal 12-16 g/dL]
- Transferina: 400  $\mu\text{g/dL}$  [normal 220-370  $\mu\text{g/dL}$ ]
- Saturația transferinei: 10% [normal 20-60 %]
- Feritina: 4  $\mu\text{g/l}$  [normal 13-150  $\mu\text{g/dL}$ ]
- Examinarea măduvei osoase: hemosiderină absentă.

**Interpretare:** Cea mai frecventă cauză a anemiei feriprive la femei este pierderea cronică a unor cantități însemnate de sânge la nivelul tractului genital. În anemiile feriprive sideremia este mică, valoarea transferinei din sânge este mare, și saturația transferinei este mică. Anemia feriprivă este singura anemie în care hemosiderina medulară este absentă. Apoferrina (ferrina fără fier) este o proteină care leagă fierul la nivelul depozitelor. Nivelul ferrinei serice indică starea depozitelor de fier, scăderea acestui parametru indică deficitul de fier înaintea apariției anemiei sau a altor modificări hematologice.

#### 13.5.2 LITIAZĂ BILIARĂ CU OBSTRUCȚIE TOTALĂ A CANALULUI COLEDOC

Pacient de sex feminin, 67 ani, pensionară.

**Istoricul bolii:** Pacienta acuză dureri colicative în hipocondrul drept cu iradiere în umărul drept apărute în urmă cu o zi, grețuri, vărsături, inapetență, prurit.

**Examen obiectiv:** Sclerotice și tegumente icterice, durere la palparea hipocondrului drept.

##### Analize de laborator:

- Fosfataza alcalină: 320 U/L [normal: 30-150 U/L]
- $\gamma$ -GT: 96 U/L [normal: 5-30 U/L]
- Bi directă (conjugată): 3,5 mg/dL [normal < 0,3 mg/dL]
- Bi totală: 4,1 mg/dL [normal < 1 mg/dL]
- Scaun hipocrom (decolorat)
- Analiza urinii:
  - Colorație: galben verzui
  - Glucoză: negativ

- Bilirubină: 20 mg/dL
- Corpi cetonici: negativ
- Densitate: 1,020 g/cm<sup>3</sup>
- Eritrocite: negativ
- pH: 7,0
- Proteine: negativ
- UBG (urobilinogen): negativ
- Nitrați: negativ
- Leucocite: negativ.

**Interpretare:** Pacienta prezintă icter datorită creșterii concentrației de bilirubină care a apărut în urma obstrucției coledociene. Calculii biliari pot provoca obstrucție parțială sau totală (în cazul nostru), care poate fi intermitentă, în timp ce cancerul de cap pancreatic cauzează de regulă obstrucție totală, apăsând duodenul din exterior. Enzimele fosfatază alcalină și  $\gamma$ -GT ( $\gamma$ -glutamil-transpeptidază) sunt localizate în epiteliul canaliculelor biliare, așadar în urma presiunii crescute cauzate de obstrucție ele difuzează în sânge. Bilirubina directă este mult crescută, aceasta reprezentând forma conjugată, care se găsește și în urina pacientei, fiind un compus hidrosolubil, dând colorația verzuie urinii. Datorită obstrucției complete a căilor biliare bilirubina conjugată nu ajunge în intestin, așadar nu are loc sinteza urobilinogenului, compus care va dispărea din urină.

### 13.5.3 ICTER NEONATAL - FORMĂ GRAVĂ

Nou-născut de 2 zile, s-a născut prematur la 30 săptămâni cu masa corporală de 1700 g prin operație cezariană. Scor APGAR 6 la 1 minut, 7 la 5 minute. Din prima zi de naștere pacientul prezintă icter foarte accentuat.

**Examen obiectiv:** Tegumente și mucoase intens icterice, agitație, convulsii, respirație paradoxală cu perioade de apnee.

#### **Analize de laborator:**

- Bi directă: 0,1 mg/dL [normal < 0,3 mg/dL]
- Bi totală: 23 mg/dL [normal < 1 mg/dL]
- GPT: 10 UI/L [normal < 13 UI/L la copii sub 5 ani]
- GOT: 36 UI/L [normal < 40 UI/L la sugari sub 3 luni]

**Interpretare:** Icterul neonatal la prematuri poate fi foarte precoce și intens datorită imaturității ficatului. Enzima UDP-glucuronil-transferază, necesară conjugării cu resturi de acid glucuronic, nefiind încă activă, crește în ser concentrația bilirubinei neconjugate. Datorită hidrofobității acestui compus, are afinitate mare pentru structurile lipidice și se poate depune la nivelul creierului în special în nucleii bazali (caudat și lenticular), provocând icter nuclear cu manifestări neurologice grave și sechele de durată (retard mental, tulburări comportamentale). Pentru a preveni aceste consecințe severe, se recomandă administrarea de fenobarbital ca inductor enzimatic (stimulează sinteza enzimei care catalizează glucuronoconjugarea) și fototerapia (facilitează descompunerea și eliminarea bilirubinei neconjugate din organism).

#### 13.5.4 PORFIRIE INTERMITENTĂ ACUTĂ

Pacientă de sex feminin, 19 ani, studentă, în urma utilizării de anticoncepționale (terapie cu debut de 4 zile) și alcool etilic în cantități moderate în seara precedentă, pacienta prezintă crampe abdominale, dureri la nivelul membrelor superioare urmată de dificultăți motorii la extremități, vărsături repetate.

**Examen obiectiv:** Tegumente și mucoase normal colorate, sensibilitate dureroasă difuză la nivel abdominal, tahicardie, urină colorată normal după emisie, dar care se închide la culoare treptat căpătând o tentă purpurie în urma expunerii la aer.

**Analize de laborator:** Creșterea concentrației urinare de  $\delta$ -ALA (acid delta-amino-levulinic) și PBG (porfobilinogen).

**Interpretare:** Boala se datorează deficitului de hidroximetilbilan sintetază. Afecțiunea poate rămâne latentă până la intervenția unor factori care accentuează calea de sinteză a hemului. În urma intensificării acestei căi metabolice se acumulează intermediarii care preced deficitul enzimatic ( $\delta$ -ALA și PBG), compuși care se elimină prin urină și prin oxidare conferă urinei o tentă roșiatică, iar la nivelul sistemului nervos blochează  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-aza}$ . Tulburările la nivelul sistemului nervos periferic pot provoca pareze și paralizii, perturbarea inervației vegetative poate induce peristaltism necontrolat provocând vărsături. În urma asemănării structurale dintre neurotransmițătorul inhibitor GABA (acid gama-amino-butaric) și  $\delta$ -ALA (diferă doar printr-o grupare cetonă) pot apărea tulburări neuropsihice (halucinații, depresie, psihoze).

#### 13.5.4 HEMOCROMATOZĂ PRIMARĂ

Pacient de sex masculin, 45 ani, muncitor, s-a prezentat la medic din cauza unor dureri la nivelul articulației genunchiului stâng apărută în urmă cu câteva zile. În urmă cu trei luni, când pacientul a observat colorația mai intensă a tegumentelor în special la nivelul feței și a gâtului și scădere în greutate.

**Examen obiectiv:** Tegumente și mucoase intens colorate (nuanță gri-maronie cu tentă ușor icterică), eritem palmar, ginecomastie bilaterală, sensibilitate dureroasă la nivelul genunchiului stâng, hepatomegalie.

**Analize de laborator:**

- Fe seric: 380  $\mu\text{g/dL}$  [normal: 80-160  $\mu\text{g/dL}$ ]
- Feritină: 465  $\mu\text{g/L}$  [normal: 20-250  $\mu\text{g/L}$ ]
- Saturația transferinei: 95% [normal: 20-60 %]
- Bi directă (conjugată): 1,5  $\text{mg/dL}$  [normal < 0,3  $\text{mg/dL}$ ]
- Bi totală: 3,8  $\text{mg/dL}$  [normal < 1  $\text{mg/dL}$ ]
- GPT: 56  $\text{UI/L}$  [normal: 2-20  $\text{UI/L}$ ]
- GOT: 84  $\text{UI/L}$  [normal: 2-20  $\text{UI/L}$ ]
- Glicemie: 165  $\text{mg/dL}$  [normal: 70-99  $\text{mg/dL}$ ].

**Interpretare:** În urma creșterii absorbției intestinale a fierului se depun cantități excesive de metal în diverse organe (ficat, pancreas, miocard, hipofiză, etc.). Diagnosticul se poate

pune pe baza simptomatologiei (hiperpigmentarea pielii, fenomene de artrită, hepatomegalie cu icter, ginecomastie) și a analizelor de laborator (sideremia, nivelul feritinei și saturația transferinei sunt crescute, activitatea transaminazelor este moderat crescută și bilirubinemia ridicată datorită afectării hepatice cu evoluție spre ciroză, iar glicemia este crescută datorită diabetului zaharat secundar leziunilor pancreatice). Datorită manifestărilor cutanate și pancreatice boala se mai numește diabet bronzat.

### Listă de abrevieri

ALA - acid  $\delta$ -amino levulinic  
 ALAD - acid  $\delta$ -amino levulinic dehidratază  
 Bi - bilirubină  
 Cit - citocrom  
 2,3-DPG - 2,3-difosfoglicerat  
 EDTA - etilendiaminotetraacetat  
 ELISA - enzyme-linked immuno assay  
 FeOOH - oxihidroxid feric  
 Glu - acid glutamic  
 Gln - glutamină  
 GOT - glutamic-oxalacetic transaminaza  
 GPT - glutamic-piruvic transaminaza  
 Hb - hemoglobină  
 HbA1c - hemoglobină glicozilată  
 hCG - hormon coriogonadotrop uman  
 His - histidină  
 HPLC - cromatografia lichidă de înaltă presiune  
 Ig - imunoglobulină  
 K - constanta de echilibru  
 Lys - lizină  
 Mb - mioglobină  
 MCH - media hemoglobinei corpusculare  
 MCV - volumul mediu eritocitar  
 MF - macrofage  
 MGG - May-Grünwald-Giemsa  
 PBG - porfobilinogen  
 $pCO_2$  - presiunea parțială a dioxidului de carbon  
 Phe - fenilalanină  
 $pO_2$  - presiunea parțială a oxigenului  
 SBG - stercobilinogen  
 Ser - serină

TIBC - capacitatea totală de legare a fierului

UBG - urobilinogen

UDP - uridin difosfat

Y - fracția de oxigenare

Val - valină

## Bibliografie recomandată

1. Ádám Veronika, *Orvosi Biokémia*: Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2002.
2. Ahluwalia, N., Lammi Keefe C.J., Bendel R.B., et al.: Iron deficiency and anemia of chronic disease in elderly women: a discriminant-analysis approach for differentiation, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, vol. **61**, nr. 3, p. 590-596.
3. András Ibolya, Nemes-Nagy Enikő, Fazakas Zita, sub redacția Ștefan Hobai: *Biochimie Medicală*, Ed. Veritas, Târgu Mureș, 2005.
4. Bergman JP, Kemna EH, Janssen MC, et al: Hereditary Haemochromatosis: novel genes, novel diseases and hepcidin, *Ned Tijdschr Geneesk.*, 2007, vol. 151, nr. 20, p. 1121-7.
5. Bishop M., Fody E., Schoeff L.: *Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations*, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 2005.
6. Brittenham G.M.: *New advances in iron metabolism, iron deficiency and iron overload*. *Current Opinion in Hematology*, 1994, 1:101-106.
7. Burtis C., Ashwood E., Bruns D.: *Tietz textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Ed. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, 2006.
8. Cook J.D. et al: *Serum transferrin receptor*. *Ann Rev Med*, 1993, 44: 63-74.
9. Dinu Veronica, Truția Eugen, Popa-Cristea Elena, Popescu Aurora: *Biochimie Medicală – Mic tratat*, Ed. Medicală, București, 2000.
10. Eun J.L. et al: *Soluble Transferrin Receptor (sTfR), Ferritin, and sTfR/Log Ferritin Index in Anemic Patients with Nonhematologic Malignancy and Chronic Inflammation*, *Clinical Chemistry*, 2002, 48: 1118-1121.
11. Fazakas Zita: *Biokémia*, Ed. University Press, Târgu-Mureș, 2007.
12. Fonyó Attila: *Az orvosi élettan tankönyve*, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1999.
13. Hobai Ștefan: *Curs de Biochimie*, volum I, Litografia UMF Târgu Mureș, 2006.
14. Juhász Péter, Dux László: *Klinikai laboratóriumi diagnosztika*, Springer Tudományos Kiadó, Budapest, 2000.
15. Lampé László: *Szülészeti, nőgyógyászati (Obstetrică, Ginecologie)*, Ed. Medicina, Budapest, 1987.
16. Mihele Denisa: *Biochimie clinică*, Editura Medicală, București, 2001.
17. Nemes-Nagy Enikő, Fazakas Zita, Mareș-Ferencz Gizella: *Általános és alkalmazott biokémia, szülészeti és neonatológiai vonatkozásokkal*, Ed. Studium, Târgu Mureș, 2009.
18. Sabău A, Văleanu M, Boloșiu HD, Crăciun A. Evaluation of serum hepcidin variation in patients with rheumatoid arthritis according to anemia profile and its correlation with disease activity. *Rev Romana Med Lab*. 2013;21(1):17-27. DOI:10.2478/rrlm-2013-0014



# 14

## Biochimia sindroamelor anemice

Gabriela Bordeianu, Daniela Cristina Dimitriu

### Definiția anemiei

Sindromul anemic se definește ca scăderea valorilor hemoglobinei, hematocritului sau a numărului de hematii sub valorile de referință în stabilirea cărora se ține cont de sexul și vârsta pacientului dar și de alți factori cum ar fi altitudinea, sarcina, statusul de fumător. În aprecierea anemiei este necesară efectuarea hemogramei, o valoare a hemoglobinei de 14 g/dl la bărbați și 12 g/dl la femei este considerată limita normală inferioară. Indiferent de cauza acesteia, simptomatologia este similară, reflectând un status cu o oxigenare precară a țesuturilor. Chiar dacă nu sunt întotdeauna foarte evidente sau supărătoare (cel puțin în fazele incipiente), oboseala, migrenele și astenia sunt cele mai frecvente simptome în anemii.

### Clasificarea anemiilor

Există mai multe criterii de clasificare a anemiilor. Dacă se ia în considerare cantitatea de hemoglobină, anemiile se clasifică în ușoare ( $Hb=10-12g/dl$ ), moderate ( $Hb=7-10g/dl$ ) sau severe ( $Hb < 7g/dl$ ). O altă clasificare se realizează prin calculul indicilor eritrocitari (volumul eritocitar mediu-VEM, concentrația medie a hemoglobinei din eritrocite-CHEM, hemoglobina eritocitară medie-HEM, variația dimensiunilor eritrocitelor-RDW). Formulele de calcul ale indicilor eritrocitari sunt redată în tabelul 14.I împreună cu valorile normale.

