

Metabolismul nucleotidelor

Digestia și absorbția nucleotidelor

Acizii nucleici, RNA și DNA nutriționali sunt supuși modificărilor în tractul gastro-intestinal. *Ribonucleazele* și *dezoxiribo-nucleazele* secretate de pancreas vor scinda polinucleotidele pînă la oligonucleotide. Fosfodiesterazele pancreatice vor conduce la formarea 3'- și 5'-mononucleotide. În continuare, *nucleotidazele* vor hidroliza fosfatul, generînd nucleozide. Ultimele pot fi absorbite în celulele intestinale sau scindate de *nucleozidaze* la bazele respective. Purinele și pirimidinele alimentare nu sunt utilizate în sinteza acizilor nucleici tisulari. Purinele în celulele mucoasei intestinale sunt transformate în acid uric, eliminat apoi din circulație prin urină. În metabolizarea bazelor purinice e implicată și flora intestinală. Pirimidinele, riboza (dezoxiriboza) și o parte din purine pătrund în circulația sanguină (fig.6.29).

Metabolismul general al organismului trebuie să asigure existența unui fond, elucidînd cantitatea și varietatea de nucleotide necesare pentru participarea la procesele esențiale. Acest fond se realizează prin: sinteza de novo, interconversia nucleotidelor, conversia parțială a ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide.

Biosinteza de novo a nucleotidelor purinice

Inelul purinic are ca precursori mai multe substanțe (fig 6.30).

Utilizarea de precursori, marcați cu ^{15}N și ^{14}C a stabilit originea fiecărui atom din

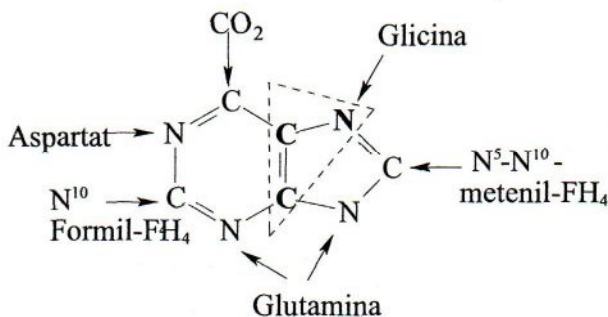


Figura 6.30. Sursa de atomi pentru inelul purinic

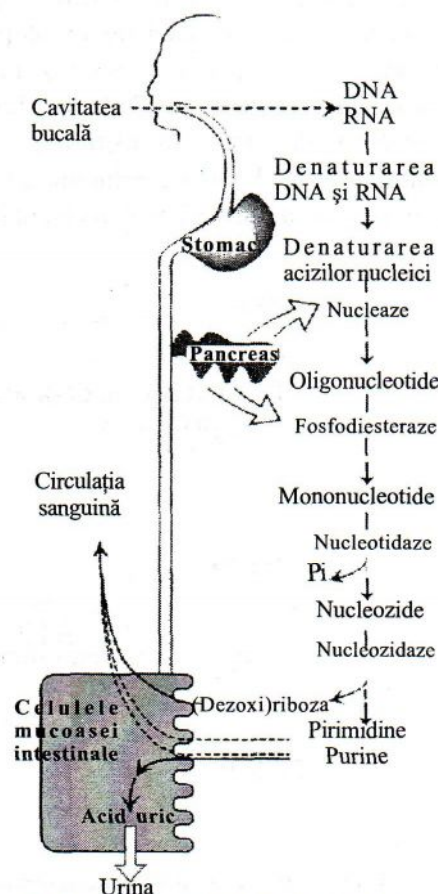


Figura 6.29. Digestia și absorbția nucleotidelor

acest nucleu. Prima reacție constă în activarea ribozil-5-fosfatului cu ATP catalizată de *PRPP sintetază*. Produsul format 5-PR - α - 1-PPi este un compus-cheie în metabolismul nucleotidelor, fiind precursor și la sinteza triptofanului și histidinei (fig. 6.31).

Etapa-cheie în sinteză decurge în stadiul următor, finalizînd cu formarea 5-fosforibozil-aminei.

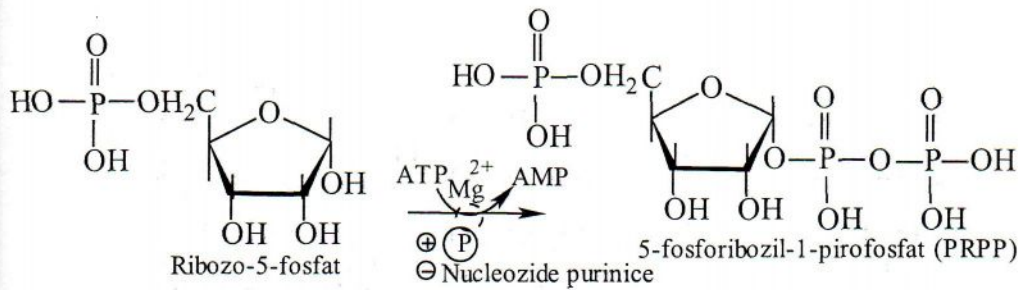
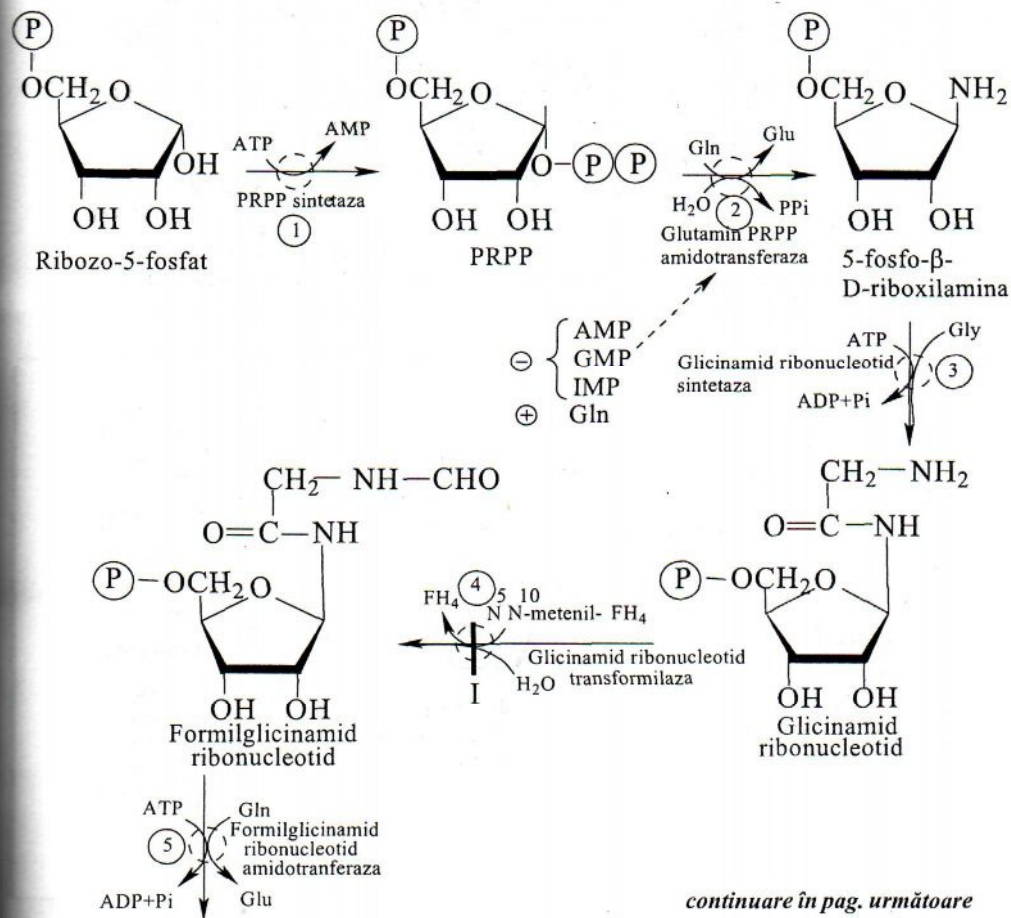


Figura 6.31. Sinteza PRPP și reglarea enzimei

Enzima, amidofosforibzil-transferaza este al 2-lea punct de control al secvenței. Forța motrice a procesului este hidroliza pirofosfatului. *Glutamin amidotransferaza* poate fi inhibată de analogii structurali ai glutaminei ca: *azaserina* și *acivicina*, ultima este un agent chemoterapeutic în tratamentul cancerului (fig.6.32).

Urmează condensarea glicinei (ATP), metenil-FH₄, glutaminei (ATP), ATP, CO₂, aspartatul (ATP), formil-FH₄, cu sinteza acidului inozinic sau *inozinmonofosfat*. Sinteza necesită 6 P, ioni de Mg²⁺, K⁺, secvența este exergonică și ireversibilă (fig.6.32).



continuare în pag. următoare

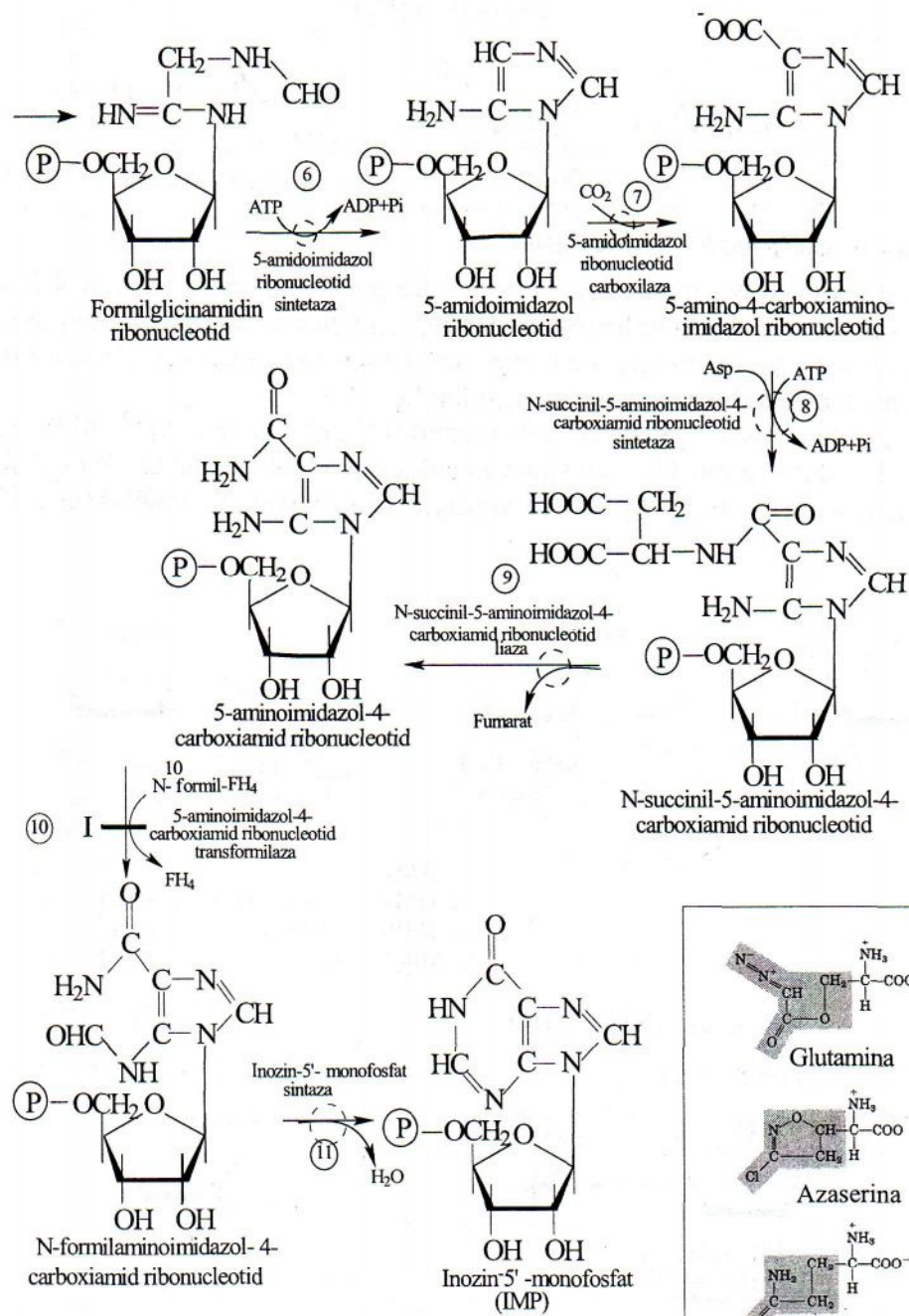


Figura 6.32. Biosinteza de novo a IMP

Procesul de sinteză este modificat de acțiunea unor preparate medicamentoase cum sunt analogii acidului *p*-aminobenzoic (APAB) și acidului folic. Sulfonamidele, analogi după structură cu APAB, competitiv inhibă sinteza de acid folic la bacterii. Întrucât sinteza purinelor necesită FH_4 în calitate de coenzimă, preparatele date reduc această cale în bacterii. În corpul omenesc acidul folic nu se sintetizează și, deci, este nevoie de sursă externă. De aceea, sulfonamidele, nu împiedică sinteza purinelor la om.

Metotrexatul și compușii analogi inhibă reacția de reducere a dihidrofolatului în tetrafolat (vezi fig.6.32, etapele I). Ele limitează cantitatea de FH_4 necesar sintezei purinelor și, astfel, diminuează replicarea DNA în celulele mamiferelor. Acești compuși sunt utilizați în terapia cancerului care se dezvoltă rapid, însă sunt toxici pentru toate celulele care divizează. Analogii structurali ai purinelor (acicloguanozina-*aciclovir*) sunt folosiți în tratamentul infecțiilor herpetice. Acești antimetaboliți sunt fosforilați de enzimele celulare sau virale, rezultând derivați activi, care blochează specific DNA-polimerazele virale.

IMP este, mai departe, convertit în AMP și GMP conform schemei din figura 6.33. Consumarea diferitor surse de energie oferă posibilitatea controlului reciproc al sintezei nucleotidelor cu adenină și guanină.