**Tabel 14.I Formule de calcul ale indicilor eritrocitari**

Indice eritocitar	Formula de calcul	Valoare normală
VEM	$(Ht (\%) / \text{număr hematii } (X10^6/\mu l)) \times 10$	80-94 fl
HEM	$(Hb(g/dl) / \text{număr hematii } (X10^6/\mu l)) \times 10$	25-33 pg/hematie
CHEM	$(Hb (g/dl) / Ht(\%)) \times 100$	32-36 g/dl

Hemoleucograma completă coroborată cu datele examenului morfologic sunt criterii esențiale în diferențierea anemiile (microcitare, normocitare și macrocitare, după VEM și hipocrome, normocrome și hiperchrome având în vedere concentrația medie de hemoglobină). O listă a acestor anemii împreună cu eventuale cauze ce le generează sunt prezentate în tabelul 14.II.

**Tabel 14.II Clasificarea anemiilor după aspectul morfologic și indicii eritrocitari (VEM, CHEM)**

VEM	CHEM	Cauze posibile
Normocitară 80-93 fl	Normocromă 32-36 g/dl	Insuficiență renală cronică, leucemii, hemoliză, sângerare acută
Macrocitară >94 fl	Normocromă 32-36 g/dl	Anemii megaloblastice, anemii macrocitare (mielodisplazii, mixedem, afectări hepatice)
Microcitară <80 fl	Hipocromă < 30 g/dl	Anemie feriprivă, inflamații și infecții cronice, neoplasme, talasemii, anemii sideroblastice

Clasificarea după cinetica producției și distrucției hematiilor este cea mai utilizată în practica clinică: scăderea sintezei se poate datora unor deficite nutriționale (de fier, vitamina B12, acid folic), afecțiuni moștenite (anemiile hemolitice prin defecte structurale ale peretelui membranei hematiei sau diverse deficite enzimaticе) sau dobândite (boli cronice, autoimune, intoxicații, etc)

După numărul de reticulocite, anemiile se clasifică fiziopatologic în: hipoproliferative, normoproliferative și hiperproliferative. Valoarea normală a numărului de reticulocite este 25.000-75.000/mm<sup>3</sup>. În aprecierea numărului de reticulocite se face o corecție în funcție de timpul de maturare care ține cont de gravitatea anemiei; în cazuri severe reticulocitele sunt eliberate mai rapid din periferie și necesită un timp mai lung de maturare. În acest caz formula de corecție este:

$$\text{Nr. reticulocite corectat} = \text{Nr. reticulocite} / \text{timp de maturare},$$

Timpul de maturare în funcție de hematocrit este:

- 1 zi la Ht = 45%,
- 1,5 zile la Ht = 35%,
- 2,0 zile la Ht = 25%
- 2,5 zile la Ht=15%.

O anemie hiperproliferativă (număr mai scăzut de reticulocite față de normal) ar putea sugera anumite afecțiuni cum ar fi o hemoragie acută, anemie hemolitică dar și o anemie cu deficite nutriționale și care răspunde la tratament. Un număr scăzut de reticulocite ar putea să însoțească o anemie dintr-o aplazie sau hipoplazie medulară precum și o infiltrație medulară masivă.

### 14.1 ANEMIA FERIPRIVĂ

Este o anemie microcitară, hipocromă ce apare ca urmare a unui dezechilibru în ceea ce privește aportul, pierderile precum și situațiile în care nevoile de fier sunt crescute. Metabolismul fierului este descris detaliat în capitolul 13.2.

Din punct de vedere clinic și al investigațiilor de laborator există câteva stadii ale deficitului progresiv de fier până la apariția sindromului anemic.

- rezerve de fier scăzute (cu fier seric normal, hemoglobină normală, feritină scăzută).
- creșterea capacității transferinei de a lega fier cu scăderea sideremiei.

- scăderea VEM și HEM.
- aspect caracteristic al frotiului cu microcitoză și hipocromie.
- scăderea hemoglobinei cu instalarea sindromului anemic.
- apariția modificărilor clinice caracteristice anemiei feriprive (paloare, modificări trofice ale fanerelor și mucoaselor)

În cazul diagnosticării unei anemii prin carență de fier trebuie elucidată cauza astfel încât tratamentul să vizeze atât etiologia anemiei cât și suplimentarea deficitului de fier.

## 14.2 ANEMII MEGALOBLASTICE

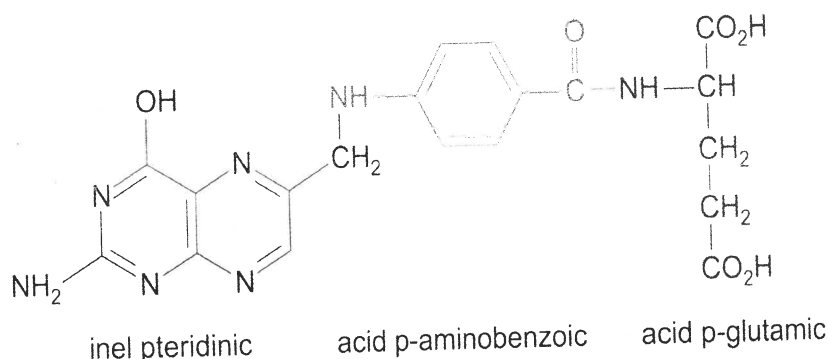
Anemiile megaloblastice apar în contextul scăderii sintezei de acizi nucleici ce antrenează tulburări ale diviziunii celulare cel mai adesea datorită deficitului de vitamină B12 sau acid folic (cauze frecvente ale acestor deficite sunt redate în tabelul 14.III).

**Tabel 14.III Principalele cauze ale anemiilor megaloblastice**

Deficiență de acid folic	Deficiența de vitamină B12
Cauze înnăscute	
- malabsorbție congenitală a folatului	- boala Imerslund-Grasbeck
- deficit de dihidrofolat reductază	- deficiența congenitală a factorului intrinsec
- deficit de metilen tetrahidrofolat reductază	- deficiență de metionin sintetază
Cauze dobândite	
Dietă inadecvată	Dietă inadecvată (rare)
- alcoolism	- regim vegetarian
- lipsa vegetalelor din alimentație	- sugari alăptați de mame vegetariene
- vârstnici	Malabsorbție
- hemodializa	- gastrectomie (pierdere FI și acid gastric)
Malabsorbție	- anemie pernicioasă
- boala celiacă	- rezecții ale ileonului
- sprue tropical	- boli inflamatorii ale intestinului subțire
- rezecție extinsă a intestinului subțire	- parazitoze ( <i>Diphyllobothrium latum</i> )
- enterită	Alte cauze (rare)
Medicamente	- deficiență congenitală de transcobalamină
- inhibitori ai dihidrofolat reductazei	- anemia megaloblastică cu răspuns la tiamină
- anticonvulsivante	
Cauze rare	
- nevoi crescute: sarcina, psoriazis	
- expunere la oxid nitric	

### 14.2.1 METABOLISMUL FOLAȚILOR ȘI AL VITAMINEI B12

Folații reprezintă grupul de compuși ce sunt alcătuiți din acid folic și derivați ai acestora. Acidul folic (acidul pteroil glutamic) este alcătuit dintr-un inel pteridinic de care se leagă acidul p-aminobenzoic și acidul glutamic (figura 14.1). În natură acidul folic se prezintă sub formă redusă în pozițiile 5, 6, 7 și 8 și de complexe la care sunt legate numeroase resturi de acid glutamic.



**Figura 14.1 Structura acidului folic**

Organismul este incapabil de a sintetiza folații, aceștia provenind integral din aport exogen, cele mai bogate surse de folat sunt legumele verzi dar și alimente de origine animală, cum ar fi ficatul sau rinichii.

Absorbția folatului are loc la nivelul jejunului proximal și s-a demonstrat la nivelul marginii în perie a enterocitelor existența unor endopeptidaze ce îndepărtează câte un rest de acid glutamic astfel că în plasmă acesta se regăsește sub formă de monoglutamat.

Din plasmă acidul folic intră în celule sub formă de metil tetrahidrofolat (CH<sub>3</sub>-FH<sub>4</sub>) iar la nivel citoplasmatic are loc transferul gupării metil pe homocisteina rezultând astfel metionina și tetrahidrofolatul (FH<sub>4</sub>) într-o reacție catalizată de **metionin-sintetaza**. FH<sub>4</sub> în forma poli-glutamată este convertit la 5, 10 metilen FH<sub>4</sub> (5, 10- CH<sub>2</sub>- FH<sub>4</sub>) de către **serin-hidroximetil transferaza**. 5, 10- CH<sub>2</sub>- FH<sub>4</sub> va ceda gruparea CH<sub>2</sub>- reacției de transformare a dUMP în dTMP, catalizată de **timidilat sintetaza**. În cursul acestei reacții are loc o reducere parțială a FH<sub>4</sub> în FH<sub>2</sub>, ce suferă o retransformare în FH<sub>4</sub> într-o reacție catalizată de **dihidrofolat reductaza** (figura 14.2).

Metabolismul folatului este dependent de nivelul de vitamina B<sub>12</sub>, de aceea deficitul acestei vitamine determină modificări hematologice comune cu deficitul acidului folic.

**Vitamina B<sub>12</sub>** (ciancobalamina) este un derivat cian al cobalaminei și are în structură un nucleu tetrapirolic la care se atașează un atom de cobalt și formează o porțiune corinică. La acesta se leagă o structură nucleotidică atât prin radicalul propionil al pirolului cât și printr-o legătură coordinativă la cobalt. În vitamina B<sub>12</sub>, de atomul de cobalt se leagă de asemenea gruparea cian (figura 14.3). Absorbția vitaminei B<sub>12</sub> este dependentă de prezența factorului intrinsec, glicoproteină secretată de celulele parietale gastrice, și are loc la nivelul ileonului sub formă de complex FI (factor intrinsec) - B<sub>12</sub>. La nivelul enterocitului vitamina B<sub>12</sub> se leagă de transcobalamina II, proteină ce o va transporta la receptori celulari. Vitamina B<sub>12</sub> participă la nivel celular la reacția catalizată de metionin sintetază din care se formează FH<sub>4</sub> și metionina. Lipsa vitaminei B<sub>12</sub> explică astfel reducerea nivelului de 5, 10 - CH<sub>2</sub>- FH<sub>4</sub> și respectiv a dTMP. De asemenea, în condițiile prezenței vitaminei B<sub>12</sub> reacția de formare a metil-FH<sub>4</sub> din 5, 10-metilenTHF este inhibată de S-adenozil metionină (SAM); în condițiile deficienței vitaminei B<sub>12</sub> această inhibiție este îndepărtată prin lipsa SAM, explicând astfel reducerea dTMP cu acumularea în exces de dUMP (figura 14.2).

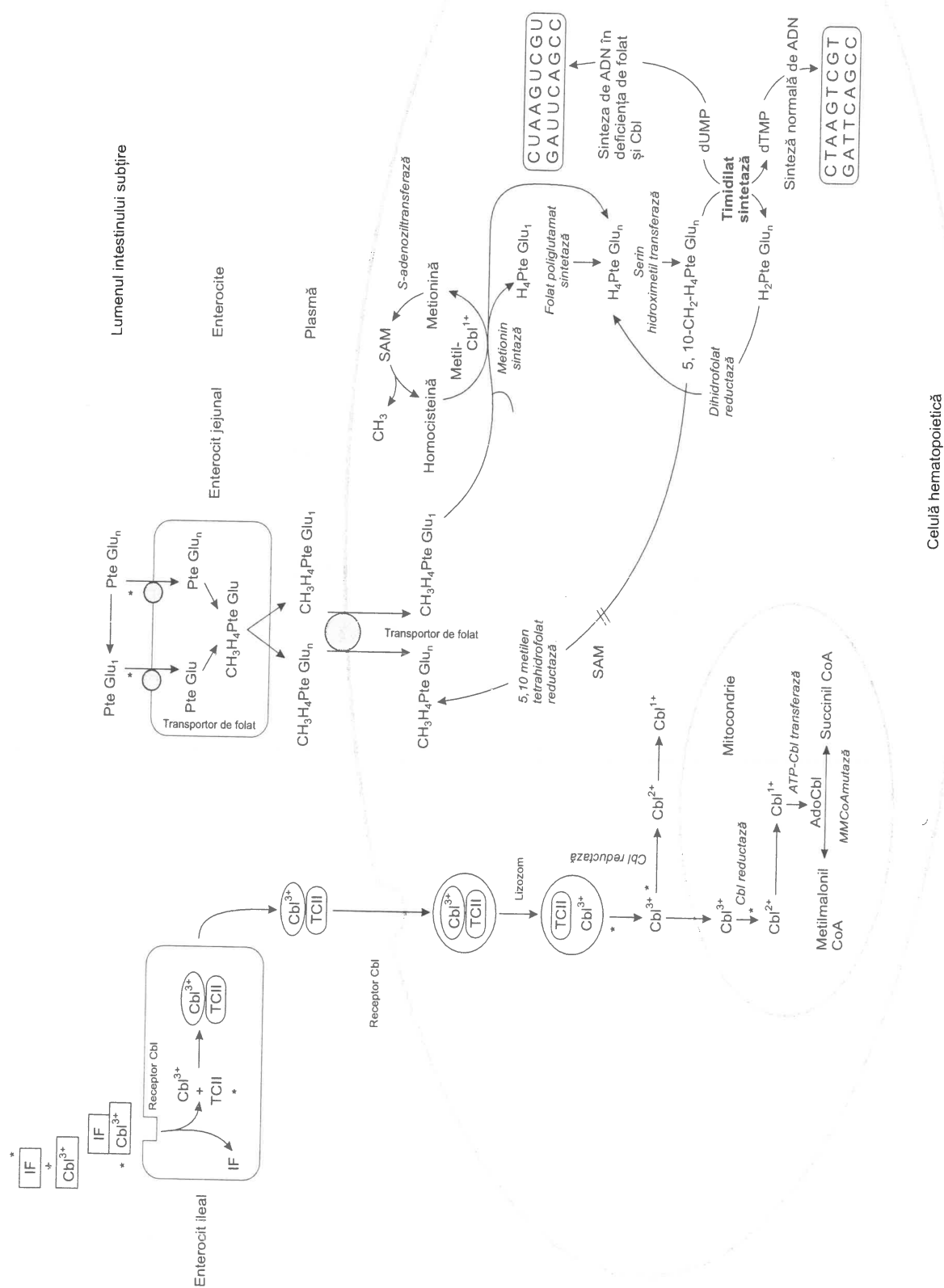
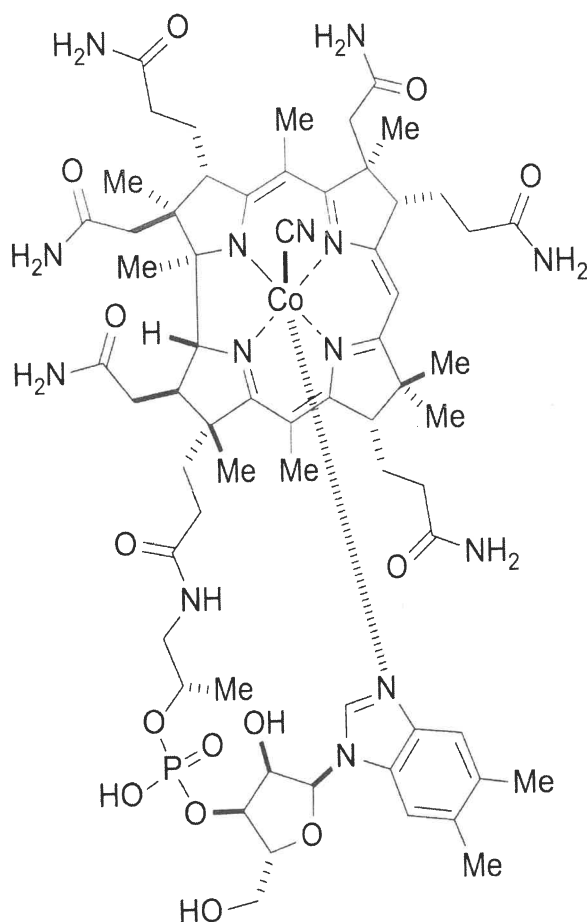


Figura 14.2 Metabolismul acidului folic și al vitaminei B12



**Figura 14.3 Structura vitaminei B12 (ciancobalaminei)**

În condițiile depleției de vitamină B12 și acid folic sinteza de dTMP este redusă iar dUMP în exces este încorporat în ADN. În situații normale există o enzimă ce aparține aparatului de translație, uracil-glicozidază, ce îndepărtează dU încorporate ocazional la nivelul ADN-ului. Un mecanism fiziopatologic posibil în anemia megaloblastică ar fi dat de lezarea cromatinei de către uracil glicozidaza; numeroasele leziuni ale catenelor ADN determinate de uracil glicozidază se pare că depășesc capacitatea unor proteine de reparare ale leziunilor ADN, cauzând astfel moartea celulară.