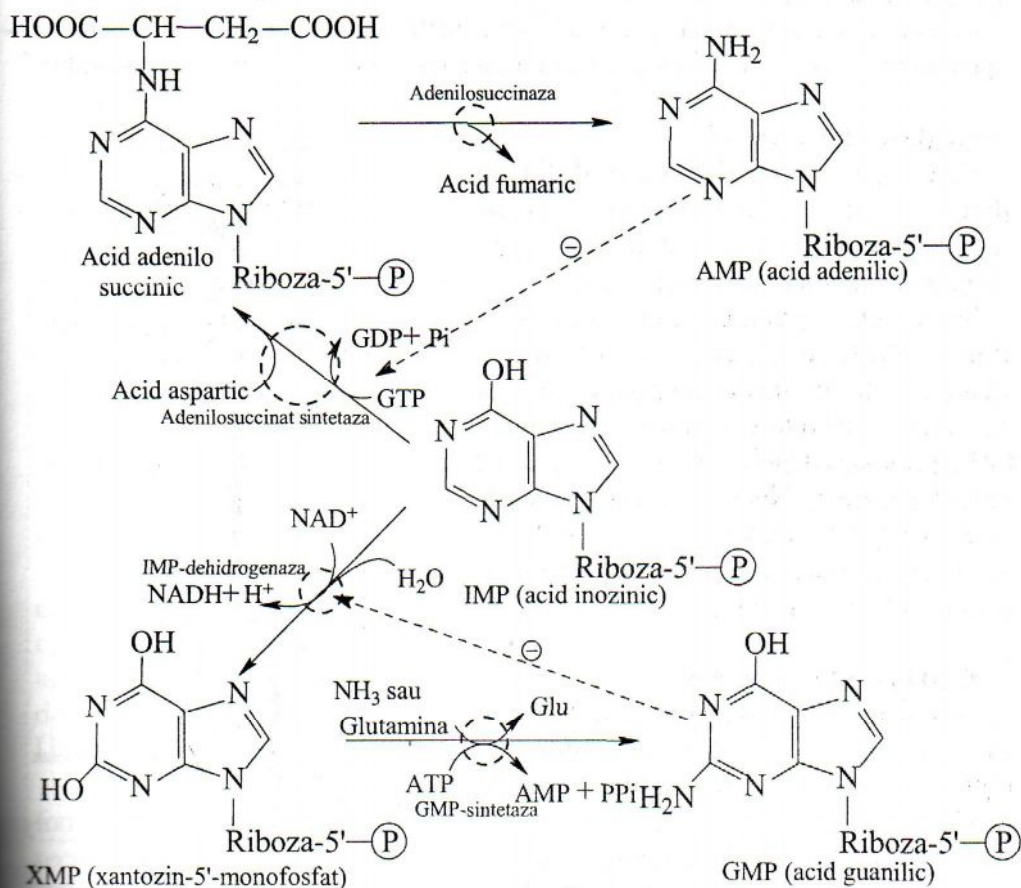
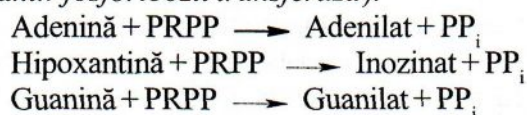


Figura 6.33. Conversia IMP în AMP și GMP și reglarea acestor reacții

Reutilizarea purinelor

La hidroliza acizilor nucleici, nucleozidelor se formează baze purinice libere, care pot fi utilizate pentru sinteză. Împreună cu cele sintetizate de novo, alcătuiesc un fond metabolic comun accesibil tuturor celulelor. Sinteza din produse finite (reîncorporarea, reutilizarea) este mai eficace, mai ieftină pentru celule, mai ales în celulele cu o mare viteză de creștere, de regenerare (embrionul, tumorile, reproducerea). La prima etapă are loc condensarea bazei purinice cu PRPP și crearea directă a ribonucleotidului, reacție catalizată de *fosforibozil transferaze*. Există o enzimă specifică pentru adenină (APRT) — *adenin-fosforibozil transferaza* și alta pentru guanină și hipoxantină (HGPRT-*hipoxantin-guanin-fosforibozil transferaza*).



O transformare la care sunt supuse purinele libere sau derivații lor este dezaminarea, prin care o funcție NH_2 este înlocuită cu una oxigenată. Reacția poate avea loc la nivel de nucleotid, nucleozid sau bază purinică. Dezaminarea AMP la IMP, sub acțiunea *AMP dezaminazei*, este calea cea mai probabilă de metabolizare a AMP.

Guanin dezaminaza (guanaza) transformă guanina \longrightarrow xantină, și inozina \longrightarrow hipoxantină. La mamifere lipsește enzima care transformă adenina în hipoxantină.

Reglarea biosintezei

Un mecanism asigură cantitatea de IMP și altul — repartizarea lui între AMP și GMP. Transformarea lor în trifosfați este dependentă de sarcina energetică celulară (fig.6.34).

Nucleotidele acționează ca efectori negativi asupra — PRPP sintetazei, amidofosfo-ribozil transferazei, forma monomerică fiind activă, iar dimerică — inactivă. Creșterea concentrației PRPP provoacă depolimerizarea asociată, cu activarea enzimei. Nucleozidele acționează în mod invers, drept activator servește glutamina. Aici se mai înregistrează un control pozitiv reciproc din partea ATP și GTP.

Catabolismul purinelor

Bazele purinice endogene sau exogene, care n-au fost încorporate în nucleotide, sunt transformate în acid uric și eliminate pe cale renală.

Nucleotidele pot fi transformate în nucleozide prin hidroliză, catalizată de 5'-*nucleotidaze*.

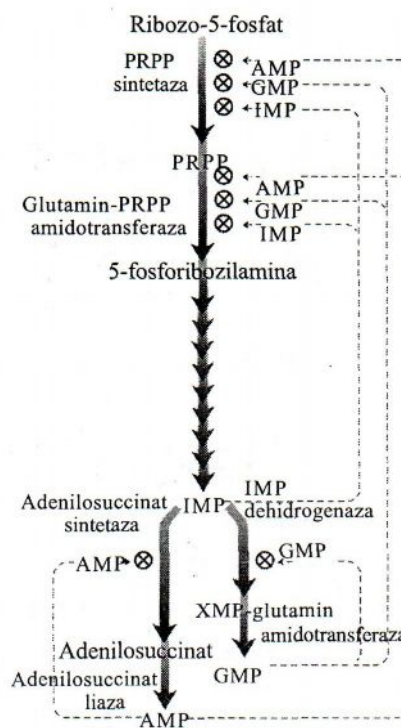
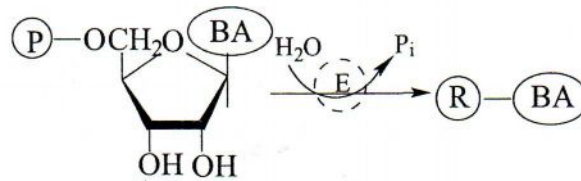


Figura 6.34. Reglarea biosintezei nucleotidelor purinice



Nucleozidele sunt scindate la baze printr-o reacție fosforolitică, catalizată de o nucleozid fosforilază (E_1), cu formarea R-1-P care poate fi izomerizat sub acțiunea fosforibozil mutazei (E_2) în R-5-P, substrat pentru sinteza PRPP.



Degradarea nucleotidelor pînă la produsele finale este redată în figura 6.35.

Acidul uric se formează din hipoxantină și din xantină prin oxidare, cu participarea *xantin oxidazei*. Enzima e o flavoproteidă dimeră, ce conține molibden și Fe^{++} .

Păsările și reptilele elimină acid uric, păstrînd apa în organism, deoarece cristalele lui se elimină cu o minimă cantitate de apă. Ureea leagă cantități mari de apă. Aceste specii ce elimină acidul uric sunt numite uricotelice față de ureotelice (elimină uree). Degradarea ulterioară a acidului uric este redată în fig.6.36.

Acidul uric este un compus greu solubil în apă, pe cînd monouratul de sodiu este ceva mai solubil. Pe măsură ce procesul de acidifiere a urinei progresează, uratul trece în acid uric. La un $pH = 5,75$ uratul și acidul uric coexistă în cantități egale, iar la $pH < 5$ predomină acidul uric mai puțin solubil. În 24 ore excreția constituie 400-600 mg.

Acidul uric este o substanță ușor oxidabilă și, prin capacitatea sa de a capta radicali liberi, este un factor protector contra agresiunii oxidante continue la care sunt expuse majoritatea țesuturilor organismului.

Patologia metabolismului purinelor

Sunt depistate unele patologii în catabolismul nucleotidelor.

Deficitul *adenozil deaminazei* cauzează imunodeficiență severă și combinată, ce conduce la disfuncția T și B-celulelor, creșterea enormă de dATP în eritrocite, ce este inhibitorul ribonucleozid reductazei și, respectiv, inhibă sinteza DNA. Copiii cu acest deficit, de obicei, decedeză pînă la doi ani.

O altă patologie este deficitul de *purin nucleozid fosforilază* ce duce la disfuncția celulelor T fără efect vădit asupra funcției celulelor B. Scade sinteza de acid uric combinată cu creșterea nucleozidelor și nucleotidelor purinice. dGTP este nucleotidul major care se acumulează în eritrocite. El stimulează reducerea ADP la dADP care este convertit în dATP — inhibitor al ribonucleozid reductazei. De asemenea, dGTP inhibă reducerea UDP și CDP.

Guta este patologie ce se caracterizează prin hiperuricemie. *Guta* primară este o formă a bolii care apare în rezultatul unei erori înnăscute a metabolismului. *Hiperuricemia secundară* poate fi cauzată de alte maladii, cum ar fi cancerul, insuficiență renală cronică, stări hipercatabolice, traumatisme, radio-sau chimioterapie, infecții cronice, acidoza metabolică.

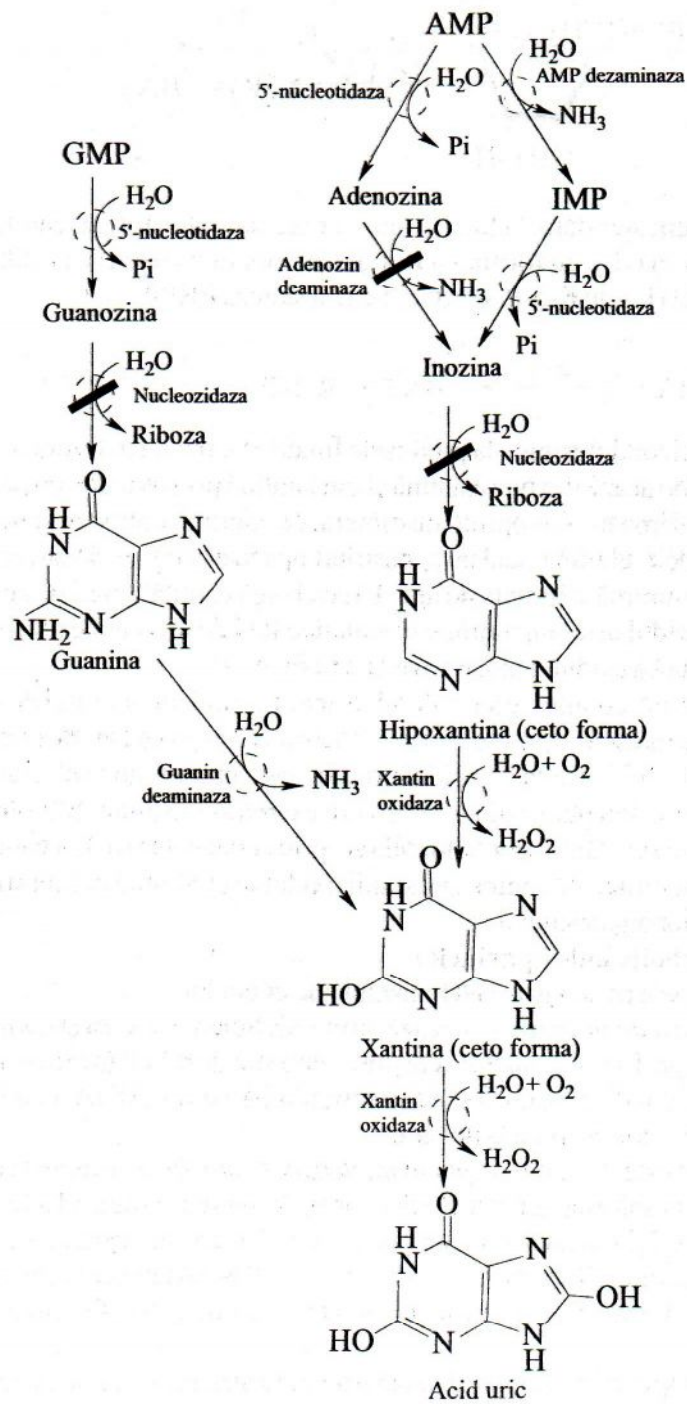


Figura 6.35. Degradarea nucleotidelor purinice. Defectele genetice și asociate cu această cale

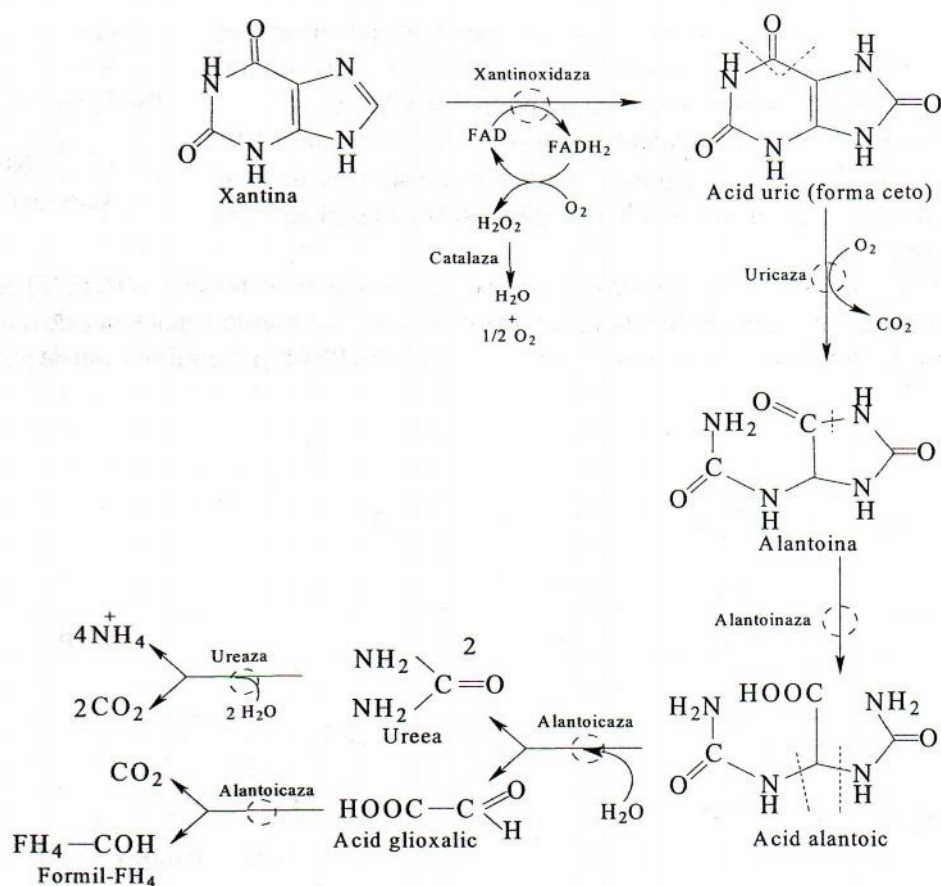


Figura 6.36. Catabolismul nucleotidelor purinice: formarea acidului uric și degradarea ulterioară

Hiperuricemia — cauza gutei, maladie manifestată clinic prin dureri artritice episodice sau cronice, nefrolitiază și depozite de acid uric în țesuturile moi. Creșterea concentrației uratului în sânge și în lichidele interstițiale, depășirea pragului de solubilitate determină precipitarea uratului monosodic, apoi declanșarea reacției inflamatorii de cristale de urat, cu formarea calculilor la nivel renal. Suferă mai des bărbații. Mecanismele sunt complexe — este remarcată o diminuare a activității *hipoxantin - guanin - fosforibozil transferazei* — enzima ce catalizează sinteza IMP și GMP din produse de rezervă. În consecință, are loc sporirea cantității de PRPP. La bolnavi se observă și o activizare susținută a *PRPP-sintetazei*, dată fiind dereglarea ei alosterică. Se mărește conținutul PRPP. Se instalează și o deficiență de *G-6-fosfatază*, ce împiedică eliberarea glucozei și G-6-P, pompată pe calea pentozo-fosfaților cu producerea, în exces, a ribozo-5-P, materie primă pentru sinteza PRPP.

Hiperuricemiile sunt corectate prin administrarea de *alopurinol*—analog al hipoxantinei. *Alopurinolul*, fiind substrat pentru xantin oxidază, conduce la formarea aloxantinei care devine inhibitorul enzimei, fixat rigid în centrul ei activ, unde molibdenul rămâne +4 și nu se reoxidează pînă la +6, ca în ciclul catalitic normal. Hipoxantina și xantina sunt secretate drept cataboliți finali ai purinelor și, fiind mai solubile, nu se depun în țesuturi.