#### 14.2.2 DIAGNOSTICUL ANEMIEI MEGALOBLASTICE

Diagnosticul de anemie megaloblastică este stabilit coroborând date clinice și de laborator. Scăderea hemoglobinei și macrocitoza, obiectivate printr-o hemogramă cu aprecierea volumului eritrocitar mediu precum și prin aspectul morfologic al hematiilor pe frotiul de sânge periferic sau capilar, sunt primele investigații ce sugerează acest tip de anemie. Abordarea pacientului în acest caz trebuie să fie sistematică și constă în anamneza detaliată și în efectuarea unor teste biochimice, hematologice și imunologice (Tabel 14.IV) ce vizează pe de o parte să identifice anemia megaloblastică și pe altă parte să aducă date asupra cauzei ce a dus la apariția acestui sindrom anemic. Etiologia anemiei megaloblastice având implicații terapeutice importante.

**Tabel 14.IV Teste de laborator utile în anemia megaloblastică**

Biochimice și imunologice	Hematologice
LDH crescut	Hemoglobină scăzută
Bilirubina totală și bilirubina neconjugată crescute	VEM crescut (frecvent >120fl)
Fier normal sau crescut	Ovalocitoza
Vitamina B12 scăzută <100pg/ml ‡	Leucopenie, trombopenie
Acid folic scăzut <3ng/ml ‡	Neutrofile hipersegmentate
Homocisteina ‡	Măduva osoasă: megaloblastoză, metamielocite de dimensiuni mari.
Acid metilmalonic ‡	
Anticorpi anti F.I.‡	

‡ diferențierea între anemia megaloblastică prin deficit de acid folic sau vitamina B12 (deficit de cobalamina: vit. B12 <100pg/ml, acid folic normal sau crescut, acid metilmalonic crescut, homocisteina crescută; deficitul de folați: acid folic <3ng/ml, vit. B12 normal, acid metilmalonic normal, homocisteina moderat crescută)

### 14.3 ANEMII PRIN DEFECT DE MEMBRANĂ

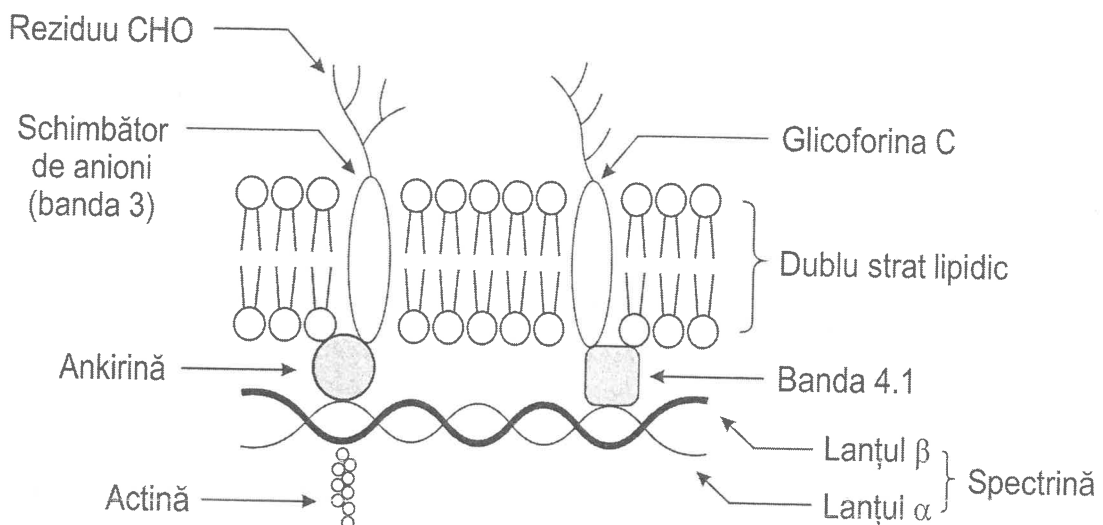
Defectele membranei hematiei pot determina anemii hemolitice de severitate variabilă. Dintre acestea cele mai importante sunt: *sferocitoza ereditară*, *eliptocitoza ereditară* și *piropoikilocitoza ereditară*.

#### 14.3.1 STRUCTURA CHIMICĂ A MEMBRANEI HEMATIEI

Membrana hematiei este compusă dintr-un dublu strat lipidic alcătuit din fosfolipide și colesterol străbătut de proteine precum și dintr-un schelet ce asigură integritatea celulei și care este dispus pe partea internă a membranei hematiei (figura 14.4).

##### 14.3.1.1 Lipidele membranare

Membrana hematiei este constituită din lipide în proporție de 50-60%. Principalele lipide sunt fosfolipidele (fosfatidil-etanol-amina, sfingomielină, fosfatidil-serina, fosfatidil-inozitol)

**Figura 14.4 Structura schematică a membranei hematiei**

și colesterolul. În componența membranei eritrocitare există și cantități mici de glicolipide, cea mai mare parte sub formă de globozidă.

În eritrocitele mature fosfoinozitolii pot fi fosforilați și defosforilați rapid fiind implicați în reglarea transportului calciului și în interacțiunea proteinelor transmembranare și cele de schelet (glicoforina C și proteina 4.1).

#### 14.3.1.2 Proteine membranare

Pe baza proprietăților electroforetice în gel de sodium-dodecil-sulfat s-au pus în evidență proteine transmembranare dintre care cele mai importante fiind proteina banda 3 și glicoforina. Glicoproteina transmembranară, Banda 3, servește ca regulator al conținutului ionic și conține locusuri de interacțiune cu alte proteine membranare; are rol în atașarea scheletului membranal de membrana plasmatică și în determinarea flexibilității și rigidității eritrocitare. Glicoforinele sunt cele mai abundente glicoproteine în membrana eritrocitară oferind 60% din încărcătura negativă a suprafeței hematiilor. Prin complexe care le realizează cu proteinele de schelet, au rol în stabilitatea, deformabilitatea și forma membranei celulare.

Proteinele scheletului membranei eritrocitare

Principalele proteine ale citoscheletului sunt reprezentate de spectrină, ankirină, actină, proteinele 4.1, 4.2, 4.9, p55 și aducine. Aceste proteine formează o rețea ce se atașează de fața internă membranală prin legarea în mare parte de banda 3 și glicoforine.

**Spectrina** este cea mai abundentă proteină din scheletul membranei eritrocitare și este compusă din două subunități,  $\alpha$  și  $\beta$ , ce sunt distincte structural și codificate de gene separate. Heterodimeri  $\alpha/\beta$  se asociază în tetrameri de spectrină ce realizează legături cu proteinele transmembranare dar și cu proteine de citoschelet (actina, proteina 4.1 și ankirina) fiind astfel suport pentru membrana lipidică și menținerea formei celulei.

**Ankirina** este o proteină de citoschelet și participă la legătura dintre spectrină și proteina bandă 3.

**Proteina 4.1** are ca rol legarea complexului spectrină-actină de membrana lipidică iar **Proteina 4.2** se leaga de numeroase proteine cum ar fi banda 3, proteina 4.1, ankirina și complexe ankirină-proteină banda 3. Funcția principală a proteinei 4.2 este să stabilizeze asocierea spectrină-actină-ankirină cu banda 3. Alte proteine care contribuie la stabilitatea peretelui hematiei sunt actina, aducina, proteina p55.

#### 14.3.2 SFEROCITOZA

Sferocitoza ereditară este o anemie hemolitică înăscută ce se transmite în cele mai multe cazuri într-o manieră autosomal dominantă. Cauza fiziopatologică a acestei afecțiuni este o asociere deficitară între membrana fosfolipidică și structura citoscheletului, în consecință pierderea structurilor fosfolipidice din membrana celulară. Suprafața hematiei scade și acestea iau formă sferică. Hematiile sferice sunt mai puțin flexibile decât hematiile normale, au o durată mai scurtă în circulație și vor fi în final distruse în splină. Majoritatea cazurilor de sferocitoză ereditară sunt datorate mutațiilor în gena ankirinei dar există și cazuri cu anomalii ale genelor spectrinei  $\beta$ , spectrinei  $\alpha$ , proteinei banda 3 și proteinei 4.2.

### ***Diagnosticul de laborator al sferocitozei ereditare***

#### **Criterii:**

- Volum eritocitar mediu (VEM) ușor scăzut sau normal cu o creștere a concentrației medii a hemoglobinei eritrocitare (CHEM).
- Frotiu de sânge periferic - se observă microsferocite.
- Numărul de reticulocite este crescut (cca. 5-20%).
- Testul Coombs negativ exclude o anemie hemolitică imună.
- Fragilitate osmotică crescută (și în alte tipuri de sferocitoză este crescută).

#### ***14.3.3 ELIPTOCITOZA EREDITARĂ***

Este o anemie hemolitică transmisă autosomal dominant și se datorează pierderii stabilității citoscheletului prin mutații ale spectrinei  $\alpha$  și defecte ale formării tetramerilor spectrinei  $\alpha/\beta$ . Alte defecte înregistrate privesc proteina 4.1 și glicoforina. Aceste defecte determină deformarea și rigiditatea citoscheletului, hematii luând formă eliptică la trecerea prin capilare.

### ***Diagnosticul de laborator al eliptocitozei ereditare***

#### **Criterii:**

- Examinarea frotiului de sânge periferic arată prezența eliptocitelor în proporție de peste 15%.
- Anemia este normocromă atât în formele hetero- cât și homozigote.
- Fragilitatea osmotică este în general normală.

#### ***14.3.4 PIROPOIKILOCITOZA EREDITARĂ***

Este o anemie hemolitică cronică severă și se transmite în manieră autosomal recesivă. Implică pe de o parte scăderea cantității de spectrină pe de alta parte un defect în asamblarea tetramerilor de spectrină  $\alpha/\beta$  cât și a asocierilor dintre spectrină și celelalte proteine structurale.

### ***Diagnosticul de laborator al piropoikilocitozei ereditare:***

#### **Criterii:**

- sindrom anemic sever.
- frotiul de sânge periferic arată poikilocitoză marcată, microcitoză și prezența de schizocite.
- poikilocitoza se accentuează la încălzirea sângelui in vitro; scăderea stabilității termice se datorează denaturării spectrinelor la pacienții cu piropoikilocitoză la o temperatură de cca. 45°C spre deosebire de cele normale ce sunt denaturabile la cca 49°C.
- rezistență osmotică scăzută.

## **14.4 ANEMII HEMOLITICE PRIN DEFICITE ENZIMATICE**

Eritroenzimopatiile sunt afecțiuni ereditare caracterizate prin anemii hemolitice cu evoluție acută sau cronică. Cu implicare majoră sunt enzimele cu rol în metabolizarea glucozei;

dintre acestea cel mai frecvent incriminate sunt **glucoză-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-P DH)** și **piruvat-kinaza (PK)**. Deficite ale acestor enzime se însoțesc de hemoliză, deoarece la hematia adultă metabolizarea glucozei oferă potențialul energetic și reducător necesar pentru integritatea structurală a eritrocitului.

#### 14.4.1 DEFICITUL DE GLUCOZĂ-6-FOSFAT DEHIDROGENAZĂ

Deficitul de G-6-P DH este cea mai comună deficiență enzimatică moștenită ce se transmite recesiv X-linkat și se însoțește cel mai frecvent de episoade hemolitice ce sunt declanșate de administrarea unor substanțe chimice și medicamente cu potențial oxidant sau în cursul unor infecții virale sau bacteriene.