Efectul inhibitor al alopurinolului e dependent și de reacția cu PRPP. O dată cu sinteza ribonucleotidelor, se micșorează concentrația PRPP ce limitează sinteza purinelor de novo.

Alopurinolribonucleotidul format stopează transformarea PRPP în fosforibozilamină, sub acțiunea amido-PR-transferazei. În final, concentrația acidului uric scade complet — formarea calculilor se stopează.

Lipsa completă a hipoxantin-guanin-fosforibozil transferazei (HGPRT) are consecințe nefaste pentru funcționarea organismului — se pierde capacitatea de reutilizare a bazelor purinice. Ca urmare, crește concentrația PRPP și ritmul sintezei de novo (fig 6.37).

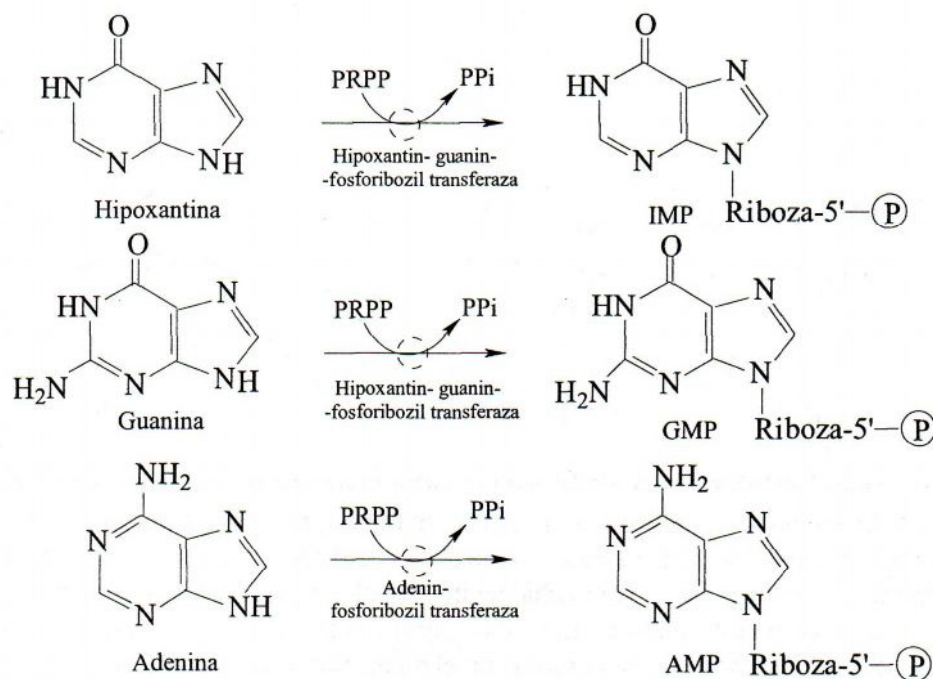


Figura 6.37. Căile de sinteză a nucleotidelor purinice

Gena defectă e situată pe cromozomul X și deficitul se manifestă numai la bărbați. Creșterea concentrației de acid uric inițial conduce la formarea calculilor — *sindromul Lesch-Nyhan*, la care copiii au tendința de a-și distruge corpul, suferă de insuficiență mintală, convulsii. Creierul, posibil, e foarte dependent de sinteza purinelor din produsele finite. În condiții normale, activitatea HGPRT în creier este mai intensă, pe când activitatea amidotransferazei e mai redusă. În organismul acestor bolnavi alopurinolul nu se transformă în ribonucleotid și nu micșorează concentrația de PRPP. Sinteza de novo nu e inhibată. Concentrația acidului uric efectiv scade după alopurinol. Toate acestea confirmă: calea de sinteză a nucleotidelor din produse finite nu e un lux pentru organism, dar o necesitate deocamdată puțin identificată.

Metabolismul nucleotidelor pirimidinice

Bazele pirimidinice sunt sintetizate din precursori simpli, aminoacizi și CO_2 . Aici primordial se formează inelul, apoi adăuga fosforibozilului, cu crearea pirimidin-nucleotidei. Donator e același compus PRPP. Biosinteza de novo este inhibată atât de nucleotide pirimidinice, cât și de cele purinice. La pirimidine funcționează mecanisme eficiente de reutilizare a nucleozidelor, dar nu a bazelor.

Biosinteza de novo

Primul metabolit — *carbamoil-fosfatul* — este comun și pentru ureogeneza ce se sintetizează în mitocondrii, în cazul pirimidinelor — în citozol. Enzimele utilizează surse diferite de azot - NH_3 — ureogeneza și glutamina — în pirimidinogeneza. Enzimele sunt distincte (2-carbamoil-fosfat sintetaze). Consecutivitatea reacțiilor e reprodusă în fig. 6.38.

Reacția-cheie e catalizată de *aspartat transcarbamoilază* cu sinteza N-carbamoil-aspartat, apoi are loc ciclizarea lui, cu eliminarea H_2O . Enzima dihidroorotaza catalizează formarea acidului dihidroorotic, după care *dehidrogenaza NADd* formează acidul orotic. Transferul restului P-ribozil de la PRPP, grație unei transferaze succedată de decarboxilarea acidului orotidilic, finalizează ciclul de reacții, formându-se UMP.

Enzimele 1-3 și 5-6 au o localizare citozolică și numai E_4 — mitocondrială. Enzimele citozolice formează 2 complexe multienzimatice. Primul complex duce la sinteza (1-3) acidului dihidroorotic, care difuzează în mitocondrii, unde este dehidrogenat de E_4 (pe membrana internă), apoi produsul trece în citozol, unde este supus acțiunii complexului multienzimatic următor (5-6). Enzimele în complexe se sintetizează în cantități echimolare. La deficiența de *OMP-decarboxilază* și *orotat-fosfo-ribozil transferaza*, care prezintă domenii separate ale aceluiași polipeptid, apare *orotataciduria*. Boala debutează timpuriu și se caracterizează prin creșterea anormală, anemie megaloblastică și excreție excesivă de orotat în urină. Dieta bogată în uridină ameliorează anemia și diminuează eliminarea orotatului. Administrarea uridinei, a citidinei care sunt convertite în derivații respectivi reia diviziunea celulară și ameliorează situația. UTP sintetizat stopează sinteza acidului orotic (efect inhibitor asupra carbamoil-fosfat sintetazei).

De la UMP, prin fosforilare, se obțin celelalte nucleotide pirimidinice grație enzimelor E_1 -nucleozidmonofosfo kinaza și E_2 -nucleoziddifosfo kinaza:



CTP se obține din UTP conform reacției:



Enzima ce catalizează această reacție e CTP-sintetază.

Sinteza dezoxiribonucleotidelor are loc prin reducerea ribonucleotidelor la 2' a difosfaților. Electronii sunt transferați pe substrat prin SH grupe. Tioredoxina reprezintă o proteină mică. Enzima - *tioredoxin reductaza* - e o flavoproteină ce reduce tioredoxina. Enzima — *ribonucleotid reductaza*, pentru activitate, necesită vit. B_1 , vit. B_2 , Mg^{2+} (fig.6.39).

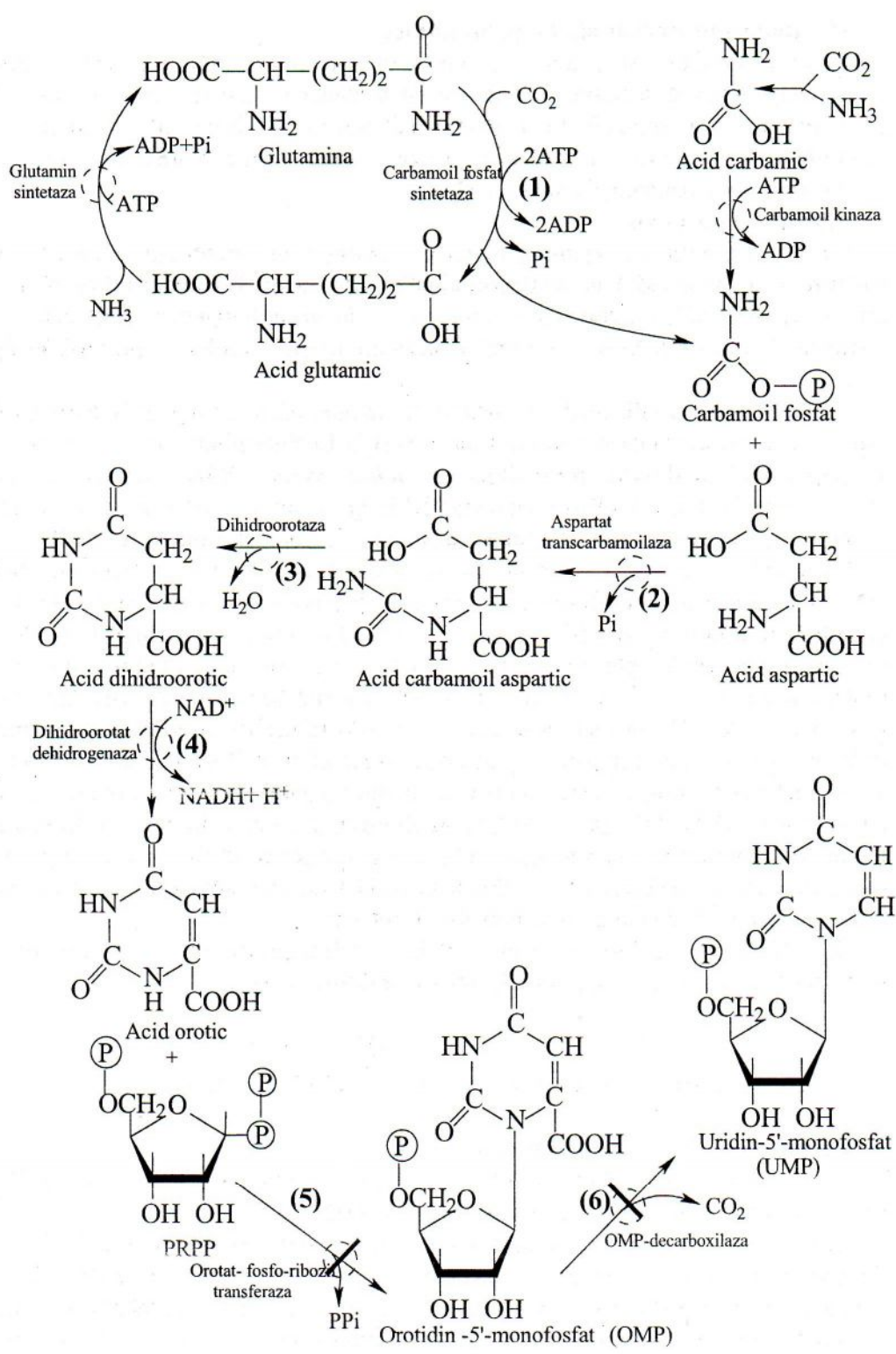


Figura 6.36. Sinteza pirimidinelor și unele defecție metabolice

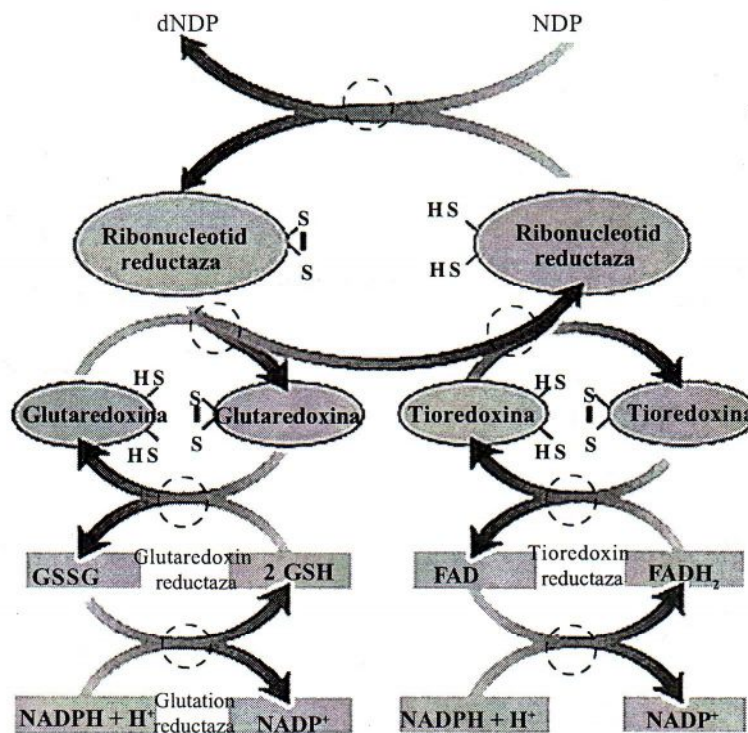


Figura 6.39. Reducerea ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide

Ea constă din două subunități R_1 și R_2 : R_1 are locusuri de fixare a substraturilor ribonucleice, efectorilor alosterici, conține grupe SH, donatori de electroni la reducerea restului ribozil; R_2 e o proteină ce conține Fe și S, participând la formarea unui radical liber al restului de tirozină, funcționează în ansamblu. Reglarea enzimei e redată în fig. 6.40.

În structura DNA e prezentă și timina, analog metilat al uracilului. Cum se sintetizează acest dezoxiribonucleotid?

Se metilează dezoxiribonucleozid monofosfatul (dUMP). Enzima e timidilat sintază. Donator de CH_3 servește tetrahidrofolatul și nu S-adenozil metionina. $-N^5, N^{10}$ -metilen- FH_4 , cedînd grupa CH_3 , se oxidează la dihidrofolat - FH_2 , pierzînd H_2 necesari pentru formarea grupei CH_3 .

Regenerarea FH_2 are loc sub acțiunea enzimei dihidrofolat reductazei, utilizînd NADPH (fig. 6.41).

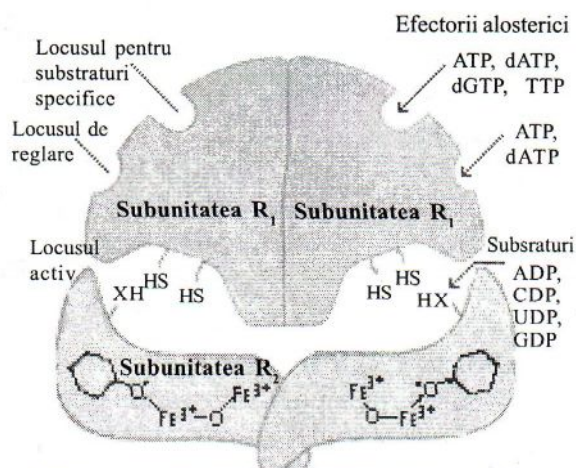


Figura 6.40. Structura și reglarea ribonucleotid reductazei

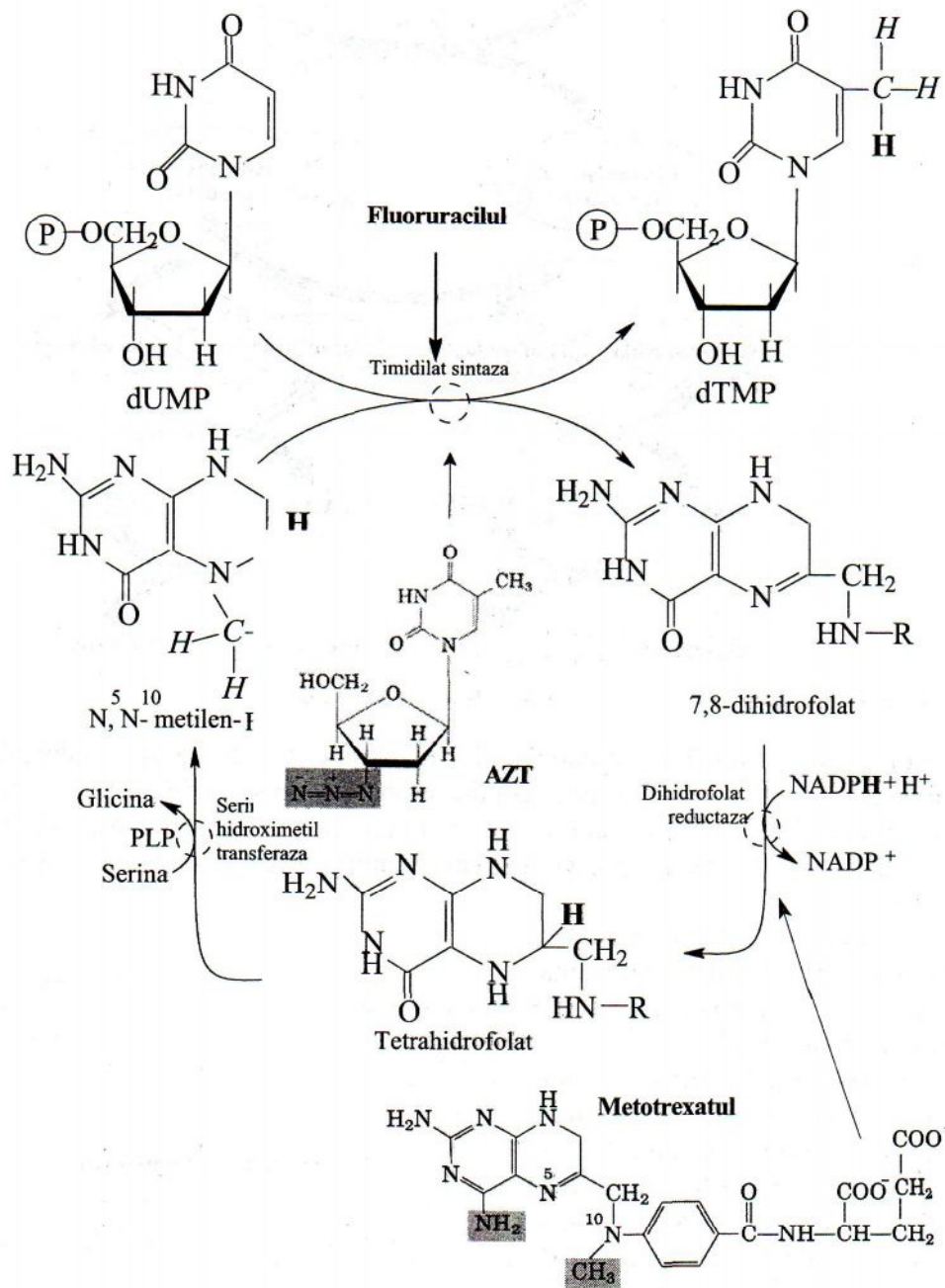


Figura 6.41. Sinteza TMP

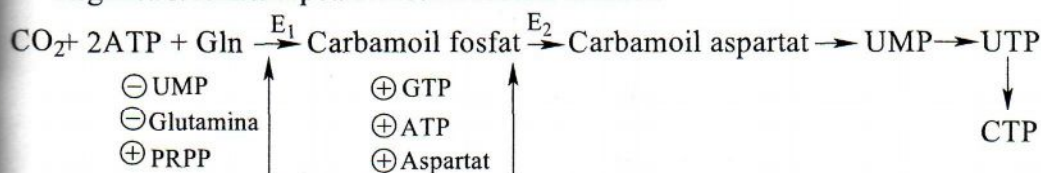
Țesuturile în diviziune, unde are loc o sinteză rapidă de TMP, sunt foarte sensibile la inhibiția *dihidrofolat reductazei*. De aceea, în chimioterapia cancerului ca factor de inhibiție poate fi folosită și timidilat sintaza. *Fluoruracilul* (analog al uracilului) ireversibil inhibă timidilat sintaza, formând legături covalente între componentii reactivi și enzimă.

Aminopterina, *ametopterina* (*metotrexatul*) sunt analogi ai acidului folic, inhibitori competitivi ai dihidrofolat reductazei. Împiedică diviziunea celulară și *6-mercaptapurina*, *6-tioguanina*. Un analog structural al nucleotidelor pirimidice este *azidotimidina* (*AZT*), utilizată în tratamentul infecțiilor cu virusul imunodeficienței umane.

Reglarea metabolismului pirimidinic

Reglarea este fină, alosterică. dATP inhibă reducerea sa și stimulează reducerea pirimidinelor – dUDP, dCDP. TTP frânează reducerea pirimidinelor și stimulează reducerea purinelor.

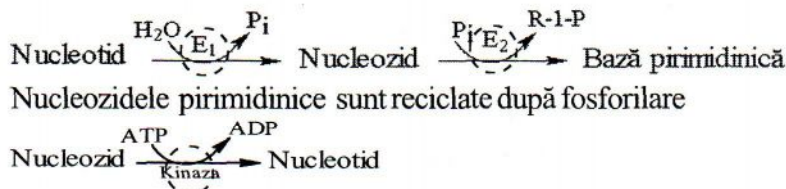
Reglarea biosintezei poate fi redată în felul următor:



Aspartat transcarbamoilaza (*ATS-E₂*) reprezintă o enzimă compusă din două subunități – catalitică și reglatoare. Activarea ATS de către ATP are în consecință: 1) echilibrarea vitezei de sinteză a nucleotidelor purinice și pirimidinice; 2) semnalează prezența ATP-lui în concentrații suficiente ca substrat pentru sinteza pirimidin nucleotidelor (UMP și carbamoil fosfatului). Sistemul de reglare e destul de complicat, dar asigură sinteza unor cantități echilibrate ale tuturor celor 4 dezoxiribonucleotide. Evident că ribonucleotid reductaza posedă stări conformaționale cu diferite proprietăți catalitice.

Reutilizarea și catabolismul nucleotidelor pirimidinice

Fondul metabolic al acestor compuși include compuși sintetizați de novo și cei eliberați din acizii nucleici celulari. Ca și în cazul purinelor, acizii nucleici exogeni nu contribuie la formarea acestui fond. În metabolismul pirimidinelor au loc reacții similare cu cele descrise la purine.



O kinază acceptă ca substrat uridina și citidina, iar alta – timidina. La purine această cale metabolică este de mică importanță, însăși adenzina fiind fosforilată în ATP. Bazele pirimidinice nu sunt reutilizate, ci degradate în compuși cu moleculă mică (fig 6.42). β -alanina și acidul β -amino-izobutiric sunt excretați sau catabolizați în căile respective.

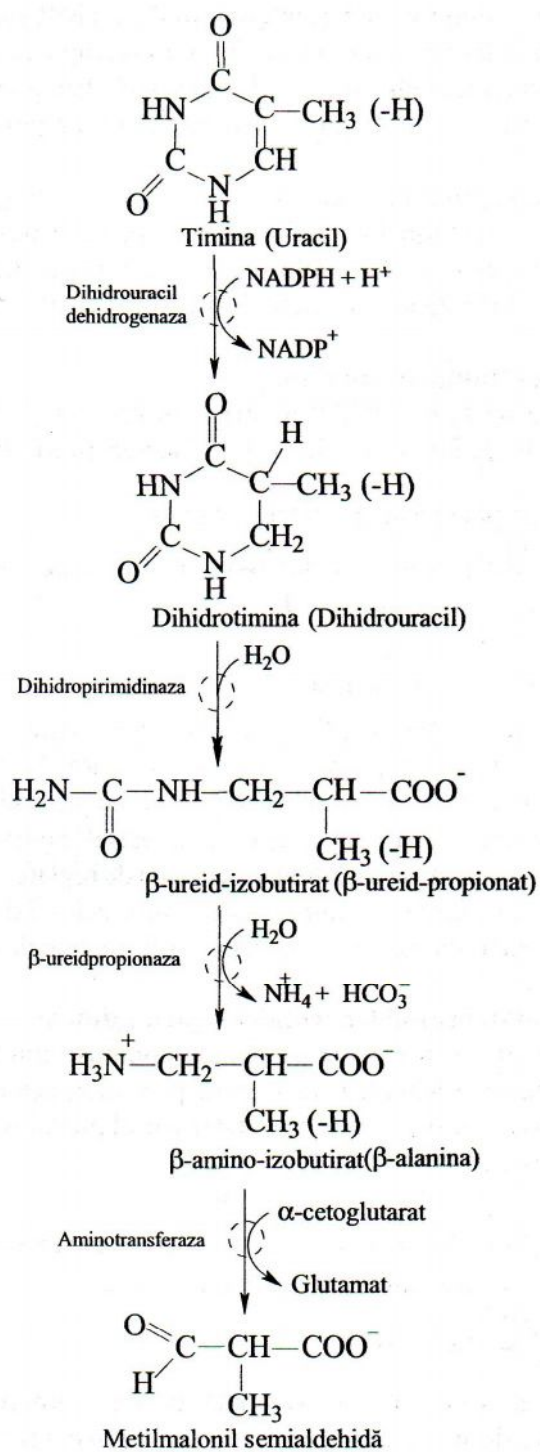


Figura 6.42. Catabolismul pirimidinelor

Metabolismul cromoproteidelor

Structura hemoglobinei. Reprezintă proteine complexe, avînd ca constituenți o proteină simplă și un component neproteic — ionii metalici ai unor heterocicluri diverse, dintre care cei mai importanți sunt hemul — hemoproteidele cu derivații săi: *hemoglobina (Hb)*, *mioglobina*, *sistemul citocromic*, *catalaza*, *peroxidaza* și *eritrocruorinele* — proteine situate în sîngele și țesuturile unor nevertebrate. O proteină fieroporfirinică este și *triptofan pirolaza*.

O etapă semnificativă a evoluției a fost trecerea de la existența anaerobă la cea aerobă, cu surse bogate de energie. În prezența O_2 , la scindarea glucozei, se formează de 18 ori mai multă energie decît în lipsa acesteia. Evolutiv, s-au format două mecanisme ce asigură aprovizionarea permanentă a celulelor cu cantități suficiente de O_2 . Un mecanism primordial care asigură celulele cu O_2 , este circulația sanguină. Dacă n-ar exista acest sistem, organismele aerobe n-ar depăși 1 mm, fiindcă difuzia O_2 la distanțe mari s-ar produce foarte încet și n-ar satisface cerințele celulelor. Un alt mecanism adaptiv este apariția, în timpul evoluției, a unor molecule transmițătoare de oxigen, care permit ocolirea limitei cauzate de solubilitatea mică a O_2 în apă. Drept transportator servește hemo- și mioglobina. Datorită Hb, crește capacitatea sîngelui de a transporta O_2 de la 5 mL la 250 mL O_2 la un litru de sînge.

Hemoglobina participă la transportul CO_2 și a H^+ , totodată menținînd echilibrul acido-bazic. Mioglobina mușchilor are funcție de depozitare a O_2 și facilitează transportul lui în acest țesut. Capacitatea dată este determinată de prezența unei grupe prostetice numită **hem**, care explică culoarea roșie a acestor proteine. Hemul e compus dintr-o parte organică și atomul de fier. Complexul organic conține protoporfina formată din patru grupe pirol legate prin punți metinice ($-CH=$), formînd un inel tetrapirolic. Acest inel atașează patru grupe CH_3 , două grupe vinil ($-CH=CH_2$) și două catene propionice ($-CH_2-CH_2-COOH$). Eventual, sunt posibile 15 variante de aranjare în spațiu a acestor substituenți. Sistemele biologice conțin numai un izomer — *protoporfirina IX* (fig. 6.43). În centrul acestui inel atomul de Fe e atașat cu patru atomi de azot. Fierul formează încă două legături coordonatoare (V și VI) cu azotul din histidina V (directă), cu un rest de histidină proximală și VI (indirectă) — histidină distală. Atomul de Fe în hem poate exista în fieroformă (Fe^{2+}) și fieriformă (Fe^{3+}) sau *methemoglobină*. De menționat că numai fieroforma poate adăuga O_2 .

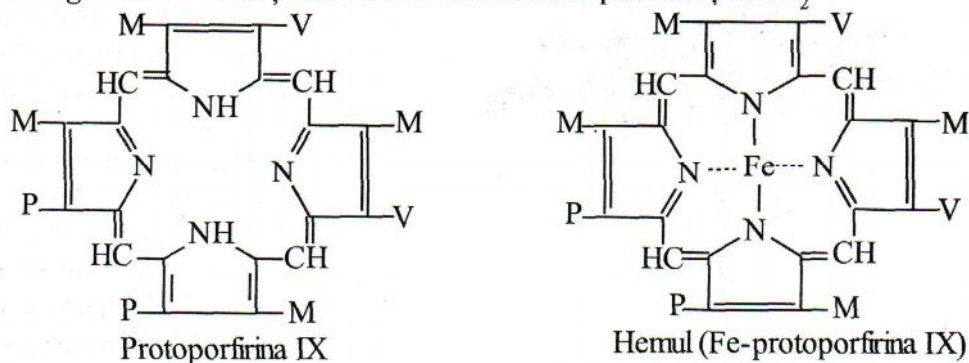


Figura 6.43. Structura protoporfirinei și a hemului (M-metil, P-propionil, V-vinil)

E stabilită structura tridimensională a mioglobinei (J.Kendrew), precum și a hemoglobinei (M.Perutz). Molecula mioglobinei are o structură foarte compactă. În interiorul ei de fapt nu există cavități, în schimb conține un singur lanț polipeptidic, 75% al căruia include α -spirală cu 8 segmente de bază răsucite spre dreapta.

Între segmentele spiralate se intercalează 5 segmente nespiralate și câte unul se postează la capetele terminale. Se observă foarte bine partea exterioară și cea interioară a moleculei. Ultima e formată aproape complet din resturi de aminoacizi nepolari; există numai 2 resturi de aminoacizi polari — 2 histidine, ce se localizează în centrul activ și îndeplinesc un rol primordial în activitatea funcțională. Grupa hemului e localizată în adâncitura moleculei de mioglobină. Locusul de fixare a oxigenului în mioglobină e indicat în fig. 6.44.