Glucoză-6-fosfat dehidrogenaza intervine în secvența de reacții a șuntului pentozo- fosfaților ce este împărțită în două faze: o fază oxidativă ireversibilă și o fază nonoxidativă reversibilă. În prima fază, glucozo-6-fosfatul suferă un proces de dehidrogenare și decarboxilare rezultând o pentoză, ribuloză-5-fosfat, utilizată în biosinteza nucleotidelor și acizilor nucleici. În a doua fază, ribuloză-5-fosfat este reconvertită la G-6-P printr-o serie de reacții în care sunt implicate enzimele transketolaza și transaldolaza. Glucoză-6-fosfat dehidrogenaza intervine în prima fază a șuntului pentozofosfaților și catalizează reacția de dehidrogenare a glucoză-6-fosfatului la 6-fosfogluconat via 6-fosfogluconolactonă. După reacția catalizată de G-6-P dehidrogenază urmează oxidarea decarboxilantă a 6-fosfogluconatului la ribuloză-5-fosfat într-o reacție catalizată de 6-fosfogluconat dehidrogenaza NADP dependent (fig.14.5)

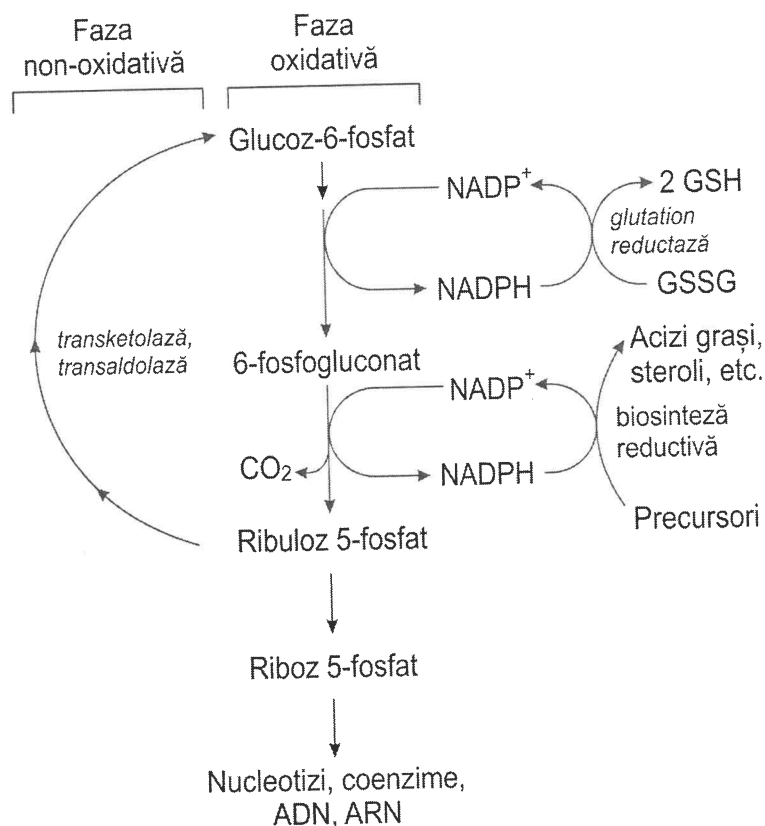
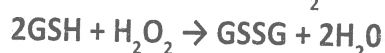


Figura 14.5 Călea pentozo-fosfaților în hematii

În eritrocite, șuntul pentozo-fosfaților asigură reducerea glutatationului oxidat prin intermediul NADPH, într-o reacție catalizată de glutatation reductaza, o enzimă ce conține FAD (Fig. 14.6).

Glutatationul redus este oxidat, iar o moleculă de apă oxigenată este transformată în două molecule de apă într-o reacție catalizată de glutatation peroxidază. Glutatationul oxidat este redus de glutatation reductază, o enzimă FAD-dependentă, la glutatation.

Glutatationul redus împreună cu glutatation peroxidaza asigură îndepărtarea  $H_2O_2$  prin două reacții:



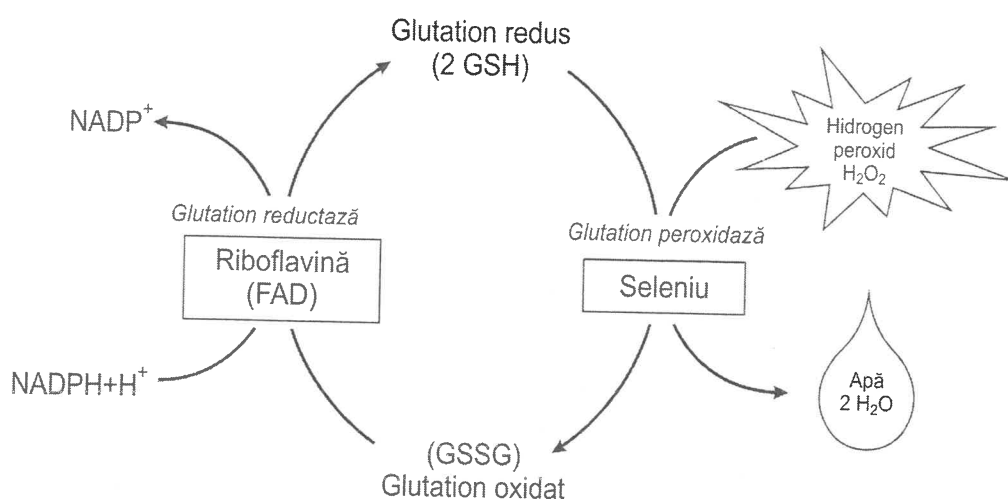
Aceste reacții sunt importante atâta timp cât acumularea  $H_2O_2$  duce la scurtarea duratei de viață a hematiilor. În deficitul de G-6-P DH, eritrocitele sunt supuse stresului oxidativ, iar hemoglobina oxidată precipită în hematii ceea ce duce la lezarea acestora și respectiv la hemoliză.

La acești pacienți, episoadele de hemoliză devin evidente în condițiile administrării de medicamente ce sporesc nevoia de NADPH la nivel celular, parte dintre acestea fiind incluse în tabelul 14.V.

### **Diagnosticul de laborator în anemia prin deficit de G-6-P DH:**

#### **Criterii:**

- Anemie normocromă, prezența corpilor Heinz.
- Anizocitoză, poikilocitoză, policromatofilie.
- Reticulocitoză.
- Creșterea bilirubinei neconjugate, creșterea lactat dehidrogenazei.
- Măsurarea producției NADH (scăderea este evidentă dacă 20-30% din hematii au deficit enzimatic).
- Testul cu cianură ascorbat (măsoară capacitatea eritrocitelor de a preveni oxidarea hemoglobinei indusă de ascorbat).



**Figura 14.6 Oxidarea glutatationului redus**

**Tabel 14.V Medicamente ce facilitează hemoliza în deficitul de G-6-P DH**

<b>Antimalarice</b>	<b>Antipiretice și analgezice</b>
Chinidina	Acetaminofen
Chinina	Acid acetilsalicilic
Clorochin	Acetanilida
Pirimetamina	<b>Diverse</b>
Primachin	Fenazopiridina
Mepacrin	Fenilhidrazina
<b>Medicamente antibacteriene</b>	Vitamina K
Nitrofurantoin	Naftalina
Acid nalidixic	Probenecid
Cloramfenicol	Trinitrotoluen
Furozolidon	Albastru de metilen
Sulfamide	
Izoniazida	

#### 14.4.2 DEFICITUL DE PIRUVAT KINAZĂ

Deficitul de piruvat kinază este un defect enzimatic al căii glicolitice ce determină anemie hemolitică. Această deficiență este a doua eritroenzimopatie ca frecvență după deficitul de glucoză-6-fosfat dehidrogenază și se transmite ereditar într-o manieră autozomal recesivă.

Singura cale ce furnizează ATP în eritrocitele mature este calea glicolitică și deficiențe ale enzimelor din glicoliză duc la reducerea duratei de viață a hematiilor în condițiile în care acestea sunt lipsite de nucleu, mitocondrii și ribozomi.

Piruvat kinaza este o enzimă ce participă la calea glicolitică în reacția de formare a piruvatului din fosfoenolpiruvat, reacție în care are loc fosforilarea adenzin-difosfatului (ADP) în adenzin trifosfat (ATP) (fig. 14.7). Această etapă este importantă din punct de vedere energetic furnizând aproape 50% din totalul ATP-ului. La indivizii cu deficit de piruvat kinază s-a demonstrat un nivel eritrocitar scăzut de ATP și crescut de 2,3-difosfoglicerat. Deoarece creșterea 2, 3-difosfogliceratului facilitează disocierea oxihemoglobinei, anemia prin deficit de piruvat kinază este mai bine tolerată clinic.

#### **Diagnosticul de laborator în anemia hemolitică prin deficit de piruvat kinază:**

##### **Criterii:**

- anemie
- reticulocitoză
- hiperbilirubinemie indirectă
- morfologia hematiilor nu este specifică (un anumit grad de anizocitoză, poikilocitoză, policromatofilie și prezența de echinocite mai ales la pacienții splenectomiți).
- activitate enzimatică scăzută a piruvat kinazei.
- diagnosticul molecular a deficitului de piruvat kinază este realizat de obicei prin secvențierea tuturor exonilor și a promotorului genei *PK LR*.

În etiologia eritroenzimopatiilor sunt incriminate cu o frecvență mai mică și deficite ale altor enzime din metabolismul glucidic. O listă a unora dintre acestea este prezentată în tabelul 14.VI

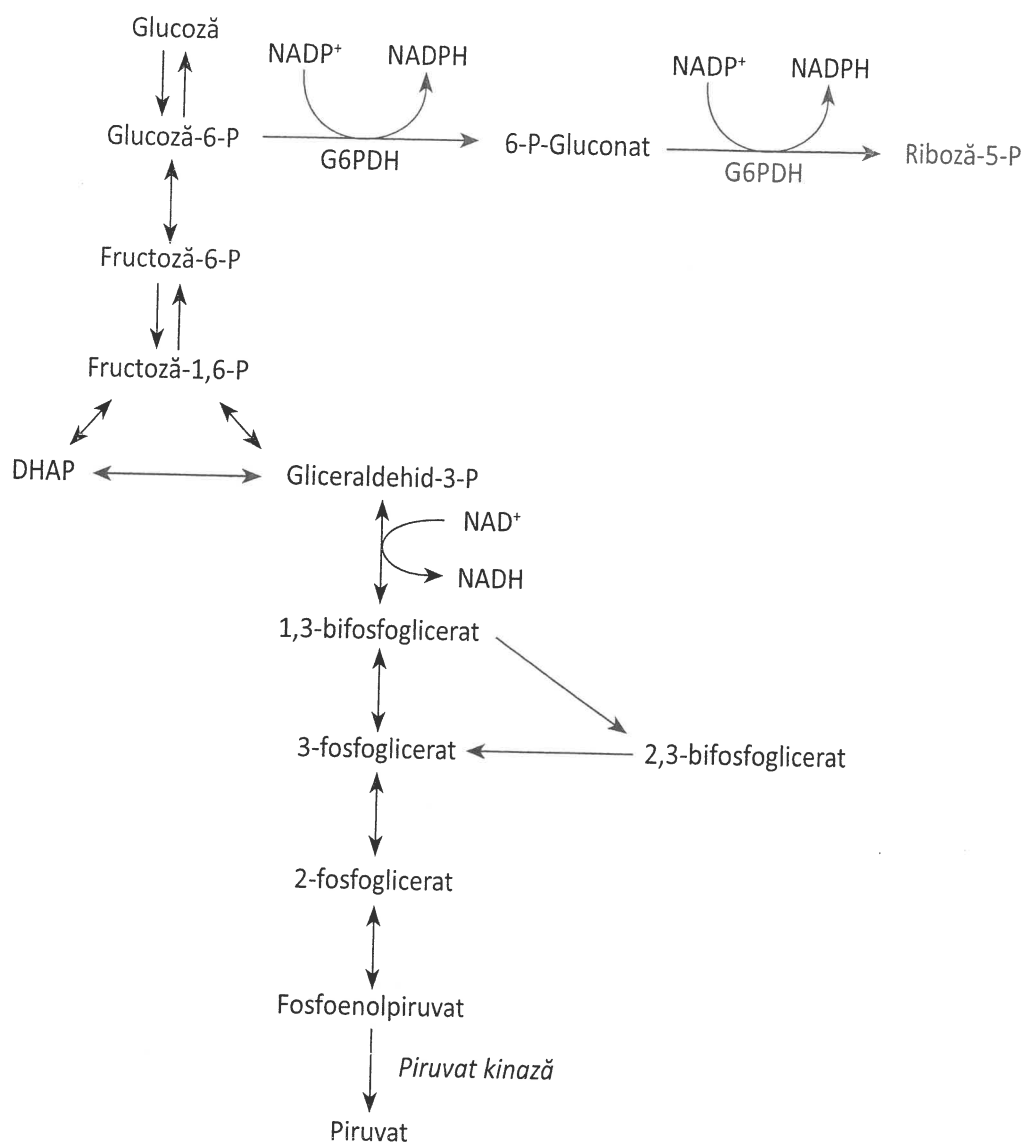


Figura 14.7 Prezentare schematică a modului de utilizare a glucozei în hematii

Tabel 14.VI Enzimopatii ale metabolismului hematiilor care determină anemie hemolitică

Enzime	Mod de transmitere	Manifestari
Glucos-fosfoizomeraza	Autosomal recesiv	Hiperbilirubinemie neonatală, anemie hemolitică
Glutation-sintetaza	Autozomal recesiv	Anemie hemolitică, acidoză metabolică
Hexokinaza	Autozomal recesiv	Anemie hemolitică
Fosfo- fructokinaza	Autozomal recesiv	Anemie hemolitică, boala depunerii de glicogen
Aldolaza	Autozomal recesiv	Anemie hemolitică, boala depunerii de glicogen
Fosfo-glicerokinaza	Legată de cromozomul X	Anemie hemolitică, retard mental, mioglobinurie
Trioz-fosfat izomeraza	Autozomal recesiv	Anemie hemolitică, manifestari neurologice progresive
Pirimidin 5' nucleotidaza	Autozomal recesiv	Anemie hemolitică cu punctații bazofile

## 14.5 ANEMII HEMOLITICE DOBÂNDITE

### 14.5.1.1 ANEMII HEMOLITICE DE CAUZĂ IMUNĂ

Anemia hemolitică autoimună este o boală eterogenă în ceea ce privește tipul de anticorp implicat precum și prezența sau absența unei cauze decelabile. Se caracterizează prin hemoliză (distrucție prematură a eritrocitelor circulante) și de cele mai multe ori este idiopatică însă se asociază și cu afecțiuni de tipul infecțiilor, bolilor limfoproliferative, boli autoimune precum și cu administrarea de diverse medicamente.

AHAI se clasifică după două criterii:

#### 1. În funcție de caracteristicile anticorpilor :

- AHAI cu "anticorpi la cald" – Ac devin activi la temperaturi cuprinse între 35°C-40°C. Aproape întotdeauna anticorpul este de tip IgG (excepțional IgA, IgM). Adesea anticorpul fixează complementul pe suprafața membranei eritrocitare însă fără formarea completă a complexului de atac membranar, distrucția hematiilor realizându-se în cea mai mare parte prin fagocitoză la nivelul macrofagelor splenice.
- AHAI cu "anticorpi la rece" – de regulă anticorpul este de tip IgM și devin activi la temperaturi sub 22°C. Anticorpul se atașează de hematii la temperaturi scăzute și fixează complementul. Uzual determină hemoliză extravasculară însă prezența anticorpilor în titru mare poate provoca și hemoliză intravasculară.

#### 2. În funcție de origine:

- *hemoliză intravasculară* - hemoliză în compartimentul intravascular cu hemoglobină eliberată în plasmă; apare ca urmare a incompatibilității ABO, prezenței complementului, defecte de membrană, deficiențe enzimatice, toxine, medicamente.
- *hemoliză extravasculară*- hematii recunoscute ca străine sau rigide ce sunt sechestrate în splină și distruse prin fagocitoză (în cazul prezenței de imunoglobuline, complement, defecte de membrană).