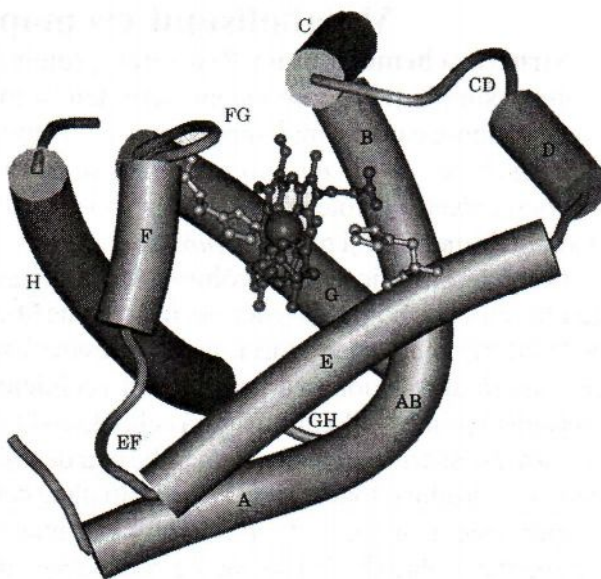


Figura 6.44. Structura mioglobinei

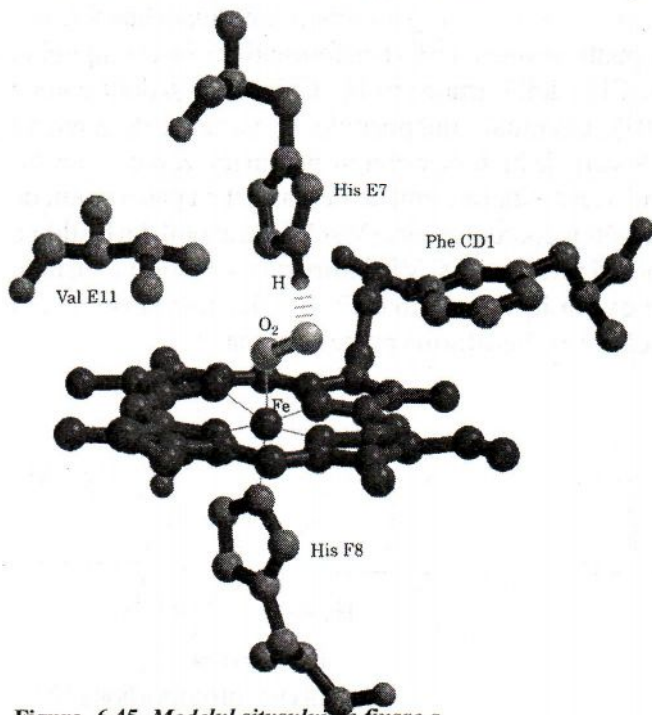


Figura 6.45. Modelul situsului de fixare a oxigenului în hemul mioglobinei

În legătura șase coordonatoare din fierihemoglobină se află apa, în dezoxihemoglobină — e liberă, în oxihemoglobină e ocupată de oxigen. În procesul oxigenării atomul de fier se apropie de planul hemului la 0,2Å. Hemul nu e o structură rigidă. Această deplasare joacă rolul-cheie în activitatea hemoglobinei. Locusul de fixare a hemului are o structură tridimensională (fig. 6.45).

Dacă oxigenul se leagă de hem, atunci care-i rolul componentei proteice în fixarea și transportul oxigenului? Experiențele au demonstrat că în mioglobină se creează un microspațiu al

grupeii prostetice, datorită căreia hemul capătă proprietăți deosebite. E o legitate generală ca funcția grupei prostetice să fie dependentă de anturajul peptidic. Același hem e caracteristic și citocromului C, dar el îndeplinește altă funcție — cea a transferului de electroni, pe când în enzima — catalaza, îi revine o altă funcție.

Care este rolul acestei histidine distale?

Hemul are o afinitate mare la oxidul de carbon, fixarea lui e de 25000 ori mai mare decât a oxigenului, pe când în molecula hemoglobinei afinitatea e numai de 200 ori. Proteinele inhibă acest proces. Cum anume? (fig 6.46).

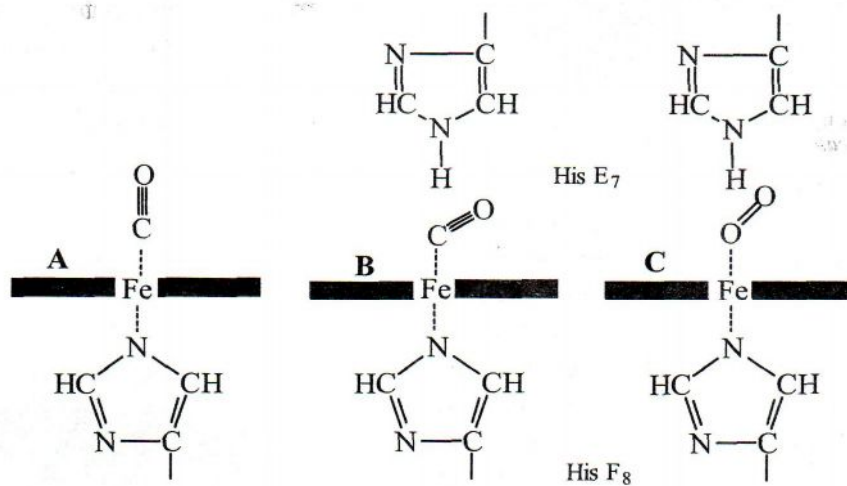


Figura 6.46. Baza structurală a afinității Hb și Mb la CO

Analiza RS și spectroscopia infraroșie a complexului CO și O₂ au confirmat că fieroporfirinele au o afinitate mare la CO. În acest complex atomii de Fe-C sunt situați pe un plan drept (A). În complex cu mioglobina osia CO se găsește sub un unghi către legătura Fe-C, cauzată de prezența histidinei distale (B). Osia O₂ se plasează sub unghi către Fe-O și în oxiHb (C). De aceea, sub influența proteinei, CO se și situează sub un unghi, dar nu pe plan drept. O astfel de geometrie, determinată de globină, slăbește interacțiunea hemului cu CO și, simultan, creează condiții optime pentru fixarea O₂.

Micșorarea afinității la CO are o însemnătate primordială pentru decurgerea diverselor procese biologice, deoarece CO e o primejdie potențială. CO, la scindarea hemului, formează o cantitate ce blochează aproximativ 1% de locusuri de fixare a O₂ în mio- și hemoglobină. E un nivel neînsemnat, dar dacă afinitatea va fi atât de mare la fel ca în fieroporfirinele libere, CO format endogen ar provoca o intoxicație serioasă. Natura a soluționat problema în așa mod, încât în procesul evoluției au apărut proteinele hemocomponente, care, datorită unor factori sterici, slăbesc fixarea CO, nu și a O₂.

Însuși hemul are un efect decisiv asupra structurii mioglobinei, mioglobina fiind mult mai compactă decât apomioglobina — proteină fără hem.

Hemoglobina e compusă din patru lanțuri polipeptidice unite într-o conformație prin legături necovalente, are patru locusuri de fixare a oxigenului (fig. 6.47).

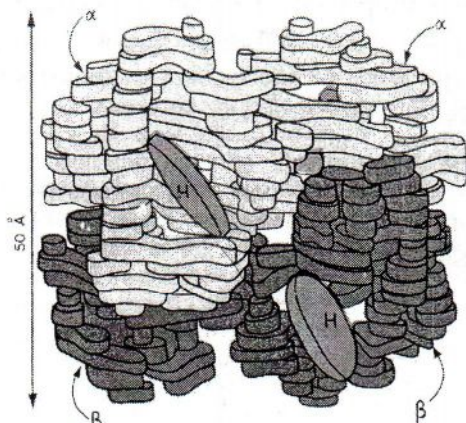


Figura 6.47. Modelul hemoglobinei: catene α și β , H - hemul

Molecula hemoglobinei e aproape sferică, cu diametrul 55Å. Catenele formează un tetraedru, unde fiecare α contactează cu ambele β , pe când contactul dintre α sau β este relativ redus (fig. 6.48).

Structurile spațiale ale mioglobinei, ale α și β catene de hemoglobină au mari afinități, posedând același rol biologic. Sensul configurației constă în crearea unui microspațiu în jurul hemului, care va determina reversibilitatea fixării oxigenului.

La descifrarea secvenței de aminoacizi, la mai mult de 20 de specii de animale s-au constatat deosebiri semnificative. În 9 poziții aceste secvențe conțin aceiași aminoacizi la toate speciile — aminoacizi invariante-conservativi, care au o importanță majoră pentru funcționarea hemoglobinei — locusurile de fixare a O_2 , stabilizarea moleculei etc.

E caracteristică și păstrarea intactă a caracterului nepolar al părții interioare a moleculei (cu modificări în aminoacizii nepolari). Această structură nepolară stabilizează structura spațială. Pe suprafața moleculei aminoacizii sunt extrem de variați.

Hemoglobina. Funcțiile.

1. E o proteină alosterică, pe care oxigenul se fixează cooperativ, adică adăugarea oxigenului la hemoglobină mărește gradul de fixare a celorlalte molecule de oxigen.

2. Afinitatea hemoglobinei la oxigen e dependentă de valorile pH și CO_2 .

3. Afinitatea la oxigen este reglată de compuși fosfați organici — 2,3-difosfoglicerat.

Saturația hemoglobinei cu oxigen e dependentă de presiunea parțială a oxigenului și se exprimă prin curba disociației oxigenului. Curbele pentru mioglobină și hemoglobină sunt prezentate în figura 6.49.

Se disting mai multe tipuri de Hb:

Hb A — hemoglobina de bază a omului matur compusă din 2 lanțuri α și 2 β — $\alpha_2\beta_2$.

Hb A₂ — aproximativ 2% (porțiunea minoră) cu subunitățile sale α_2S_2 .

Hb P — participă la diferite etape ale dezvoltării embrionare — $\alpha_2\varepsilon_2$.

Hb F — $\alpha_2\gamma_2$ reprezintă hemoglobina fetală.

Prin urmare, pentru toate tipurile α catenele e identică și conține 141 resturi de aminoacizi, pe când catenele β , S, γ , ε — 146, cu o secvență aproape similară.

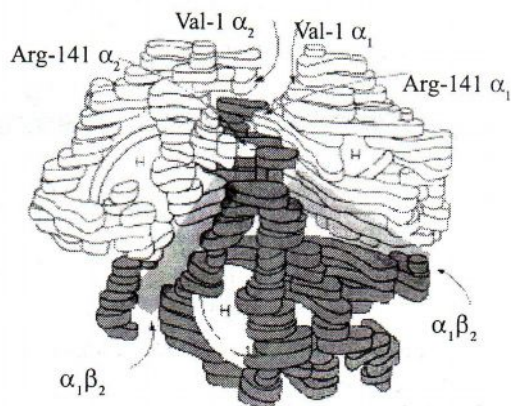


Figura 6.48. Contactele între catenele α și β în molecula hemoglobinei, H - hemul

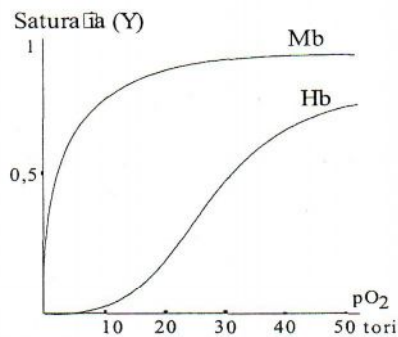


Figura 6.49. Curbele de disociație a oxigenului în hemoglobină și mioglobină

Mioglobina are o afinitate mai mare. Afinitatea se caracterizează prin mărimea P_{50} - egală cu presiunea parțială a O_2 la saturația a 50% din locusurile de fixare ($Y = 0,5$). Pentru Mb $P_{50} = 1$ tor, pentru Hb = 26tor (1tor = 1mmHg).

Curba disociației are pentru Mb formă hiperbolică, pentru Hb — sigmoidală și corespunde rolului fiziologic al celor două globine. La nivel molecular forma sigmoidală demonstrează că fixarea O_2 de Hb este cooperativă. Acest efect de fixare permite accelerarea eliberării O_2 în țesut.

Deplasarea mediului interior spre acid deplasează, la rândul ei, curba disociației spre dreapta, adică afinitatea la O_2 scade, eliberându-se mai ușor O_2 . Sporirea concentrației de CO_2 are același efect, adică majorarea CO_2 și a H^+ în capilarele țesuturilor cu un nivel metabolic activ favorizează eliminarea O_2 din oxihemoglobină (efectul lui Bohr) (fig. 6.50).

În capilarele pulmonare, însă, concentrația majoră a O_2 favorizează eliberarea CO_2 și H^+ din hemoglobină (efectul Haldane John) (fig.6.51).

Afinitatea O_2 la hemoglobina din eritrocite e mult mai mică decât la hemoglobina din soluție. În 1967 s-a stabilit influența asupra afinității O_2 la Hb a 2,3-difosfo-gliceratului (BPG). În eritrocite se află în aceeași concentrație molară ca și în hemoglobină. În lipsa BPG P_{50} pentru Hb e de 1 tor, ca și la mioglobină, în prezența BPG $P_{50} = 26$ tori. BPG reduce afinitatea la O_2 de 26 ori (fig. 6.52).

Care-i mecanismul?

Ațiunează la dezoxihemoglobină, dar nu la oxihemoglobină, fiindcă fixarea O_2 și a BPG simultană, sunt procese contrare. Care-i rolul BPG?

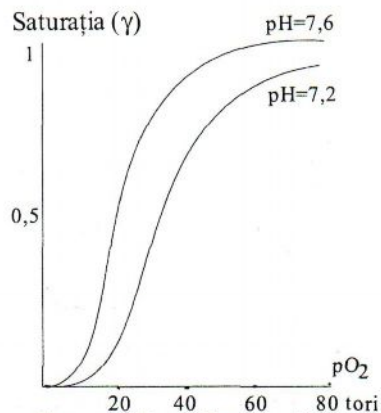


Figura 6.50. Influența pH asupra afinității hemoglobinei la oxigen

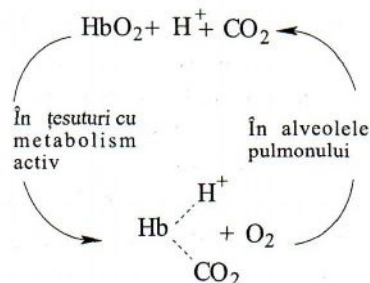


Figura 6.51. Efectul Haldane John

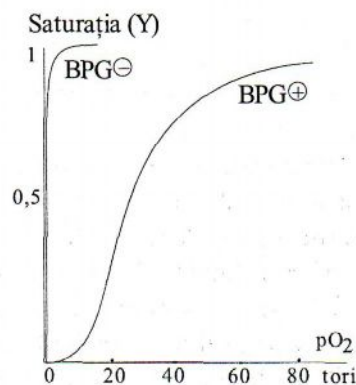
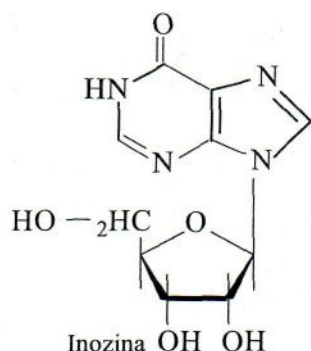


Figura 6.52. Influența BPG asupra afinității Hb la oxigen



Acum câțiva ani, nu era clar din ce cauză în sângele conservat în mediu citrat-dextroză afinitatea la O_2 crește și P_{50} devine 16 (în loc de 26). S-a stabilit că acest fenomen e indispensabil de micșorarea concentrației de BPG de la 4,4 la 0,5 mmol - timp de 10 zile. Fenomenul are un rol decisiv: în patul sanguin eritrocitele fără BPG își restabilesc pe jumătate conținutul timp de 24 ore — termen defavorabil pentru bolnavii aflați în stare gravă. Adaosul BPG nu mărește concentrația lui în eritrocite, cauza fiind sarcina electrică mare. Astfel, compusul nu penetrează membrana celulară. În asemenea cazuri se poate evita scăderea BPG, adăugând inozină. Moleculele ei, fără sarcină, pătrund în eritrocite și, printr-o serie de reacții, se transformă în BPG. În hipoxii (emfizem sau adaptare la înălțimi mari) crește mult nivelul BPG, care constituie un mecanism de adaptare.

Hemoglobina F are o afinitate mare la O_2 , ceea ce creează condiții optime pentru transportul O_2 din sângele mamei în sângele fătului (fig. 6.53). Această Hb fixează slab BPG. Analiza RS a oxii și deoxiHb a demonstrat diferențierea semnificativă după structura lor cuaternară. Ca rezultat atașării O_2 , perechea de subunități α - β își schimbă poziția față de altă pereche cu 15° . Există două tipuri de contacte — α_1 - β_1 și α_1 - β_2 . Modificări structurale serioase sunt proprii celui de-al doilea tip, care se găsește în genele înrudite și e constituit din aminoacizi similari la toate vertebratele. Interacțiunea hem-hem e scăzută la mutațiile ce intră în acest contact.

În deoxihemoglobină atomul de Fe iese din planul hemului cu $0,6\text{\AA}$ ca rezultat al respingerii sterice ce apare între histidina proximală și atomii de N ai inelului porfirinic (fig. 6.54).

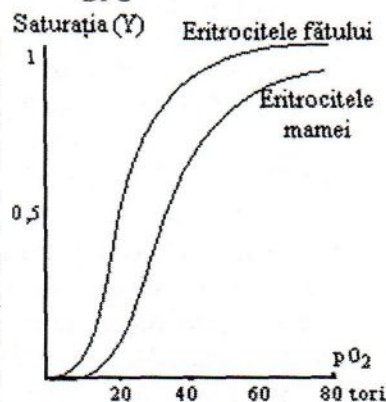
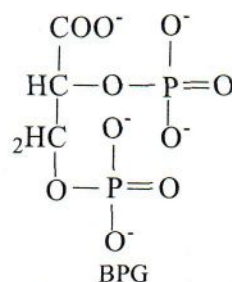


Figura 6.53. Curbele afinității eritrocitelor mamei și fătului la O_2

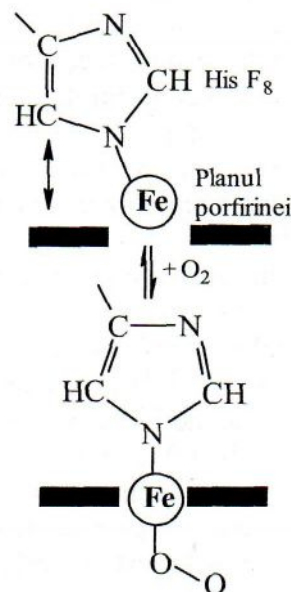


Figura 6.54. Modificările poziției Fe în deoxihemoglobină

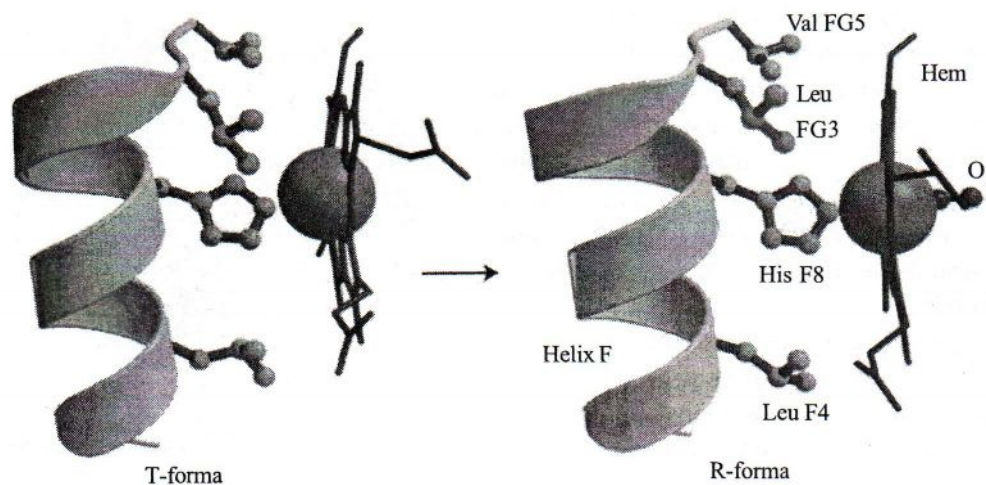


Figura 6.55. Transformările conformaționale ale hemului la oxigenare

La oxigenare, Fe se deplasează în planul porfirinei, formînd legături cu O_2 , și are loc transformarea structurii cuaternare din forma T în R (fig. 6.55). Rolul primordial îl joacă catena laterală a histidinei proximale, pe care o atrage după ea deplasarea atomului de Fe (fig. 1.12). Hemul și histidina proximală contactează cu catenele laterale ale 15 aminoacizi și de aceea la oxigenare structura se modifică spre forma R. Modificările structurale din interiorul unei subunități conduce, însă, la schimbări structurale în regiunea contactelor celorlalte subunități și ale întregii molecule (fig 6.56).

Dezoxihemoglobina are o structură rigidă amplificată de 8 legături saline între cele 4 subunități (fig. 6.57). Fixarea O_2 poate avea loc numai atunci cînd ruperea unor legături va permite atomului de Fe să se deplaseze în planul hemului. Cîte legături trebuie să se rupă pentru a adăuna o moleculă de O_2 ? Depinde de clasare — 1-4. Pentru fixarea primei molecule de O_2 e necesară desfacerea mai multor legături, comparativ cu fixarea celorlalte. Adăunarea a două - trei molecule ocupă o poziție intermediară între 1 și 4.

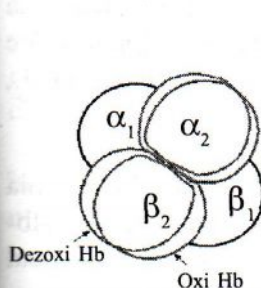


Figura 6.56. Schematic sunt redată modificările în structura cuaternară a Hb la oxigenare

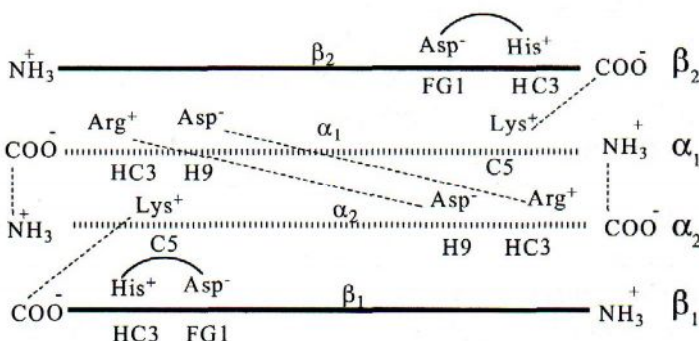


Figura 6.57. Legăturile transversale între subunități în dezoxihemoglobină

O moleculă de BPG se fixează cu un tetramer de globulină. Locusul de fixare e format din resturile cu sarcină pozitivă ale catenelor β (lizină, histidină) (fig. 6.58, fig. 6.59). El e conglomeratul alcătuit din 6 grupe cu sarcina (+) ale β catenei. O fixare mai slabă a BPG cu hemoglobina fătului se datorează prezenței serinei în loc de histidină.

La oxigenare, BPG se detașează din cauza cavității centrale prea mici pentru el. BPG micșorează afinitatea la O_2 , formînd legături încrucișate cu β -catenă, astfel stabilizînd structura cuaternară a Hb (T). Cu alte cuvinte, se creează legături auxiliare saline ce trebuie rupte și, în final, afinitatea Hb la O_2 , în procesul adității BPG, se reduce.

La organisme aerobe, la o moleculă de O_2 utilizată se formează 0,8 mol CO_2 . Majoritatea lui este transportată prin sînge sub formă de bicarbonați, ce se formează în eritrocite sub acțiunea carbanhidrazei.



O parte din CO_2 este transportată de hemoglobină în formă de carbonat, adîtionîndu-se la grupa NH_2 ale celor patru catene.

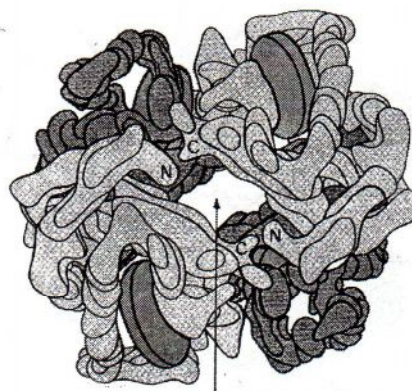


Aceste legături saline stabilizează forma T, de aceea adîția CO_2 micșorează afinitatea hemoglobinei la oxigen.

Hemoglobina fixează la o moleculă eliberată de CO_2 aproximativ 0,5 molecule de H^+ . Unde anume se fixează H^+ ? La moleculele de histidină care au o afinitate mare la H^+ în ambele β catene. Hidrogenul, la fel ca BPG, micșorează afinitatea la O_2 , stabilizînd T forma de hemoglobină.

Patologia moleculară a hemoglobinei

Spre deosebire de Hb-A (Hb omului adult), există și Hb patologice. La anemia falciformă se înregistrează Hb-S — primul exemplu de boală moleculară descris. Hb-S se caracterizează prin prezența în β catenă (în poziția 6, la capătul N terminal), în locul acidului glutamic, a valinei, la care se diminuează solubilitatea hemoglobinei deoxigenate. Solubilitatea Hb S oxigenate nu se modifică. Această schimbare conduce la apariția unui fragment capabil de agregare. După eliberarea O_2 , are loc o transformare conformațională, cu apariția la suprafață a acestor zone ce conduc la agregarea mole-



Locul de fixare a BPG

Figura 6.58. Fixarea BPG în molecula deoxiHb

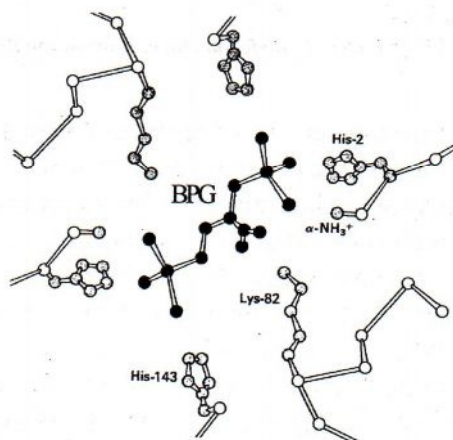


Figura 6.59. Interacțiunea BPG cu trei grupe încărcate pozitiv în β catene

culelor de Hb, la care se formează agregate mari, lungi, simultan deformînd eritrocitul, care capătă o formă drepanocitară. Cinetica formării fibrelor de dezoxihemoglobină are o importanță primordială, căci de ea depinde configurația adevărată a eritrocitului care trece prin capilare (timp de 1 secundă). Procesul depinde de concentrația Hb-S. Scăderea concentrației de 2 ori (la heterozigote) micșorează viteza de formare a fibrelor de 1000 ori. Organismele hetero- sunt rezistente la malarie, nu atestă anemie drepanocitară — caz tipic de polimorfism balansat adaptabil.

Sunt remarcate mai mult de 100 de Hb defectate, fără influență sau cu efect nociv. Se diferențiază cîteva tipuri de anomalii ale Hb:

a) substituirile în partea exterioară a moleculei de Hb, practic, sunt benigne, cu excepția Hb S;

b) se modifică centrul activ. În Hb M histidina proximală sau distală e substituită cu tirozina ce conduce la stabilizarea formei oxidate (fierii) — complex al tirozinei cu Fe. Substituirea se poate produce în α și β catene. Au fost depistate toate cele 4 variante mutante. Hb cu 2 hemuri în fieriformă — Hb M (methemoglobină) — se atestă la heterozigote; la homozigote conduce la un sfîrșit letal;

c) modificări în structura terțiară. În cazul dat formarea conformației normale a moleculelor nu are loc și astfel de tipuri de hemoglobină nu sunt stabile (glicina e substituită cu arginina). Sunt înregistrate Hb incapabile să rețină hemul datorită modificărilor conformaționale;

d) modificări în structura cuaternară. Aceste mutații ating regiunea contactelor, ceea ce cauzează pierderea proprietăților alosterice însoțită de tulburări ale afinității față de O_2 .

Modificările în regiunea contactului α_1, β_2 conduc la cooperativitate joasă, concomitent sporind afinitatea la O_2 . Contactele între subunitățile de același tip sunt polare, iar între subunitățile de tip diferit — mai intense și nepolare. Se atestă cîteva cazuri:

1) substituirea aspartatului în β catenă cu asparagina micșorează P_{50} de la 26 la 15 tori (Hb-Kempsey);

2) substituirea în α catenă a aspartatului cu treonină mărește afinitatea la P_{50} egală cu 70 tori (Hb-Kansas).

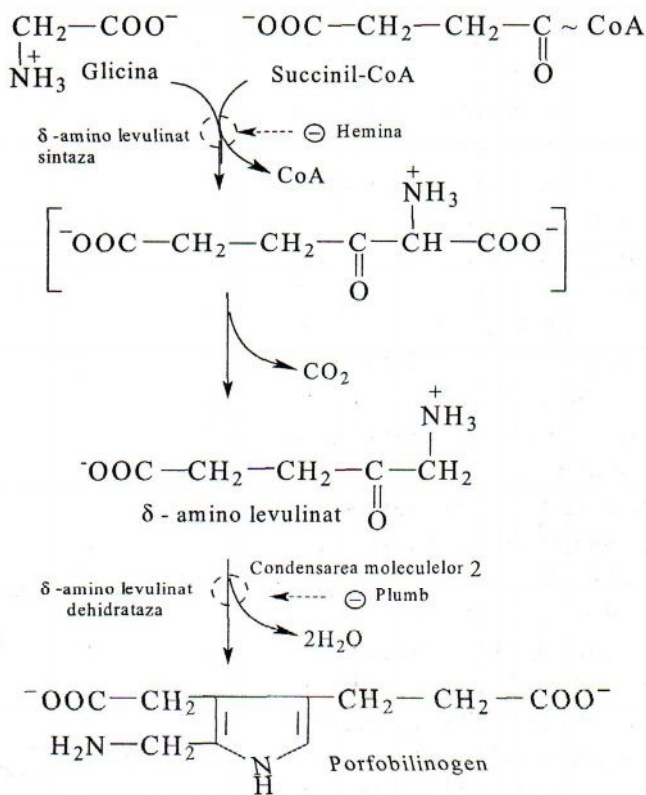


Figura 6.60. Sinteza porfobilinogenului

Sinteza hemului

Experimentele cu administrarea atomilor marcați, efectuate de David Shemin cu colaboratorii, au demonstrat că precursorul hemului se formează prin condensarea glicinei cu succinatul activ la sinteza amino-levulinatului. Reacția este catalizată de δ -amino-levulinat sintază (E_1) dependentă de vit. B_6 .

Amino levulinat sintaza este o enzimă mitocondrială reglatoare. Viteza de reacție crește în lipsa hemului. Apoi 2 molecule de δ -amino-levulinat se condensează, cu formarea porfobilinogenului. E o reacție catalizată de o dehidratază (E_2). Enzima este localizată în citozol, conține Zn și este inhibată de ionii de plumb.

În consecință, 4 molecule de porfobilinogen se condensează, formînd un tetrapirrol, care, dezaminîndu-se, se ciclizează producînd *uroporfirinogenul*. Prin decarboxilare și oxidări succesive, se produce *protoporfirina IX*. O *hemosintetază*, enzimă mitocondrială, introduce fierul; enzima conține grupa SH. Pentru sinteza hemului sunt necesari și următorii compuși: acidul tetrahidrofolinic, vit. B_{12} , Cu^{++} (fig. 6.60 și fig. 6.61).