### 14.5.2 ANEMII HEMOLITICE DE CAUZĂ NON-IMUNĂ

Deși mai puțin frecvent întâlnite comparativ cu sindroamele hemolitice cu mecanism imunologic, anemiile hemolitice de cauză non-imună sunt întâlnite în practică, cele mai frecvente cauze fiind prezentate în tabelul 14.VII

#### 14.5.2.1 Anemia hemolitică indusă de infecții

Agenții infecțioși pot cauza apariția unui sindrom anemic prin multiple fenomene fiziopatologice, mecanismele sindromului hemolitic infecțios includ fără a se limita la: invazie directă urmată de distrucție (ex. malarie, babesioză, bartoneloză, tripanosomiază), lezarea membranei hematiei prin producerea de lizolecitină (*Clostridium perfringens*), hemoliza microangiopatică asociată coagulării intravasculare diseminate însoțind sepsisul, mecanisme indirecte legate de afecțiunile infecțioase cum este cazul hemolizei induse de antibioterapie (în acest caz sunt descrise și fenomene imune cum este cazul mecanismului de haptene).

**Tabel 14.VII Cauze non-imune ale anemiei hemolitice dobândite**

Cauze mecanice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proteze valvulare disfuncționale</li> <li>• hemoglobinuria de marș</li> <li>• anemii hemolitice microangiopatice</li> </ul>
Cauze infecțioase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• infectare directă: <i>Babesia sp</i>, <i>Bartonella bacilliformis</i>, <i>Plasmodium falciparum</i>, <i>P. malariae</i>, <i>P. vivax</i></li> <li>• septicemii cu bacterii gram-pozitive și gram-negative, leptospiroza, infecții cu <i>Clostridium perfringens</i></li> </ul>
Administrarea de substanțe chimice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• medicamente (sulfamide, cisplatin, nitrofurantion, fenacetin, etc)</li> <li>• substanțe chimice (nitrați, albastru de metilen, naftalină, etc)</li> </ul>
Perturbări ale metabolismului lipidic	<ul style="list-style-type: none"> <li>• abetalipoproteinemia ereditară</li> <li>• stadii terminale ale bolilor hepatice</li> </ul>
Hipofosfatemie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• alcoolism</li> <li>• administrare prelungită de antiacide ce leagă fosfați</li> </ul>

#### 14.5.2.2 Anemia hemolitică cauzată de agenți fizici și chimici

Un exemplu tipic de anemie hemolitică de cauză mecanică este reprezentat de sindromul anemic ce survine în contextul prezenței unei proteze valvulare cardiace mecanice disfuncționale ce induce leziuni eritrocitare prin fragmentare ce explică apariția unui fenomen de hemoliză cronică intravasculară.

Mai frecvent întâlnită, dar cu semnificație clinică uzual limitată, este hemoglobinuria de marș explicată de deteriorarea mecanică a hematiilor la nivelul capilarelor tălpilor în timpul mersului.

Anemiile microangiopatice pot fi considerate dintr-un punct de vedere fiziopatologic ca având determinism mecanic, anemia hemolitică având drept cauză interacțiunea dintre hematii și filamentele de fibrină. Aceste mecanisme apar în afecțiuni de tipul purperei trombotice trombocitopenice, sindromului hemolitic și uremic, eclampsia, hipertensiune malignă, coagulare intravasculară diseminată.

Substanțe chimice diverse precum și medicamente pot determina hemoliza la pacienți cu hematii aparent normale dar și în cazul asocierii unor deficite enzimatice (G-6-P DH, PK). O listă a celor mai implicate substanțe chimice ce sunt asociate cu anemia hemolitică este prezentată în tabelul 14.V.

#### 14.5.2.3 Anemie hemolitică prin perturbări ale metabolismului lipidic

Există câteva situații patologice în care perturbarea metabolismului lipidic duce la anomalii ale membranei fosfolipidice eritrocitare având drept consecință apariția unei anemii hemolitice ce însoțește prezența de acantocite vizualizate pe frotiul de sânge periferic. Între aceste situații patologice se numără: abetalipoproteinemia ereditară, boli hepatice severe, privare alimentară îndelungată de lipide (înfometare).

#### 14.5.3 DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEMOLIZEI

Diagnosticul de laborator al anemiei hemolitice are uzual o complexitate crescută întrucât include pe lângă explorările hematologice o paletă de teste dedicate identificării etiologiei;

cauzele anemiilor hemolitice sunt multiple și includ entități și factori diverși, necesitând cel mai adesea pentru elucidare o contribuție clinică. Chiar și în aceste condiții există un minim de teste ce pot oferi o orientare adecvată în diagnostic.

Deși sindromul anemic este diagnosticat cel mai frecvent pe baza hemoleucogramei, studiul morfologic al hematiilor poate aduce date etiologice deosebit de utile, uneori patognomonice (tabel 14.VIII).

**Tabel 14.VIII Asocierea morfologiei hematiilor cu unele condiții generatoare de hemoliză**

Aspect microscopic	Cauză posibilă
Sferocite	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sferocitoza ereditară</li> <li>• anemie hemolitică cu anticorpi la cald</li> <li>• transfuzii de sânge</li> </ul>
Schizocite	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proteze valvulare</li> <li>• microangiopatie</li> </ul>
Hematii aglutinate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anemie hemolitică cu anticorpi la rece</li> </ul>
Corpi Heinz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• deficiență de G-6-P DH</li> <li>• stress oxidativ</li> </ul>
Hematii "în țintă"	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hemoglobinopatii*</li> <li>• boli hepatice grave</li> </ul>
Hematii "în seceră"	<ul style="list-style-type: none"> <li>• siclemie</li> </ul>
Acantocite	<ul style="list-style-type: none"> <li>• acantocitoză ereditară</li> <li>• boli hepatice</li> <li>• abetalipoproteinemia</li> </ul>

\*problematica este tratată în detaliu în capitolul 13.1.5

Diferențierea anemiei hemolitice în ceea ce privește originea intra sau extravasculară este utilă în stabilirea diagnosticului, o diferențiere a acestora din punct de vedere al testelor de laborator este prezentată în tabelul 14.IX.

**Tabel 14.IX Diagnosticul anemiei hemolitice autoimune**

Parametrii de laborator și semne clinice		Hemoliză intravasculară	Hemoliză extravasculară
Determinări de laborator	Hemoglobinemie	Prezent	Absent
	Hemoglobinurie	Prezent	Absent
	Hemosiderinurie	Prezent	Absent
	Haptoglobina	Scăzută sau absent	Normală sau redusă
	Bilirubina	Bi indirectă crescută	Bi indirectă crescută
	LDH	Semnificativ crescută	Crescută
	Fier, feritina	Crescute	Crescute
	Urobilinogen urinar	Crescut	Crescut
	Aspect frotiu	Anizocitoză cu policromatofilie, schizocite, hematii fragmentate, eritroblaști circulați	Anizocitoză cu policromatofilie, sferocite, eritroblaști circulanți
	Test Coombs	Pozitiv	Pozitiv
Semne clinice	Icter	Prezent	Prezent
	Splenomegalie	Absentă	Prezentă

### Lista cu abrevierile folosite în text

- ADP**- adenzin difosfat  
**AHAI** – anemie hemolitică autoimună  
**ATP**- adenzin trifosfat  
**Bi** - bilirubină  
**CHEM** –concentrația hemoglobinei eritrocitare medii  
**dTMP** – deoxitimidin monofosfat  
**dUMP** - deoxiuridin monofosfat  
**FI**- factor intrinsec  
**G-6-P DH** – glucoză-6 fosfat dehidrogenază  
**Hb** - hemoglobină  
**HEM**- hemoglobină eritocitară medie  
**LDH** – lactat dehidrogenază  
**PK** – piruvat kinază  
**PK LR** – gena care codifică enzima piruvat-kinaza  
**RDW**- variația dimensiunilor eritrocitelor  
**VEM**- volum eritocitar mediu

### Bibliografie recomandată

1. Aslinia F, Mazza JJ, Yale SH. Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. Clin Med Res. 2006 Sep;4(3):236-41.
2. Bender DA, Mayes PA. The Pentose Phosphate Pathway & Other Pathways of Hexose Metabolism. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Harper's Illustrated Biochemistry, 30<sup>th</sup> edition. The McGraw-Hill Companies. USA. 2015. pg 196-206.
3. Bhagavan NV. Medical Biochemistry. Academic Press, 2002, Orlando, Florida, USA. pg 298-304.
4. Coliță D. Anemii. Generalitati. Clasificare. Păun R. Tratat de medicină internă. Editura Medicală, București. 1997. pg 556-629.
5. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. Harrison's Principles of Internal Medicine 17th edition. McGraw-Hill, USA, pg 635-662.
6. Fleer A, van Schaik ML, dem Borne AE, et al. Destruction of sensitized erythrocytes by human monocytes *in vitro*: effects of cytochalasin B, hydrocortisone and colchicine. Scand J Immunol. 1978; 8(6): 515–524
7. Kern WF. PDQ Hematology. BC Decker Inc, Canada (Ontario), 2002. pg 116-135.
8. Koury MJ, Horne DW, Brown ZA, Pietenpol JA, Blount BC, Ames BN, Hard R, Koury ST. Apoptosis of late-stage erythroblasts in megaloblastic anemia: association with DNA damage and macrocyte production. Blood. 1997 Jun 15;89(12):4617-23.
9. Lechner K, Jäger U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. Blood. 2010 Sep 16;116(11):1831-8.
10. Luzzatto L, Karadimitris A. The molecular basis of anemia. Provan D, Gribben J. Molecular Hematology.

Blackwell Publishing Ltd, USA. 2005. pg 125-149.

11. Mack P, Freedman J. Autoimmune hemolytic anemia: a history. *Transfus Med Rev.* 2000 Jul;14(3):223-33.
12. Porter RS, Kaplan JL. *The Merck Manual of Diagnosis & Therapy 19<sup>th</sup> edition.* Merck Sharp & Dohme. USA. 2011 pg 1028-1058.
13. Sokol RJ, Hewitt S. Autoimmune hemolysis: a critical review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1985;4(2):125-54.
14. Veda P. Evaluation of macrocytosis in routine hemograms. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2013 Mar;29(1):26-30.

# Anexa 1

## Abrevieri

17-CS = 17 cetosteroizi	ALAD = acid $\delta$ -amino levulinic dehidratază
2,3-DPG = 2,3-difosfoglicerat	ALT = GPT = alanin transaminaza, glutamico-piruvico transaminaza
5 HTA = Serotonina = 5 hidroxi-triptamina	AMP = adenzin monofosfat
5-HIAA = acid 5-hidroxi indolacetic	AMPC = Adenzinmonofosfat ciclic
$\alpha$ 1 AT = alfa 1 antitripsina	ANP = <i>atrial natriuretic peptide</i> – peptidul natriu-retic atrial
$\alpha$ 2 Mg = alfa 2 macroglobulina	APC = proteina C activată
Aa = aminoacizi	ApoP = apoproteine
AC = anhidraza carbonică	APTT = timpul de tromboplastină parțial activată
Ac ~ S CoA = acetil coenzima A	APUD = <i>amine precursor uptake and decarboxylation</i>
ACE = <i>angiotensin converting enzyme</i> – enzima de conversie a AT I în AT II	Arg = arginina
ACP = proteina de transport / transfer a grupărilor acil	ARN = acid ribonucleic
ACTH = hormon adrenocorticotrop	ARNm = ARN mesager
ADA = <i>American Diabetes Association</i>	ARNr = ARN ribozomal
ADAMTS-13 = <i>a disintegrin – like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13</i>	ARNt = ARN de transfer
ADH = <i>antidiuretic hormone</i> – vasopresina	AST = GOT = aspartat transaminaza, glutamico-oxalacetic transaminaza
ADN = acid dezoxiribonucleic	AT = angiotensină
ADNdc = ADN dublu catenar	AT III = antitrombina III
ADNmc = ADN monocatenar	ATP = adenzin trifosfat
ADNmt = ADN mitocondrial	AVK. = antivitamină K
ADP = adenzin difosfat	AVM = acid vanilmandelic
AFP = alfa fetoproteina	$\beta$ TG = $\beta$ tromboglobulina
AG = acizi grași	$\beta$ 2 mg = beta-2-microglobulina
AHAI = anemie hemolitică autoimună	BA = bicarbonat actual
AINS = antiinflamatoare nonsteroidiene	Bar; 1 bar = 0,1 MPa = 100 kPa = 105 Pa
ALA = acid $\delta$ -amino levulinic	BE = baze exces
Ala = alanina	$\beta$ HCG = fracțiunea $\beta$ a hormonului coriogonadotrop

- pic uman  
 BHE = bariera hemato-encefalică  
 Bi = bilirubină  
 BK = bradikinină  
 BS = bicarbonat standard  
 BT = baze tampon  
 C = *clearance*  
 C4b-BP = *C4b Binding Protein* – proteina care leagă fracțiunea C4b a complementului  
 Ca = calciu total  
 Ca<sup>2+</sup> = calciu ionic  
 CCK = colecistokina  
 CDC = *Centers for Disease Control and Prevention* (Atlanta)  
 CEA = antigenul carcinoembrionar  
 CHEM = concentrația hemoglobinei eritrocitare medii  
 Ch = chilomicroni  
 CIC = complexe imune circulante  
 CID = coagulare intravasculară diseminată  
 Cit = citocrom  
 CK = CPK = creatinfosfat kinază  
 Cl = clor  
 CLIP = *corticotropin-like intermediary peptide* – peptidul similar corticotropinei, provenit din lobul intermediar  
 CMH = complex major de histocompatibilitate  
 CMP = citidin monofosfat  
 CO<sub>2</sub> = dioxid de carbon  
 CRH = *corticotropin releasing hormone* – corticoliberină  
 CSR = corticosuprarenala  
 Cu = cupru  
 D-D = D-dimeri  
 DAG = diacilglicerol  
 dAMP = deoxiadenozin monofosfat  
 dCMP = deoxicitidin monofosfat  
 DDAVP = Dezaminodextroargininvasopresină  
 dGMP = deoxiguanozin monofosfat  
 DI = diabet insipid  
 DIT = diiodtirozină  
 DOPA = dihidroxi fenil alanina  
 dTMP = deoxitimidin monofosfat  
 DXA = DEXA = dual energy X-ray absorptiometry  
 DZ = diabet zaharat  
 EAB = echilibrul acido-bazic  
 EDRF = *endothelial derived relaxing factor*  
 EDTA = etilen diamino tetra acetat  
 EGF = *epidermal growth factor*  
 EIA = *enzymatic immunoassay*  
 ELAM = *endothelial leucocyte adhesion molecule*  
 ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*  
 EPCR = *endothelial protein C receptor* – receptorul endotelial al proteinei C  
 EPI = *external pathway inhibitor* - inhibitorul căii extrinseci  
 EXCA = *extrinsic coagulation activity assay*  
 F Alc = FAL = fosfatază alcalină  
 FAH = fenilalanin hidroxilază  
 FDA = Food and Drug Administration  
 FeOOH = oxihidroxid feric  
 FGF 1-7 = factori de creștere ai fibroblaștilor 1-7  
 FIA = *fluorescent immunoassay*  
 FIPA = *fibrinolysis parameters assay*  
 FN = fibronectina  
 FPR = fluxul plasmatic renal  
 FSH = hormonul foliculostimulator  
 FSR = fluxul sanguin renal  
 G = glucoză  
 GGT = γGT = γ glutamil transpeptidază  
 GH = hormonul de creștere  
 GH-R = receptorului pentru GH  
 GHBP = *GH-binding proteins* – proteine care leagă GH  
 GHRH = *growth hormone releasing hormone* - somatoliberină  
 GHRP = *growth hormone releasing peptides* – peptide care determină eliberarea GH  
 GIP = *gastric inhibitory polypeptide* – polipeptidul inhibitor gastric