Fierul este transferat de o *transferină* Fe^{3+} , ce reprezintă o proteină. O altă proteină îl depozitează în țesut sub formă de *ferritină*. Cavitata interioară

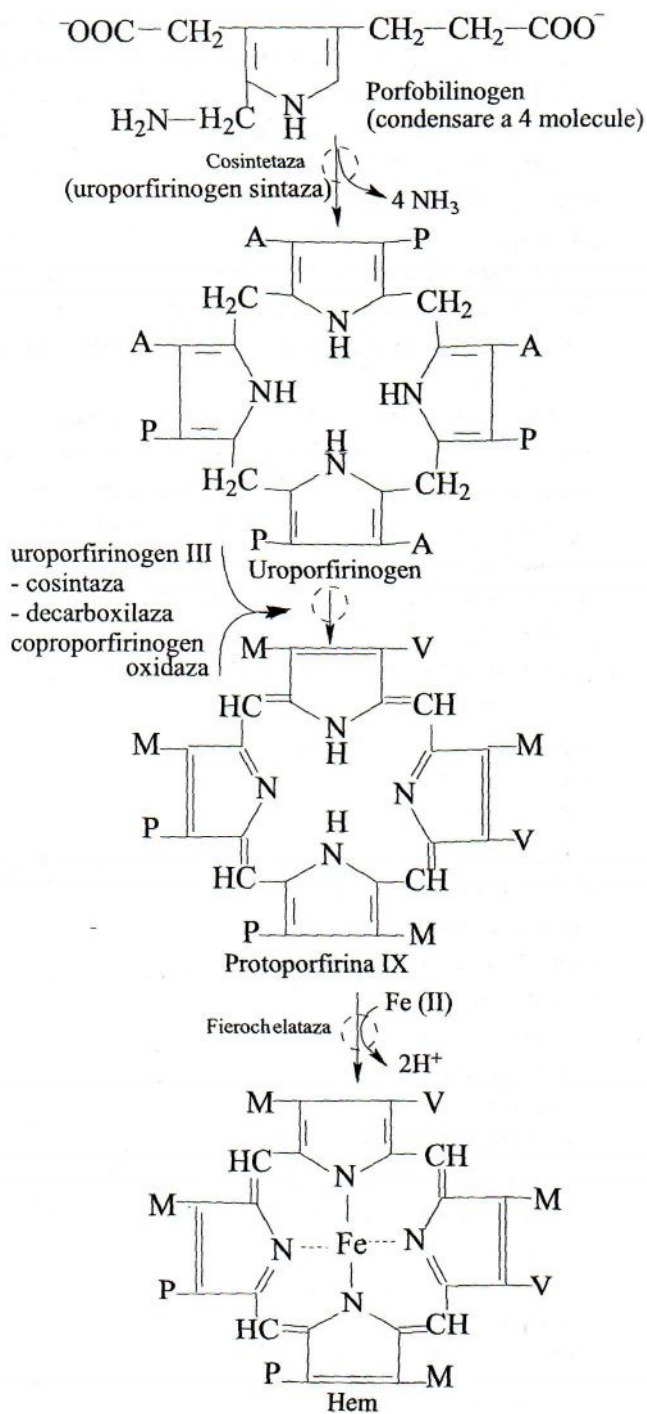


Figura 6.61. Formarea hemului.
 V - vinil, M - metil, P - propionil

a acestei proteine poate fixa pînă la 4500 fierioni. În organism se conțin aproximativ 4,5-5,0 g de Fe; pe contul Hb = 60-70%; mioglobinei = 3,5-5,0%; feritinei = 20%; transferinei = 0,18%, fierului funcțional din țesuturi îi revine 5%.

Firește, fierul cromoproteidelor alimentare nu se utilizează pentru sinteza fieroproteidelor din organism, deoarece hemul se oxidează în *hematina* care nu se absoarbe în intestin. Acest pigment se elimină prin masele fecale.

Drept sursă de fier pentru scopuri sintetice servesc alimentele și, de asemenea, fierul ce se eliberează la degradarea eritrocitelor. În procesul sintezei cele trei enzime enumerate se reglează prin retroinhibiție de hem.

Degradarea hemului

Eritrocitele viețuiesc aproape 120 de zile. Zilnic se degradează și se sintetizează în organism 6-7 grame hemoglobină. Celulele vechi sunt eliminate din sistemul circulant și scindate în splină de celulele sistemului macrofagal. La prima etapă hemoglobina eliberată prin liza hematiilor îmbatrînite formează cu haptoglobina un complex Hb- haptoglobină (ultima e o α_2 -glicoproteină serică).

Complexul este supus oxidării enzimatică microzomale, cu formarea unor compuși intermediari ca coleglobina, verdoglobina, care apoi pierd globina, transformîndu-se în hem. Globina se hidrolizează pînă la aminoacizi, iar fierul din hem este fixat de transferina plasmei, apoi poate fi depozitat în ficat sau reciclat.

Reacția de degradare a hemului constă în scindarea punții metenilice α , cu deschiderea ciclului tetrapirolic (fig.6.62). Reacția e catalizată de *hemoxygenaza* numită și *α -metinil-oxigenaza*, care are două particularități:

- a) se prezintă drept o monooxygenază solicitantă a O_2 și NADPH;
- b) carbonul punții metenilice se elimină sub formă de CO. Participă, în calitate de cofactori, vitamina C, Fe^{2+} . Asta e unica reacție în organism unde se eliberează CO.

Ulterior, puntea metenilică centrală în *biliverdină* se reduce sub acțiunea *biliverdin reductazei*, utilizînd NADPH, cu formarea *bilirubinei*. Biliverdin reductaza este prezentă în numeroase țesuturi, dar prioritar în ficat. În mod normal, bila conține numai urme de biliverdină, dar grație culorii sale intense, ea imprimă bilei o culoare verzuie. Bilirubina liberă în exces este un decuplant al fosforilării oxidative, ce duce la inhibarea sintezei de ATP.

Bilirubina, în complex cu albumina serică, e denumită *bilirubină liberă indirectă*, cu o cotă de 75% din toată cantitatea (2,5 - 12mg/L, 8,7-20,5 μ m/mol), fiind transferată apoi în ficat. Bilirubina indirectă este toxică, nu trece prin filtrul renal și nu se elimină prin bilă. Bilirubina liberă este solubilă în solvenți organici și numai apoi dă reacție cu diazoreactivul (*reacție indirectă*). Aici, în ficat, se modifică în formă mai solubilă, conjugată cu acidul glucuronic, ce adăunează la catenele propionice. Sub formă de diglucuronid este excretată prin bilă — *bilirubina directă* (fig. 6.62).

Un rol important în procesul de eliminare a bilirubinei la nivelul celulei hepatice îi revine proteinei transportatoare — *ligandina* (masa moleculară aproximativ 44000 Da), ce reprezintă aproximativ 6% din totalul proteinelor hepatice.

În intestine, sub acțiunea enzimelor bacteriene, ce scindează acidul glucuronic, fiind redusă (bilirubina) prin mezobilirubin la mezobilirubinogen. Aproximativ 4 mg e cantita-

tea diurnă de urobilinogen și aproximativ 300 mg e cea de stercobilinogen.

Bilirubina fiind redusă (2 vinil \rightarrow 2 etil și 2 metin \rightarrow 2 metilen), va fi transformată în urobilinogen care, prin reducerea legăturilor duble din nucleele terminale, se va transforma în *stercobilinogen*. În continuare, dehidrogenarea acestor compuși la nivelul punții γ -metinice rezultă *urobilina* și *stercobilina* — principalii pigmenți ai materialelor fecale.

O mică parte din bilirubină, urobilinogen și stercobilinogen se reabsoarbe din intestin în circulația portală, ajungând la ficat, de unde sunt reexcretați prin bilă — *ciclul entero-hepatic al pigmentilor biliari*. Cantități mici se elimină prin urină, excreția urinară a acestor compuși — urobilinogen, stercobilinogen — crește în insuficiența hepatică.

Sunt atestate câteva *tulburări genetice ale metabolismului porfirinelor*, ce se caracterizează prin excreția crescută de porfirine și precursori ai acestora.

1. *Porfirie intermitentă acută*. Sunt afectate celulele ficatului, reducându-se activitatea uroporfirinogen sintazei și, compensator, amplificată de γ -amino levulinat sintaza, crește concentrația amino levulinatului și a porfobilinogenului în ficat, eliminându-se prin urină, ceea ce cauzează dereglări neurologice, dereglări intermitente în abdomen.

2. *Porfirie eritropoetică congenitală*. E diminuată de activitatea enzimelor (*cosintază*, *izomerază*), provocând acumularea uroporfirinei, coproporfirinei. Eritrocitele se distrug prematur.

Urina e de culoare roșie, dinții — roză, pielea — sensibilă la lumină.

3. Sunt studiate și *porfirinele hepatice primare* — "*porfirie cutanea tardă*" — ce se caracterizează prin hipersinteză și eliminare urinară de uro- și coproporfirina I. Pacienții sunt fotosensibili — cauza e deficiența de *uroporfirinogen decarboxilaza*.

4. La deficiența *coproporfirinogen oxidazei* (coproporfiria ereditară), se acumulează și se elimină prin urină coproporfirinogen III și alte intermediare — porfobilinogen, ac. δ -amino levulinic. Manifestările clinice sunt asemănătoare cu cele din porfirie acută intermitentă.

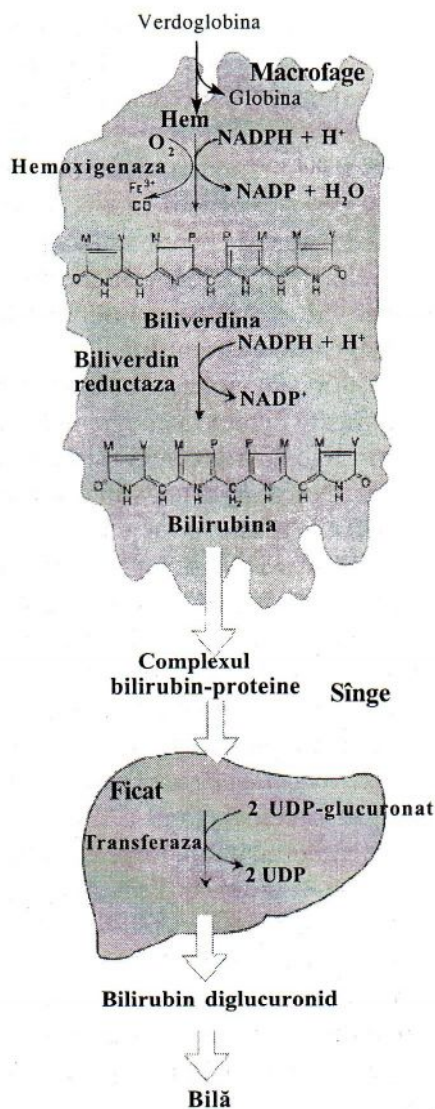


Figura 6.62. Formarea bilirubinei

5. La insuficiența *ALA — dehidratazei* și a *fierochelatazei*, se acumulează în urină coproporfirina III și acidul δ -amino levulinic. Deficitul fierochelatazei în țesuturi duce la protoporfirie — eritrocitele, plasma, fecalele conțin cantități mari de protoporfirina IX. Bolnavii sunt fotosensibili, au ciroza și urticărie prin expunere la soare.

Creșterea activității *amino levulinat sintazei* duce la *porfirie toxică* — prin urină se elimina ac. amino levulinic și porfobilinogen, coproporfirina III. Organismul reacționează vădit la droguri, inclusiv la alcool.

6. Hepatitele și cirozele se caracterizează prin *coproporfirinii secundare* cu izomeri de tip I; intoxicațiile alcoolice și ciroza etilică — prin izomeri de tip III.

Rolul ficatului în metabolism

Ficatul are un rol metabolic multiplu. În condiții normale și în situații patologice, el constituie "laboratorul central al organismului". În ficat, spre deosebire de orice alt organ, interdependența metabolismelor hidraților de carbon, ale grăsimilor, proteinelor constituie o condiție indispensabilă a diversității sale funcționale. Fondul metabolic intracelular este extrem de larg implicat în activitatea specifică a celulei hepatice, care are o mare capacitate anabolică și o caracteristică energetică deosebită.

Hepatocitele sunt detaliat studiate datorită disponibilității lor mari (chiar și la om), precum și simplității de obținere a elementelor ultrastructurale (nuclee, mitocondrii etc.).

Prin cele 2 tipuri de celule parenchimoase și ale sistemului reticulo-histocitar (macrofagal), ficatul exercită funcții complexe ce pot fi grupate în trei categorii mari: participarea la procesele metabolice, secreția bilei și dezintoxicarea.

Materia obținută prin vena portă, intrând în contact cu celulele hepatice (în funcție de natura celulelor hepatice), este supusă unor prelucrări adecvate. Substanțele inerte și particulele cu dimensiuni mai mari se fixează în celulele Kupffer. Componentele chimice sunt metabolizate la nivelul celulelor parenchimoase.

Metabolismul glucidic (fig. 6.63).

Echilibrul dinamic la asigurarea glucozei sanguine e realizat atât prin depozitarea acesteia în formă de glicogen (fosforilare determinată de glucokinază, enzimă adaptivă), cât și de mobilizarea ei din aceste rezerve. Există glicogen liber ușor extractibil și desmoglicogen greu extractibil. Depunerea lui ca rezervă și deplețiunea rezervelor din ficat par a fi în raport cu creșterea sau micșorarea greutatei moleculare a polizaharidului, decât cu modificările numărului de molecule. Moleculele de dimensiuni diferite ale glicogenului nu participă la metabolism în mod identic.

S-a stabilit că încorporarea glucozei se realizează îndeosebi în moleculele de glicogen cu greutate moleculară mică. Ficatul este:

— singurul organ ce utilizează pentru sinteza glicogenului, în afară de glucoză, și alte hexoze, fructoza, manoză, galactoza;

— unicul organ ce asigură sinteza glicogenului pornită de la acidul lactic, glicerol sau de la alți metaboliți intermediari proveniți din lipide sau proteine (gluconeogeneză);

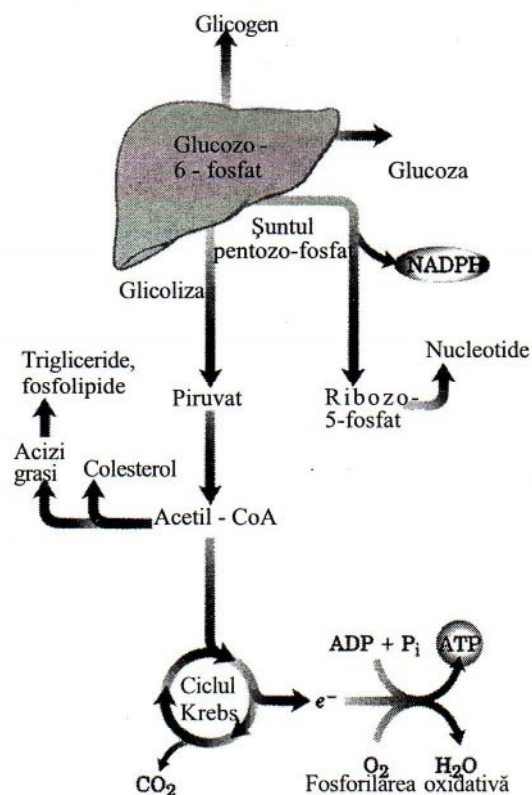


Figura 6.63. Metabolizarea glucozo-6-fosfat în ficat

- în el degradarea glucozei, preponderent de la 50% la 75%, are loc pe calea șuntării hexozo-monofosfaților, cu sinteza simultană a NADPH și pentozelor;
- în ficat se sintetizează heparina. La metabolismul glicoproteinelor sunt implicate enzimele N-acetil-glucozoamin și N-acetil-galactozaamin kinaza.

Metabolismul lipidic (fig. 6.64)

Are loc realizarea următoarelor procese:

- preluarea lipidelor alimentare, în special a TAG (chilomicronii), a acizilor grași, cu un număr mediu de atomi de carbon în catenă;

- captarea acizilor grași proveniți din lipidele țesutului adipos și transportați prin intermediul albuminei serice spre ficat;

- sinteza acizilor grași, cu formarea de TAG, pe care hepatocitul îi încorporează în pre- β lipoproteine;

- remanierea metabolică a acizilor grași, elongarea lanțului de carbon (C_{24}), desaturarea acidului linolenic în acid arahidonic; acidului oleic — în eicosatrienoic; peroxidarea acizilor polinesaturați formați;

- catabolismul acizilor grași prin β -oxidare, proces ce solicită prezența carnitinei, a CoA sintetizat din acidul pantotenic și aminoacizi cu sulf;

- formarea corpiilor cetonice la β -oxidare, reprezentând substraturi cu valori energetice mari utilizați extrahepatic (rinichi, miocard);

- implicarea în ciclul glucozei a acizilor grași; importanța biologică constă în faptul că excesul de glucoză favorizează sinteza TAG și inhibă eliberarea acizilor grași, iar în lipsa glucozei fenomenul se declanșează invers;

- toate organele sunt apte de a sintetiza fosfatidele proprii, însă numai ficatul le poate remite plasmei. Așadar, fosfatidele plasmatiche sunt de origine hepatică. Biosinteza lor presupune etape anterioare la care se produc componentele structurale ale acestor molecule complexe, în final — cu participarea derivaților citidinfosfatului;

- la utilizarea metabolică a glicerolului rolul principal constă în posedarea unei glicerol kinaze active;

- în biosinteza, esterificarea și transformarea colestrerolului în acizi biliari 2/3 din colesterol este de natură endogenă și 1/3 e esterificată sub acțiunea lecitin-colesterol-acil transferazei.

Metabolismul proteic

Contribuția ficatului la acest metabolism este de cea mai mare importanță și se exercită în două direcții decisive pentru organism.

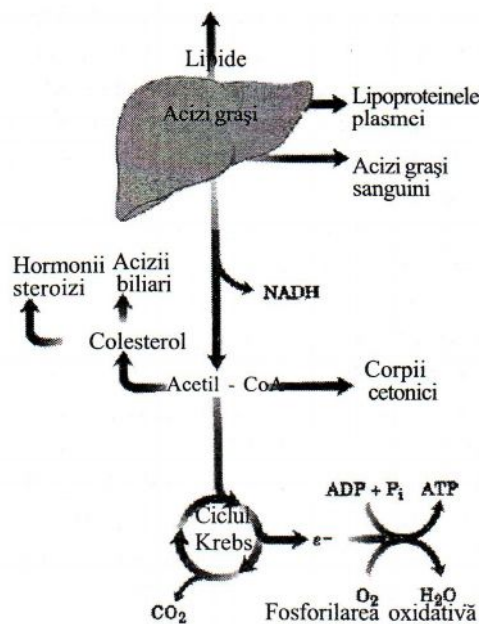


Figura 6.64. Metabolismul acizilor grași în ficat

Dezintoxicarea se realizează prin 4 tipuri de reacții chimice: oxidare, reducere, hidroliză, condensare (sinteză). Ele se desfășoară în 2 faze:

I) faza proceselor de oxido-reducere și hidroliză, finalizată prin hidroxilarea substratului;

II) faza de conjugare (sinteză).

Faza I. E determinată de activitatea sistemului monooxidazic microzomal. Enzimele la această fază utilizează lanțul de transport electronic microzomal, alcătuiesc un sistem monooxidazic cunoscut sub denumirea de oxigenaze cu funcții mixte microzomale; se mai numesc și hidroxilaze microzomale, datorită hidroxilării finale a substratului.

Sistemul are următoarele componente:

a) Citocromul P_{450} acționează în formă oxidată și se cuplează la substratul pe care îl va oxida, parcurgând etape de evoluții conformaționale ale hemoproteinei oxidate;
 — NADPH citocrom C reductaza, flavin-enzimă, participantă la oxidarea NADPH;
 — NADPH citocrom P_{450} reductază, donator de electroni, care asigură reducerea citocromului P_{450} oxidat;

— citocromul B_5 și NADH (donator al doilea de electroni).

b) Fosfatidil-cholina din componența membranei microzomale este esențială pentru transferul de electroni de la NADPH citocrom C reductaza la citocromul P_{450} (necesară pentru fixarea substratului și a inducției citocromului P_{450}), elementul principal constituindu-l citocromul P_{450} .

Ciclul de reacții la care participă citocromul P_{450} este următorul (fig.6.66):

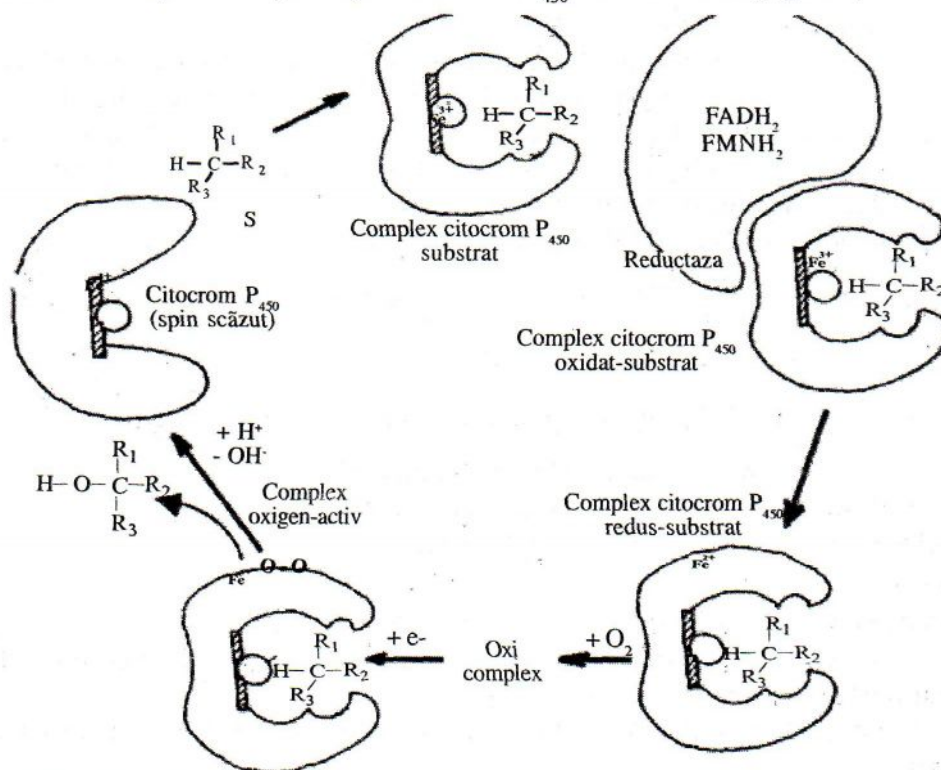


Figura 6.66. Ciclul reacțiilor în care activează citocromul P_{450}

- 1) legarea substratului la citocromul P_{450} , cu substituirea conformației hemoproteinei și transformarea ei din starea de "spin" scăzut în cea de "spin" înalt;
- 2) reducerea Fe citocromic prin transferul de e^- de la NADPH- reductază;
- 3) activarea O_2 , cu formarea unui complex oxigen activ pînă la anion superoxid;
- 4) transferul atomului de oxigen, cu hidroxilarea substratului și eliberarea citocromului P_{450} la "spin" scăzut.

Principalele reacții enzimatică ale fazei I sunt:

a) *oxidarea*: 1) hidroxilarea alifatică, aromatică, hidroxilarea mixtă; 2) O- și N-dezalchilarea; 3) N-oxidarea; 4) dezaminarea oxidativă; 5) alte forme de oxidare;

b) *reducerea*;

c) *hidroliza*.

Faza II. Mecanismul general al conjugării constă din reacții endergonice (cu utilizarea ATP drept sursă de energie). Spre deosebire de reacțiile fazei I legate de specie, cele din faza II sunt filogenetic diferite: la om are loc conjugarea cu acid glucuronic, glicocol, glutamină.

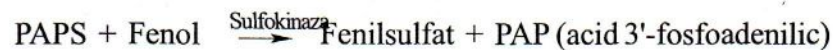
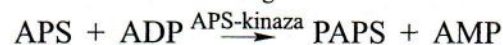
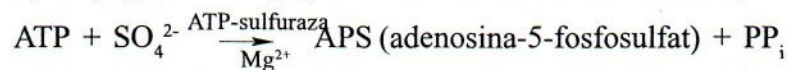
Ambele faze sunt proprii membranei microzomale, iar în partea interioară e localizată glucuronil transferaza.

1) *Calea principală e glucurono-conjugarea*. Sistemul care catalizează conjugarea implică formarea acidului uridindifosfoglucuronic. Enzima E_1 e UDPGA transferaza.



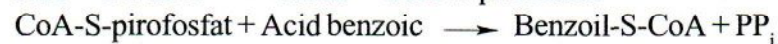
(X poate fi: O, CO, NH, S). În cursul acestor reacții se efectuează inversiunea legăturii glucuronozidice (tipul α trece în β) a conjugatului care este hidrolizabilă pentru β -glucuronidază. În ficat glucurono-conjugarea se diminuează prin efectul pirofosfatazei microzomale care hidrolizează UDPGA la ac. 1-P-glucuronic și prin β -glucuronidaza lizozomală care hidrolizează O-glucuronații.

2) *Conjugarea cu sulf* (3'-P-adenosina-5'-P-sulfat - PAPS):



3) *Conjugarea cu aminoacizi*: glicină și glutamină

a) glicina e utilizată pentru acizii aromatici, heterociclici etc:



(Glicocolul este de origine, preponderent, hepatică, iar reacția decurge în rinichi și parțial în ficat).

b) Grupa NH_2 a glutaminei formează o grupare amidică cu grupa $COOH$ a drogului.

4) *Acilarea prin transacilare* normal se produce în ficat. În așa mod se detoxifică sulfamidele.

Nivelul de metabolizare a medicamentelor poate fi scăzut sau inhibat. Activitatea poate fi și prelungită. Foarte importantă este inducția enzimatică microzomală. Cel mai profund este studiat fenobarbitalul, inductor al glucuronil transferazei, al nivelului citocromului P₄₅₀ (enzime implicate în metabolizarea medicamentelor).

Patologia biochimică a ficatului poate fi congenitală și dobândită. Prima se exprimă prin variate deficiențe enzimaticе, pe cînd a doua — prin sindromul icter, care apare la mărirea concentrației bilirubinei serice peste 1,2-2mg%, la care pigmentul pătrunde în țesuturi. Icterul este expresia unui exces de substanțe ce depășește capacitatea de excreție sau a unei leziuni hepato-celulare, precum și a unui obstacol în calea scurgerii bilei.

Colestaza reprezintă schimbări biochimice care se aseamănă cu cele ale icterului posthepatic, fosfataza alcalină serică fiind puțin ridicată.

Icterul prehepatic e determinat de stări hemolitice (bilirubina indirectă, neconjugată).

Icterul neonatal este, parțial, de origine hepatică și e provocat de capacitatea redusă a ficatului de a excreta bilirubina în bilă — incapacitatea de a sintetiza UDP-GA, dar și o activitate redusă a glucuronil-transferazei.

Icterul hepatocelular este cauzat de infecția virală sau toxine. Patogenia icterilor este redată în figura de mai jos (6.67).

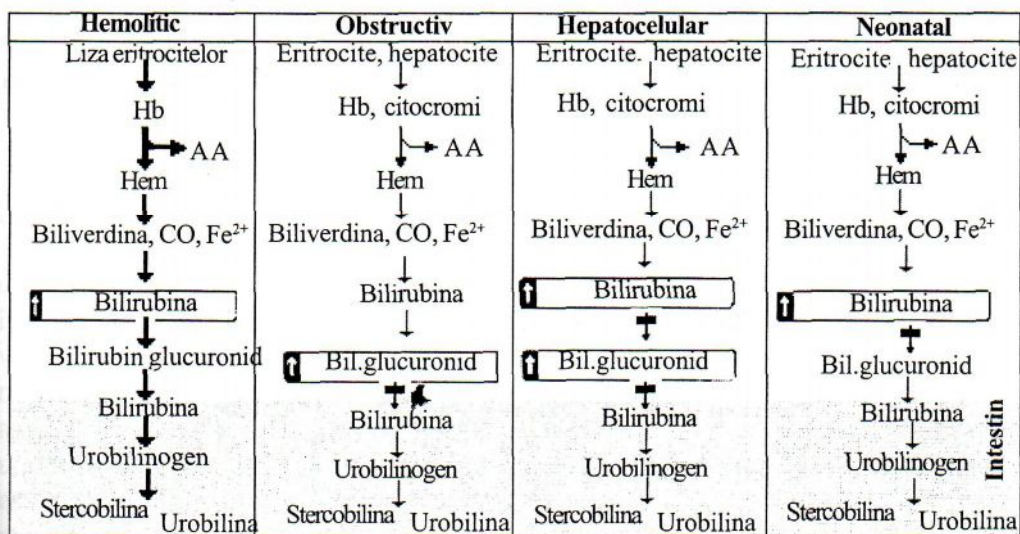


Figura 6.67. Patogenia icterilor. ■ reprezintă localizarea blocului respectiv

Icterul juvenil (hiperbilirubinemia familială, sindromul Gilbert) e cauzat de un deficit al proteinei transportatoare de bilirubină, care implică cauzează deficitul de prelucrare a bilirubinei de către hepatocit. E un icter hepatic premicrozomal, la fel ca și sindromul *Crigler-Najjar*, provocat de absența congenitală a UDP-glucuronil transferazei.

În unele boli genetice (*s. Dubin-Johnson*) se constată defect al secreției bilirubinei conjugate din celulele hepatice în canaliculele biliare cu sau fără formarea unui pigment brun (*s. Rotor*).

Sindromul Arias (icter de lungă durată neonatal) este corelat cu prezența în laptele matern a unui steroid, inhibitor al conjugării bilirubinei. Bilirubina neconjugată poate conduce la icterul nuclear.

Dintre tulburările metabolice înnașcute se evidențiază *boala Wilson* (degenerarea hepato-lenticulară), provocată de deficitul sintezei ceruloplasminei (cupru oxidaza), producând în consecință afecțiuni cerebrale (lenticulare), corneene, renale, aminoacidurie, fosfaturie, depozitari de cupru în țesuturi.

Explorările hepatice se bazează pe cele 4 sindroame proprii patologiei hepatice: excreto-biliar, hepato-priv (insuficiența celulară), citoliză și inflamator. Cele mai utilizate probe în diagnosticul și pronosticul lor sunt:

1) *Excreto-biliar*: bilirubina și raportul ei; fosfataza alcalină cu izoenzimele sale; LAP-leucin aminopeptidaza; 5'-nucleotidaza și γ -glutamil transpeptidaza.

2) *Hepato-priv*: proteinemia totală, albumina serică, factorii de coagulare, colesterolul liber, total și esterificat, proba QuicK.

3) *Citoliza*: sideremia, cupremia, enzimele plasmatică — SDH, OCT, arginaza, F-1-P aldolaza, guanaza, LDH₅ — indicator de severitate al afecțiunilor și GLDH (leziuni mitocondriale) GPT, GOT și raportul lui Schmidt: GOT+GPT/GDH (glutamat dehidrogenaza) egal cu 5-15 (icter obstructiv), 30-50 (hepatita cronică), 50 (hepatita acută).

4) *Inflamator*: disproteinemia, cu scăderea fracției albuminice și creșterea β și γ -globulinelor: imunoelectroforetic (crește IgM — în procese acute și IgA — în cronic). Se determină și coeficientul de Rittis (GOT/ GPT), normal egal cu 1,33.