Gln = glutamină	asemănător insulinei
Glu = acid glutamic	IL = interleukină
GLUT = transportor de glucoză	IL-1 = interleukina 1
GM = greutate moleculară	IL-6 = interleukina 6
GMP = guanozin monofosfat	INR = <i>international normalized ratio</i>
Gn = glicogen	IP3 = inozitol 1,4,5 - trifosfat
GN = glomerulonefrită	IRA = insuficiență renală acută
H <sub>2</sub> = hidrogen gazos	IRC = insuficiență renală cronică
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> = acid carbonic	ISI = <i>international sensitivity index</i>
Hb = hemoglobină	JAK2 = <i>Janus kinase 2</i>
HbA1c = hemoglobină glicozilată, fracțiunea 1c	K = potasiu = kaliu
HbF = hemoglobina fetală	K = constanta de echilibru
HC II = cofactorul II al heparinei	LA = lacună anionică
hCG = <i>human chorionic gonadotropin</i> - gonadotropina corionică umană	LCAT = lecitin colesterol acil transferază
HCG = hCG = hormon coriogonadotropic uman	LCR = lichid cefalorahidian
HCl = acid clorhidric	LDH = lactat dehidrogenaza
HCO <sub>3</sub> = bicarbonat	LDL = <i>low density lipoproteins</i> – LP cu densitate mică
HDL = <i>high density lipoproteins</i> – LP cu densitate mare	LEC = lichid extracelular = ECF ( <i>extracellular fluid</i> )
HEM = hemoglobina eritocitară medie	LED = lupus eritematos diseminat
HER-2 = receptorul pentru factorul de creștere epidermic	LH = hormonul luteinizant
His = histidină	LIA = <i>luminescent immunoassay</i>
HIV = virusul imunodeficienței umane	LIC = lichid intracelular
HLA -A, -B, -C = antigene leucocitare umane A, B, C	LLA = leucemie limfatică acută
HMWK = <i>high molecular weight kininogen</i> – kininogen cu masă moleculară mare	LLC = leucemie limfatică cronică
HPL = <i>human placental lactogen</i>	LP = lipoproteine
HPLC = cromatografia lichidă de înaltă presiune/perforanță	LPH = lipotropina
HSP = Hsp = <i>heat-shock proteins</i> – proteine de șoc termic	LPL = lipoprotein lipază
HVA = Acid Homovanilinic	LTP = CETP = proteina de transfer a lipidelor între LP
i.m. = intramuscular	Lys = lizina
i.v. = intravenos	MAO = monoaminoxidaza
IDDM = diabet zaharat insulino-dependent	MAPK = <i>mitogen-activated protein kinase</i> - proteinkinazele activate de mitogeni
IFN-γ = interferon γ	Mb = mioglobină
Ig G, A, M = imunoglobuline G, A, M	MBG = membrana bazală glomerulară
IGF = <i>insulin-like growth factors</i> – factor de creștere	MCF = microscopie în contrast de fază
	MCH = media hemoglobinei corpusculare
	MCV = volumul mediu eritocitar
	MEN = Neoplaziile endocrine multiple
	Mg = magneziu
	Mg <sup>2+</sup> = magneziu ionic

MGG = May-Grünwald-Giemsa

MIT = monoiodotirozină

MLP = microscopie în lumină polarizată

MO = microscopie optică

MSH = hormonul melanocitostimulator

Na = sodiu = natriu

NANA = acid N-acetil neuraminic

NH<sub>3</sub> = amoniac

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = ion amoniu

NH<sub>4</sub>OH = hidroxid de amoniu

NIDDM = diabet zaharat noninsulinodependent

NIS = *sodium-iodide symporter* – sistem de sinport Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>

NO = oxidul nitric = EDRF = Endotelium-Derived Relaxing Factor

NSE = enolaza neuron specifică

OMS = Organizația Mondială a Sănătății

PABA = acid para-aminobenzoic

PAF = *platelet activating factor* – factorul activator plachetar

PAH = acid p-amino hipuric

PAI = *plasminogen activator inhibitor* – inhibitorul activatorului plasminogenului

PAR-1 = receptor activat de proteaze 1

PBG = porfobilinogen

PC = prohormon convertază

PC = proteina C

pCO<sub>2</sub> = presiunea parțială a dioxidului de carbon

PCR = proteina C reactivă

PDF = produși de degradare ai fibrinei și fibrinogenului

PDGF = *platelet derived growth factor* – factorul de creștere endotelial derivat din plachete

PEF = presiune efectivă de filtrare

PET = tomografie de emisie cu pozitroni

PF3 = *platelet factor 3* – factorul plachetar 3

PF4 = *platelet factor 4* – factorul plachetar 4

PGI<sub>2</sub> = prostaglandina I<sub>2</sub> = prostaciclina

pH = lg 1/[H<sup>+</sup>]

Phe = fenilalanină

pHi = pH izoelectric

Pi = fosfați anorganici

PIP<sub>2</sub> = fosfatidilinozitol 4,5-difosfat

PIVKA = *protein induced by vitamin K absence or antagonism* – proteine induse în absența sau antagonizarea vitaminei K

PKC = proteinkinaza C

PLC = fosfolipaza C

PMN = polimorfonucleare neutrofile

pO<sub>2</sub> = presiunea parțială a oxigenului

POMC = proopiomelanocortina

PPP = *platelet poor plasma* – plasmă săracă în plachete

PRL = prolactina

PRP = *platelet rich plasma* – plasmă bogată în plachete

PS = proteina S

PSA = antigen specific prostatic

PT = timp de protrombină

PTH = parathormonul

PTH rP = peptid similar hormonului paratiroidian

PZ = proteina Z

PZI = *protein Z inhibitor* – inhibitorul proteinei Z

RAA = renină – angiotensină – aldosteron

RBF = *renal blood flow* – fluxul sanguin renal

RBP = *retinal, -ol binding protein* – proteina transportoare de retinal, -ol

RFG = rata filtrării glomerulare

RFG<sub>e</sub> = rata filtrării glomerulare estimate pe baza formulei Cockcroft-Gault

RIA = metode de radioimunochimie

SBG = stercobilinogen

sc-t-PA = *single chain t-PA*

sc-u-PA = prourokinaza

SCC = antigenul celulelor carcinoame scuamoase

Ser = serină

SIADH = *Syndrome of Inappropriate production of ADH* – sindrom de producere inadecvată a ADH

SIDA = sindromul de imunodeficiență dobândită

SNC = sistem nervos central	Tn = troponină
SPECT = scintigrafie cu trasori emițători de fotoni unici	TNF $\alpha$ = factor de necroză tumorală $\alpha$
SRE = sistemul reticulo-endotelial	tPA = activatorul tisular al plasminogenului
SRMN = spectroscopia în rezonanță magnetică nucleară	TPA = <i>tissue polypeptide antigen</i> - antigenul polipeptidic tisular
STAT = <i>signal transducers and activators of transcription</i> - molecule de traducere a semnalului și activare a transcripției	TQ = timp Quick
STH = hormonul de creștere (somatotrop)	TRAb = anticorpi anti-receptor de TSH
t-PA = <i>tissue plasminogen activator</i> – activator tisular al plasminogenului	TRE = <i>thyroid response elements</i> – elemente de răspuns la hormonii tiroidieni
T3 = triiodtironina; fT3 = triiodtironina liberă; TT3 = triiodtironina totală	TRH = <i>thyrothropin-releasing hormone</i> – tireoliberina
T4 = tiroxina; fT4 = tiroxina liberă; TT4 = tiroxina totală	Trp = triptofan
TAFI = <i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i> – inhibitorul fibrinolizei activat de trombină	TSH = hormonul tireostimulant
TBG = <i>thyroxine binding globulin</i> – globulina care leagă tiroxina	TSH = <i>thyroid-stimulating hormone</i> – hormonul tireotrop
TBPA = <i>thyroxine binding prealbumin</i> – prealbumina care leagă tiroxina	TT = timp de trombină
tc-t-PA = two chain t-PA	TTR = <i>transthyretin</i> – transtiretina
TCD = tub contort distal	TxA <sub>2</sub> = tromboxanul A <sub>2</sub>
TCP = tub contort proximal	u-PA = urokinaza
TF = factor tisular	Ubg = UBG = urobilinogen
TF = <i>tissue factor</i> – factorul tisular	UDP = uridin difosfat
TFPI = <i>tissue factor pathway inhibitor</i> – inhibitorul căii mediate de factorul tisular	UMP = uridin monofosfat
TG = trigliceride	UTP = uridin trifosfat
TGF $\alpha$ , $\beta$ = <i>transforming growth factors</i> $\alpha$ , $\beta$ – factorul de creștere transformant $\alpha$ și $\beta$	Val = valină
THBR = <i>thyroid hormones binding ratio</i> - raportul de legare a hormonilor tiroidieni	VCAM = <i>vascular cells adhesion molecule</i>
TIBC = capacitatea totală de legare a fierului	VEM = volumul eritrocitar mediu
TIMP = inhibitorul tisular al metaloproteinazelor	VGEF = <i>vascular endothelia growth factor</i> – factorul de creștere al endoteliilor vasculare
TK = timidin-kinaza	VIP = <i>vasoactive intestinal polypeptide</i> – polipeptidul vasoactiv intestinal
TM = trombomodulina	VLDL = <i>very low density lipoproteins</i> – LP cu densitate foarte mică
	VPF = factorul permeabilizator vascular
	VSH = viteza de sedimentare a hematiilor
	vWF = <i>von Willebrand factor</i> – factorul von Willebrand
	Zn = zinc



## Anexa 2

### Index de subiecte

5

5-nucleotidaza 358

#### A

Acidoză tubulară renală 27

Acetil CoA 95, 104, 266, 359

Acetilcolină 254-256

Acetonă 416

Acid acetic 156, 231, 234-235

Acid arahidonic 306-308, 311, 314

Acid aspartic 84, 91, 98-100, 115, 116, 131, 142

Acid chenodeoxicolic 360, 363

Acid colic 360, 363

Acid deoxicolic 363

Acid folic 93, 109, 262, 284-285, 426, 427, 430-431

Acid glicocolic 360, 363

Acid glutamic 84, 88, 96-100, 114-115, 142, 253, 296-297, 318, 335, 349, 371, 400, 427-428, 445

Acid homogentizinic 93, 221

Acid homovanilic 294-295

Acid lactic 35-36, 40, 45, 359, 371, 391

Acid litocolic 360, 362-363

Acidoză 28-29, 39, 43-47

Acidoză metabolică 26-27, 29, 30, 45-46, 48-49, 78, 223

Acidoză respiratorie 41, 45-50, 73

Acidoză tubulară renală 27-28, 45

Acid para-amino hipuric 211, 213, 216

Acid uric 144-145, 203, 206, 213, 234, 236-237, 243-245

Acizi biliari 104, 291, 359-360, 362-364, 366,

369, 372

Acizi grași 253-254

Actină 283, 370, 432

ADAMTS-13 311-312

Addis-Hamburger 234

Adrenalină 75, 111, 209, 270, 306, 311, 314, 335

Afibrinogenemie 311, 327

Alanină 93, 100, 107, 113, 115-116

Alanin transferază 264

Alanin trasaminaza 96

Albinism 90, 111, 221

Albumină 8, 57, 70, 130-132, 160-162, 191-192, 223-225, 228, 237, 367, 370, 373-374, 376, 378, 381, 383

Albumină plasmatică 57, 131-132, 370, 383

Alcaloză 26, 28, 41, 44-45, 47

Alcaloză metabolică 23, 26, 28, 45, 47-49

Alcaloză respiratorie 41, 45-49

Alcaptonurie 90, 93, 109, 221

Alcool 3, 5, 22, 65, 72-73, 76, 128, 188, 190, 235, 272-274, 278, 279, 282, 289, 290-291, 360, 366-368, 395-396, 421, 427, 439

Aldolază 72, 229, 281, 358, 367, 437

Aldosteron 16-19, 23, 26-29, 33, 75, 203, 207, 209, 214

Alfa-fetoproteină 140, 286, 366, 370

Amilază serică 265, 289-291

Amilazurie 290

Aminoacidurie 89-92, 221

Amoniac 43, 88, 95-100, 102, 115, 207, 213, 359-360, 366, 371

Amoniemie 99-100, 359

AMP 60, 64, 99, 267

AMPc 21, 60, 69, 264, 267-268, 343  
 Anemie 51, 148-149, 408, 419, 426, 435, 437, 439  
 Anemie feriprivă 134, 149, 408, 411-412, 419, 426  
 Anemie hemolitică 284, 310, 375, 377, 400, 426, 431, 433, 438-440  
 Anemie megaloblastică 283-284, 310, 426-427, 430  
 Anexina V 334  
 Angiotensină 16-19, 22, 28-29, 32, 203, 209, 320  
 Anhidrază carbonică 40-43, 124, 392  
 Ankirină 432  
 Anticorp 71, 125, 141-143, 160, 167, 177-180, 182-186, 194, 237, 263, 283, 345-346, 348, 366-367, 370, 383, 416-419, 431, 438, 440  
 Anticorpi antifosfolipide 325, 345-346  
 Antigen 125, 140-143, 177, 178-180, 182-186, 238, 306, 312-313, 315, 327, 329-330, 333, 338, 416, 418  
 Antigen specific prostatic 289  
 Antigenul carcino-embrionar 140  
 Antitrombină III 130, 135-136, 239, 302-303, 316, 329-330, 340, 342, 345  
 Antivitamine K 273, 325, 331, 349-350  
 Apoproteine 124, 127, 135, 335, 409  
 Apoptoză 55, 194, 308, 318  
 Aquaporine 21-22  
 Arginină 95, 98, 100, 102, 104-105, 114-115, 255, 295, 338  
 ARN mesager 127, 270-272  
 Asparagină 115-116, 127, 286  
 Aspartat transferază 96, 275, 278  
 AT vezi Angiotensină  
 Ateroscleroză 57, 106, 318, 331  
 ATP-ază 8, 27, 212, 421

## B

Barieră hemato-encefalică 46, 128, 189-190, 192, 378  
 BCKADH (branched chain ketoacid dehydrogenase) 295-296  
 Bence Jones (proteinurie) 165-166, 224-225, 247

Bicarbonat 29, 35, 37-44, 47-48, 222, 244, 392  
 Bilirubină directă (conjugată) 148, 150, 237, 360, 364, 373-374, 376-382, 415-416  
 Bilirubină indirectă (neconjugată) 237, 373-379, 382, 414, 416, 431, 435  
 Bilirubină totală 148, 150, 366, 368, 373, 375-376, 416, 431  
 Biliverdină 373  
 Boală Hartnup 114, 221  
 Boală Joseph 221  
 Boală Paget 61, 69-70, 288  
 Boala urinii cu miros de arțar 90, 93, 117, 220, 295  
 Boală von Willebrand 311-313

## C

C4b-BP (C4b Binding Protein) 332  
 Calbindin D 57, 58, 62  
 Calcitonină 59, 61, 65-67, 70, 72, 138  
 Calcitriol 59, 62  
 Calciu ionic 53-59, 63, 72, 74, 137, 144, 209, 260, 283, 306-307, 322-323, 331-332  
 Calciu total 66  
 Calmodulină 17, 57, 267  
 Cancer mamar 278, 288-289, 336, 342  
 Cancer testicular 278, 286  
 Carbaminohemoglobină 393  
 Carboxihemoglobină 393  
 Carcinom de prostată 278, 288-289  
 Catalază 373, 414  
 Catalizatori 125, 251, 254  
 Catecolamine 75, 77, 110-111, 310  
 Celule Kupffer 357, 365  
 Centru activ 103, 130, 253-256, 259, 261-262, 268, 276, 318, 320, 323, 332-333, 337-338  
 Ceruloplasmină 124, 129-130, 137-139, 239, 257, 367, 369, 409  
 Cetoacidoză 46, 50, 94  
 Cetoacidoză diabetică 16, 33, 45, 73  
 CHEM 425-426, 433  
 Ciclooxygenază 262, 307, 311  
 Ciclu Cori 359  
 Ciclu Krebs 5-6, 95, 99, 100-101, 115, 210, 262, 264, 266

- Circuit enterohepatic 361-362, 364, 374, 417  
 Ciroză 26, 64, 92, 99, 136, 139-140, 143, 146-147, 150, 165, 278, 312, 330, 337, 339, 343, 363-367, 369-370, 375, 377, 382-385, 411, 413, 422  
 Cisteină 88, 93, 95, 100, 103-106, 234, 323  
 Cistină 91, 104-106, 212, 221, 234, 244-245  
 Cistinurie 91, 104-105, 220-221  
 Citocromi 65, 124, 260, 273, 350, 372-373, 387, 395-396, 408, 414  
 Citokine 55, 127-128, 136-137, 193-194, 242, 251, 303, 312, 318, 322, 336, 339, 347, 359  
 Citrulină 98, 100  
 CKBB 278, 279  
 CKMB 279-282  
 CKMM 278-280, 282, 289  
 Clearance 19, 211, 213, 216, 218, 225-226, 274  
 Clearance-ul creatininei 216, 218-220, 238  
 Clororahie 189, 201  
 Clorură (Cl-) 3, 10, 12, 16-17, 30, 40-41, 44, 48-49, 51, 206, 213, 214  
 Coagulare intravasculară diseminată 312, 322, 324, 330, 333, 340-341, 343-345  
 Codon 327, 398  
 Coenzimă Q 259  
 Coenzime 5, 95, 101-102, 104, 117, 255, 256, 258-260, 295, 362, 408  
 Cofactorul II al heparinei 303, 330, 345  
 Colagen 53-56, 71, 124, 304-307, 311, 314, 320, 323  
 Colecalciferol (vitamina D3) 61-62, 203, 241  
 Colestază 64, 73, 135, 273, 276-278, 281, 288, 292, 364, 366, 368, 371, 377, 380-385  
 Colesterol 113, 130, 230, 234, 239, 262, 264, 270, 274, 296, 359, 360, 362-364, 371, 380, 431-432  
 Comă hiperosmolară 26, 189  
 Complement 127, 132, 137, 139  
 Complex enzimă-substrat 254, 257-258, 260-261, 322  
 Constanta Michaelis 257-258  
 Coombs (test) 433, 440  
 Corpi cetonici 16, 23, 35-36, 40, 42, 50, 95, 100, 111, 210, 359  
 Cortizol 26, 239, 272, 362  
 Creatină 101-103, 105, 210, 216, 252  
 Creatinină 31-33, 44, 70, 102-103, 148-149, 203, 206, 209, 210-211, 216-220, 224, 228, 237-238, 240-243, 245-247, 249, 266, 343, 351  
 Creatinkinază (CK) 103, 252, 265-266, 275-283, 289  
 Crioglobulină 144, 168  
 Cromatină 196, 430  
 Cromozom 91, 145, 221, 282, 327, 413, 437  
 Cupru 111, 138, 139  
 Cushing 26, 28, 32, 219, 239
- ## D
- D dimeri 338, 348, 351  
 Deleție 221, 346, 398, 405-406  
 Derepresie 269-273  
 Dermatansulfat 303, 330, 344  
 Deshidratare 10, 23-26, 31-32, 66, 122  
 dTMP (deoxitimidin monofosfat) 428, 430  
 Dubin-Johnson (sindrom) 366, 377, 380-382
- ## E
- Ecuația Michaelis-Menten 257  
 Edem 14-15, 25-27, 32-33, 131-132, 161, 217, 237-240, 281, 289, 417-418  
 Electroforeză 122-123, 126, 144, 147-148, 150, 153-160, 164, 167, 177, 180, 182-183, 224-228, 238-239, 246, 265, 268, 313, 315, 366, 368, 398, 401-403, 406-407  
 Eliptocitoză 431, 433  
 Enzimă de conversie a angiotensinei (ACE) 17, 29, 209  
 Ergocalciferol (vitamina D2) 61  
 Eritropoietină 207, 210, 417  
 Estrogeni 54, 63, 70, 128, 134, 140, 273  
 Etanol 31, 360  
 Etilen diamino tetra acetat (EDTA) 216, 288, 314, 401  
 Examen microscopic cantitativ 234  
 Exoni 436

**F**

Factor de creștere endotelial derivat din plăcuțe (PDGF) 305, 341  
 Factor II 318, 348  
 Factor IX 319-320, 325, 327, 352  
 Factor plachetar IV 305, 342, 345, 348  
 Factor tisular 301-304, 308, 315-316, 318-320, 326, 331, 339, 341-344  
 Factor V 270, 305, 322, 325, 328  
 Factor VIII 304, 310-312, 319-320, 322, 325, 327, 339, 342-343, 346-347  
 Factor V Leiden 322, 333, 346, 348, 351  
 Factor X 270, 301, 315-316, 320, 325, 328, 334  
 Factor XI 307, 320, 328  
 Factor XII 304, 307, 319-321, 328, 336-337  
 Fanconi (sindrom) 69, 73, 92, 144, 220-222, 309  
 Fenilalanină 92, 100, 107-110, 255, 293  
 Fenilalaninhidroxilază 107, 109, 293-294  
 Fenilcetonurie 92, 108, 109, 221, 293  
 Fenobarbital 65, 272-274, 362, 379, 420  
 Feritină 51, 124, 133-134, 150, 359, 367, 369, 401, 407-408, 410-413, 426, 440  
 Fibrină 136, 166-168, 188, 231-232, 238, 255, 286, 287, 301-304, 308, 315-316, 319, 322-324, 326-328, 334-340, 342-345, 347-348  
 Fibrinogen 128-129, 137, 147, 164, 166, 168, 237, 239, 301, 305, 307, 311, 313  
 Fibrinogenoliză 338  
 Fibrinoliză 127, 266, 301-304, 308-309, 319-320, 322-323, 328, 334-339, 341-346  
 Fibrinopeptid A 322, 340-341, 345  
 Fibrinopeptid B 323  
 Fibronectină 124, 137, 147, 305, 316, 322-324, 335, 339, 342, 347  
 Fibroză chistică 292  
 Fier 133-134, 139, 359, 369, 393, 406-414, 426-427, 431  
 Flux biliar 273, 362, 364, 380  
 Flux plasmatic renal 208, 210  
 Flux sanguin renal 208-210, 240, 246  
 Folați 93, 101-102, 106, 108, 377, 427-428  
 Fosfatază acidă 71, 264, 266, 275-276, 286, 288-289

Fosfatază acidă prostatică 275, 289  
 Fosfatază alcalină 54, 62, 64, 67, 69-71, 131, 144-145, 221, 246, 256, 263, 265-266, 276, 281, 286-288  
 Fosfați 16, 37, 40, 44, 53-54, 56, 58, 60-63, 65, 67, 69-74  
 Fosfatidilinozitol 267, 431  
 Fosfoinozitol 21, 432  
 Fosfolipază C 17, 21, 267  
 Fosfolipide 3, 42, 71, 104, 254, 260, 263, 270, 296, 305, 307, 318, 320, 322, 325  
 Fosforilare 71, 102, 210, 259-260, 264, 267, 268-270, 372, 436  
 Fosforilază 267, 268, 270  
 Fosforilazokinază 267

**G**

Galactoză 155, 212, 359, 371, 372  
 Gastrină 61, 66, 203  
 Genom 293  
 GGT ( $\gamma$ -glutamil-transferaza) 228, 275-276, 278, 288-289, 292, 366, 368  
 Gilbert (sindrom) 273, 366, 377, 379, 381-384  
 Glicină 83-84, 88-89, 91, 94, 100, 102, 104, 371, 395, 414  
 Glicogen sintetază 268, 270  
 Glicohemoglobină 394  
 Glicoliză 71, 262, 264, 436  
 Glicoliză anaerobă 35, 45, 210, 359, 371  
 Glicoproteină Ia (GplA) 305-306, 311  
 Glicoproteină Ib (Gplb) 305-306, 311-313  
 Glicorahie 188-189, 201  
 Globuline 57, 122, 124, 126-127, 130, 132-133, 135-136, 138, 140, 142-148, 160, 162, 164-168, 177, 180, 183, 185, 189, 191-193, 209, 223, 225-227, 238-239, 247, 290, 305, 321, 329, 336, 338, 342, 348, 359-360, 366, 369-370, 383, 409, 417, 438  
 Glomerulonefrită acută 33, 219, 232, 237, 240  
 Glucagon 65, 203, 268, 270  
 Glucokinază 269, 270  
 Glutamat decarboxilază 296  
 Glutamină 43, 97, 98, 115-116, 323, 371

GMP (guanozin monofosfat) 125  
 Gonadotrofină corionică umană (hCG) 286, 418  
 Granule dense 305-307, 311

## H

Haptoglobină 128-130, 134-135, 137, 162, 192, 229, 376, 440  
 HDL 106, 138, 339, 359, 371  
 HDL3 138  
 HDL-C 371  
 HEM 425, 427  
 Hematurie 33, 224, 229, 231-232, 237, 243, 245, 308  
 Hemocromatoză 134, 292, 366, 369, 411, 413, 421  
 Hemodializă 33, 56, 67, 77, 243, 348, 427  
 Hemofilie A 312, 327, 345, 352  
 Hemofilie B 327, 345  
 Hemoglobină 4, 23, 37, 39, 40-41, 47, 71, 124, 133, 135, 188, 206, 215, 224, 231, 254, 373, 376, 387, 389-390, 392-394, 397-398, 400-407, 411, 412, 414, 418  
 Hemoglobină glicozilată 394, 402  
 Hemoglobinopatie 382, 397-398, 400-402, 404-406, 440  
 Hemoglobinurie 229, 309, 347, 439, 440  
 Hemoliză 76, 135, 162-163, 229, 278, 344, 367, 376, 378, 382, 394, 400, 412, 417, 426, 434, 438-440  
 Hemosiderină 134, 196, 407, 408  
 Hemosideroză 406, 411, 413  
 Hemostază primară 301, 303, 313  
 Heparansulfat 303, 329  
 Heparine 136, 302-303, 305, 309, 319, 324-326, 329-330, 345, 348-349  
 Heparine fracționate 348  
 Hepatită acută 91, 278, 280, 382  
 Hepatită cronică 64, 143, 370, 379, 383  
 Heteroproteine 124, 387  
 Hexokinază 253, 437  
 Hidrogen 2, 4, 10, 83, 119, 153, 172, 257  
 High molecular weight kininogen (HMWK) 302, 307, 316, 320-321, 336-337  
 Hipercalcemie 58, 61, 66-69, 72-73, 77, 144,

247, 287  
 Hiperfenilalaninemie 92, 109  
 Hipergamaglobulinemie 143  
 Hiperglicemie 26, 212  
 Hiperglicinemie 94, 102  
 Hiperlipoproteinemie 324, 347  
 Hipernatremie 10, 25  
 Hiperparatiroidism 64-65, 67-70, 73, 78, 239, 244, 287, 343  
 Hiperpotasemie 29, 33, 239  
 Hipertermie malignă 279, 283  
 Hipertiroidism 68, 74, 77, 219, 312, 322  
 Hipertrigliceridemie 23, 26, 274, 289, 339  
 Hiperventilație 25, 46-48, 50  
 Hipoalbuminemie 25-26, 63-65, 131-132, 146, 149, 162, 246  
 Hipocalcemie 51, 59, 63-66, 76, 239, 241-243  
 Hipofiză 21, 113  
 Hipofosfatazie 278, 288  
 Hipofosfatemie 60, 64, 67, 72-73, 287, 439  
 Hipokaliemie 10, 28, 32, 49, 75  
 Hipomagneziemie 65-66, 76-77  
 Hiponatremie 26-28  
 Hipoparatiroidism 63, 74, 79  
 Hipotalamus 20-21, 113  
 Hipotiroidism 25, 278-279, 288  
 Hipovolemie 21-24, 28, 32, 222, 240, 246  
 Histidină 39, 84, 95, 100, 114-115, 123, 131, 212, 295, 388, 393, 400  
 Histidinemie 93, 114  
 Histone 124  
 HLA 125, 140, 413  
 HMG-CoA reductază 262, 270  
 Holoproteine 124  
 Homocisteină 89, 93, 105-107, 428, 431  
 Homocistinurie 90, 93, 105, 107  
 Hormon antidiuretic 18-21, 207  
 Hormon de creștere 72

## I

Icter obstructiv 368, 384  
 IGF (insulin-like growth factor) 63  
 Imunoglobuline A (IgA) 142-145, 165, 225, 237-238, 290, 345, 360, 366, 370, 438  
 Imunoglobuline D (IgD) 142-143

Imunoglobuline E (IgE) 142-145, 238  
 Imunoglobuline G (IgG) 142-143, 145, 147, 165, 225, 238, 345, 366  
 Imunoglobuline M (IgM) 142-143, 147, 165, 238, 345, 366, 370, 438  
 Index de selectivitate al proteinuriei 226, 227  
 Inducere de enzime 292  
 Inductori 269, 272, 274, 362  
 Infarct miocardic acut 136-137, 229, 240, 278-281, 323, 411  
 Inhibitori alosterici 261-262  
 Inhibitori competitivi 261-262  
 Inhibitori de proteaze 127, 130, 263, 321, 336  
 Inhibitori necompetitivi 261-262  
 Inhibitorul căii extrinseci 330  
 Inhibitorul proteinei Z 331  
 Inozitol trifosfat 125, 306  
 INR 325, 349, 350  
 Insuficiență renală acută 24, 29, 33, 240, 245  
 Insuficiență renală cronică 47, 65, 216, 221, 242-243, 343  
 Insulină 29, 33, 46, 49, 56, 72-73, 130, 189, 203, 244, 269-270, 336, 339  
 Izoenzima CK-BB 266  
 Izoenzimă CK-MB 266, 279  
 Izoenzimă CK-MM 266, 279-280, 282, 289  
 Izoenzime 71, 103, 265, 278, 283, 286, 288, 290-291, 368  
 Izoenzime LDH 210, 265-278, 280, 284, 289, 366  
 Izoleucină 93, 100, 115-117, 220, 295-296

## K

Ka 37  
 Katal 256  
 KIM-1 (Kidney Injury Molecule - 1) 227-228

## L

Lactat 40  
 Lactat dehidrogenază (LDH) 126, 210, 229, 252, 256, 265, 275, 278, 280-286, 358, 366-368, 431, 435, 440  
 Lacună anionică 8, 40, 78

LCAT (Lecitin Colesterol Acil Transferază) 126, 130, 274, 276  
 LCR (Lichid Cefalorahidian) 94, 102, 128, 187-189, 191-196, 198, 200, 293, 295  
 LDL-Colesterol 106, 113, 318, 339, 380  
 Legătură de hidrogen 2, 11, 119, 123, 155  
 Leucemie 73, 143, 145, 166, 198, 200, 238, 263, 285-287, 309-312, 337, 339-342, 347, 411, 426  
 Leucină 93, 100, 115-117, 220, 234, 295-296  
 Lichid extracelular 20, 24, 35-36, 43, 49, 60, 71-73, 275  
 Lichid intracelular 8, 15  
 Ligază 253, 259  
 Limfom 68, 73, 143, 238, 278, 286, 309, 336, 411  
 Lipază 65, 275, 289-292, 362  
 Lipoproteină (a) 239, 324, 335  
 Lipoproteine 124, 128, 147, 162, 164, 191, 225, 239, 342, 359, 371, 380  
 Lipoproteinlipază (LPL) 126, 130  
 Litiază 66, 78, 219, 221-222, 230, 234, 244, 248  
 Litiază biliară 289-290, 364, 419  
 Lizină 91, 95, 104-105, 212, 255, 323, 335, 337, 407  
 Lupus Eritematos Diseminat (LED) 143, 145, 167, 193, 230, 237, 263, 377

## M

Macroamilazemie 278, 290-291  
 Macroelemente 1  
 Macrofage 54, 68, 127, 133-134, 136-198, 205, 276, 322, 324, 335, 342, 348, 365, 408, 411, 413-414, 438  
 Macroglobulinemie Waldenström 143, 144, 147  
 Magneziu 9, 53-54, 62-63, 74-77, 79, 206, 234-235, 245, 260, 372  
 Malabsorbție 73, 76, 132, 343, 363, 375, 427  
 Malnutriție 63, 90, 132, 162-163, 375-376  
 May-Grünwald-Giemsa 195, 234  
 Melanom malign 200  
 Melatonină 113, 114  
 Metastaze osoase 278, 286, 288-289

Methemoglobină 376, 393-394  
 Metionină 91-93, 100-102, 105-107, 110, 428  
 Metodă Ivy 313-314  
 Microelemente 1  
 Mielom multiplu 68-69, 143-145, 148, 166, 194, 224, 238, 246, 288  
 Mioglobină 124, 129, 224, 229, 283, 387, 389-391, 407  
 Mioglobinurie 229, 437  
 Monoiodtirozină 111

## N

NAD<sup>+</sup> 96, 102, 113, 259, 437  
 NADP<sup>+</sup> 96, 259, 437  
 Natriu *vezi* Sodiu  
 Nefelometrie 182-183, 224  
 Nefrotic (sindrom) 26, 63, 132, 136, 145, 147, 163-164, 231-234, 238-239, 278, 312, 324, 330-333, 342, 347  
 Neoplazie endocrină multiplă 66  
 Neuroblastom 411  
 Nucleotide 71, 305, 434

## O

Obezitate 56, 278, 312, 347, 349, 364  
 Oligoclonale 143, 193, 194, 367  
 Oligoelemente 1, 260, 359  
 Ornitină 91, 98, 104-105, 115  
 Osmolalitate 12-13, 21, 26, 33  
 Osmolaritate 11, 16, 21, 26, 31, 213-214, 222-223, 240-243  
 Osteoblaste 54-56, 62-64, 67, 286-287  
 Osteoclaste 54-55, 60-61, 68-71  
 Osteomalacie 61, 64-65, 79, 221, 273, 380  
 Osteoporoză 57, 69-70, 273, 288, 380  
 Osteoprotegerină 54-55, 60  
 Oxidoreducere 259-260  
 Oxigenarea hemoglobinei 41, 389-391  
 Oxihemoglobină 41, 47, 389, 392-393, 436

## P

PAI-1 308, 336, 339, 342-344, 346-347  
 PAI-2 337, 340  
 PAI-3 337

Pancreatită 64-66, 77, 137, 278-292, 364-365, 368  
 Pancreatită acută 289  
 Pancreatită cronică 291  
 Paraproteine 144-145, 147-148, 183  
 Parathormon 59-60, 67, 73, 75  
 PDGF (platelet-derived growth factor) 305, 341  
 Pepsină 136, 257, 267  
 Pepsinogen 267, 275-276  
 Peptid natriuretic de tip B (BNP) 19  
 Peptid natriuretic de tip C (CNP) 19  
 Peptidul natriuretic atrial 19, 210  
 Perete vascular 57, 301, 303-306, 310, 316, 324, 341, 343  
 Peroxidază 103, 373, 408, 435  
 Piropoikilocitoză 433  
 Piurie 229-230, 237  
 PIVKA (protein induced by vitamin K absence or antagonism) 318, 331, 343, 349  
 pKa 37-41, 391  
 Plachete sangvine 301, 303, 305, 307-308, 310, 313-314, 316, 340, 343, 348, 403  
 Plasmină 135, 254, 267, 270, 302-303, 320, 329, 335, 337, 339, 345  
 Plasminogen 130, 135-136, 239, 267, 270, 302-303, 308, 320, 328, 335-339, 341-343  
 Plasmocitom 143  
 Pleiocitoză 198  
 Porfirie 273, 394-397  
 Precursori inactivi 267  
 Presiunea efectivă de filtrare 13, 208  
 Presiune coloid-osmotică 13-14, 126  
 Presiune hidrostatică 11, 13-16, 26, 216, 223  
 Procalcitonină 129, 137-138, 149  
 Prolină 84, 89, 91, 94, 95, 100, 114-115, 221  
 Prostaciclina 307  
 Prostaciclina sintetază 307  
 Proteaze serinice dependente de vitamina K 253, 316, 318  
 Proteină C 147, 302, 331-333, 347  
 Proteină C activată 302, 322, 332-333, 337, 346, 348, 351  
 Proteină C reactivă 128, 130, 137, 239, 318  
 Proteină S 302, 331-333, 342, 351

Proteină S100 194  
 Proteină Z 302, 331  
 Proteine de fază acută 136-137, 160, 162, 322, 359, 411  
 Proteine G 17, 21, 268, 306  
 Proteine plasmatice 39, 126-129, 311, 335, 348  
 Proteinkinază A 21  
 Proteinkinaze 267-268  
 Proteinorahie 128, 189, 193, 201  
 Proteinurie 126, 128-129, 132, 144, 163, 217, 223-229, 237-239, 241, 243, 245  
 Proteinurie Bence-Jones 145, 228  
 Proteinurie mixtă 228  
 Proteinurie prerenală 126, 129, 224  
 Proteinurie tubulară 227, 229  
 Proteoliză limitată 254, 267-268, 270, 315, 318, 319-320, 323  
 Proteom 124  
 Protoni 16, 27, 28, 35, 36, 40-44, 46, 49, 57, 88, 124, 259  
 Protrombină 128, 253, 254, 260, 267, 274, 301, 316, 318-322, 325, 328, 333, 343, 345-346, 348-349, 359, 369  
 PSA *vezi* Antigen specific prostatic  
 Pseudocolinesterază 358  
 Pseudohipoparatiroidism 64  
 Punct crioscopic 12, 16  
 Punct ebulioscopic 12  
 Purpură 304, 308-309, 312, 333, 346, 352, 439

**R**

RAA (Sistemul renină-angiotensină-aldosteron) 203, 209, 240  
 Radicali liberi 106-107, 387  
 Rahitism 59-61, 64, 69, 221, 273, 287-288  
 Rata filtrării glomerulare 65, 74, 209-211, 214-218, 220, 224, 227, 240, 241-244  
 Raynaud (sindrom) 144  
 Reacție osteoblastică 70, 278, 287-288  
 Receptor celular al transferinei 133  
 Receptor endotelial al proteinei C (EPCR) 331-332  
 Renină 17, 19, 23, 130, 203, 207, 209-210  
 Represie 269-271, 395

Rh 416-418  
 Ristocetină 312-315  
 Ristocetin cofactor 313, 315  
 RMN 193, 247

## S

S100 *vezi* Proteină S100  
 Salting out 122  
 Săruri biliare 104, 361, 364  
 Scorbut 109, 304  
 Secretină 61, 291  
 Sediment neorganizat 230, 234  
 Sediment organizat 230  
 Selectivitate 171, 174, 225-227  
 Serină 100, 101, 104-105, 127, 253-254, 267, 318, 393  
 Serotonină 109, 113-114, 293, 295, 297, 303  
 Sferocitoză 377, 431-433, 440  
 Sindrom carcinoid 113-114, 295  
 Sindrom Crigler-Najjar 273, 377, 379, 381-382  
 Sindrom hemoragipar 308, 352  
 Sindrom mielodisplazic 284-285, 308-310  
 Sindrom Rotor 377, 381  
 Sindrom Segawa 295  
 Sistem al oxidoreductazelor microsomale cu funcții mixte 272  
 Sistem microsomal de hidroxilare a medicamentelor 272  
 Sistem reticulo-endotelial (SRE) 135, 365, 373, 409, 414  
 Sodiu 10, 16-19, 21-30, 50, 66, 157, 209, 234, 268, 314, 362, 371, 402  
 Specificitate 89, 135, 138, 140, 178, 185, 242, 254-255, 366, 368, 370  
 Stercobilină 374, 416  
 Streptokinază 263, 336  
 Stypven (test) 325, 328  
 Sulfhemoglobină 394

**T**

Talasemie 377, 401-402, 405-407, 413-414  
 Tamm-Horsfall (proteina urinară) 223  
 Tampon (sistem) 36-40, 44-45, 154, 203, 393  
 Tau (proteina) 195  
 Teste de agregare plachetară 314

Tetrahidrobiopterină (BH4) 106, 113, 293-294  
TGF (transforming growth factor) 68, 341  
Timp de înjumătățire 17, 18, 22, 129, 132, 134, 135, 137, 276, 335  
Timp de ocluzie 314  
Timp de reptilază 326  
Timp de sângerare 310, 313-314, 327, 328  
Timp de trombină 326, 328  
Timp de tromboplastină parțial activată 325  
Timp Quick 325, 349, 369, 383  
Tireotxicoză 61, 65  
Tiroglobulină 111, 112  
Tiroidă 59, 61, 66-67, 69, 70, 72, 75, 78, 109, 111-112, 131, 138, 220, 362  
Tiroxină 111, 128, 274, 349  
Tirozină 91, 95, 100, 107-111, 228, 234, 255, 400  
Tirozinemie 92, 109, 110, 397  
Tirozinhidroxilază 293, 294  
Tonicitate 12  
Transaminare 88, 95-97, 99, 104, 114-115, 117, 210, 295-296  
Transaminază 95-96, 110, 115-116, 147, 252, 256, 296, 366-368, 383, 422  
Transferină 128, 133-134, 137, 139, 147, 191-192, 223-225, 227-228, 238, 366, 401, 409-413  
Transudat 128, 376  
Treonină 95, 100-101, 104, 127-267  
Trigliceride 239, 257, 274, 359, 362, 366, 367, 371  
Triiodtironină 111  
Triptofan 84, 100, 112-114, 131, 269, 293  
Trombocitemii 289, 308, 310, 341  
Trombocitopatii 309  
Trombocitopenie 308-309, 313, 346, 349, 352  
Trombomodulină 302-303, 311, 319, 331, 332, 337, 344  
Tromboplastină tisulară 318  
Trombopoetină 305

Tromboxan A2 303, 307, 308

Tropomiozină 283

Troponină T 283

Tub contort distal 16, 28, 42, 207

Tub contort proximal 16, 19, 27, 42, 204, 205

Turbidimetrie 182

## U

UMP (uridin monofosfat) 428, 430

Uree 12, 23, 36, 98, 214, 218-219, 242

Uree plasmatică 218, 240

Uree urinară 240

Urobilinogen 237, 247-248, 374, 383, 406, 416, 440

Urokinază 302, 335, 338, 341-342

## V

Valină 84, 93, 100, 107, 115-117, 220, 295-296, 390, 393, 398, 407

Vasoconstricție 66, 209-210, 240, 301, 303

VEM 425-426, 431, 433

Vitamină B1 259

Vitamină B6 76, 95, 106, 113, 259-260

Vitamină B12 93-94, 117

Vitamină C 92, 109, 206, 413

Vitamină D 58-62, 64, 67-69, 71, 73-75, 239, 244, 287-288, 359, 380

Vitamină K 147, 253, 262, 302, 316, 318, 331-333, 340-343, 349, 369, 383, 436

Vitamină PP 113-114, 221, 259

VLDL 113, 359, 371

von Willebrand (factor) 301, 304, 308, 310-313, 315-316, 322, 324, 340, 342-343, 347

## Z

Zimogeni 254, 267-268, 301, 318

Zone alosterice 253

