

Clinica I-a medicală, Tirgu-Mureş (cond.: prof. P. Dóczy, doctor în ştiinţe medicale)

CONTRIBUȚII LA METODOLOGIA DETERMINĂRII FOSFATAZEI ALCALINE DIN OMOGENIZAT DE FICAT PATOLOGIC

L. Róna, E. Kijor, Paraschiva Tuka

Se cunosc unele cercetări cu privire la modificările cantitative ale unor enzime hepatice, ca: transaminazele, aldolaza, catalaza, esteraza, lactodehidrogenaza etc., dozate din omogenizatul hepatic al unor animale de experiență tratate în prealabil cu substanțe hepatotoxice (8, 9a, 9b), precum și unele cercetări clinice făcute prin dozarea acestor enzime din omogenizatul hepatic obținut prin biopsii și puncții — la bolnavi suferind de diverse afecțiuni hepatice (1, 9c, 9d, 9e, 9f, 10,

11). Aceste cercetări au pus în evidență modificări enzimactice existente la nivelul țesutului hepatic chiar și în cazurile în care valorile serice ale acestor enzime erau normale. Conform datelor bibliografice care ne-au stat la dispoziție, fosfataza alcalină, dozată din omogenizat hepatic, a fost cercetată numai în cazuri de hepatită acută (6).

Probleme enzimactice efectuate din ser, folosite în diagnosticul afecțiunilor hepatice, se bazează pe fenomenul de citoliză hepatică (necroză celulară), în urma căreia fermentii celulei hepatice degradate ajung în circulație (2, 8). Majoritatea acestor probe de laborator clinic nu reflectă însă starea mezenchimului hepatic și din această cauză au o valoare redusă în diagnosticul hepatitelor cronice cu proliferare conjunctivă, fără necroze celulare masive. Se cunoaște faptul că țesutul de granulație prezintă în general o activitate fosfatazică crescută. O creștere similară ar fi de așteptată și în țesutul ficatului în caz de hepatită cronică evolutivă. Această presupunere a fost confirmată de noi pe baza unor cercetări histochemice, făcute din materialul obținut prin puncții-biopsii hepatice, la bolnavi suferind de hepatită cronică (3). Metoda histochemică nu este însă un procedeu suficient de obiectiv pentru aprecierea schimbărilor enzimactice cantitative. Dozarea biochimică pare să fie mult mai obiectivă și mai precisă.

Cu privire la metoda folosită pentru dozarea fosfatazei alcaline ne referim la constatările făcute de unul din noi (4). Conform acestor observații în unele afecțiuni hepatice pot apare în ser agenți de inhibiție a activității fosfatazice care la examinările făcute prin metoda obișnuită (Bodansky) pot masca și chiar modifica activitatea fosfatazică reală.

Prin experimentele din prezenta lucrare am căutat să contribuim la elucidarea următoarelor probleme:

1. — Dacă creșterea activității fosfatazei alcaline hepatice, în cazuri de hepatită cronică, pusă în evidență cu metode histochemice, poate să fie confirmată și prin dozări biochimice făcute din omogenizat hepatic?

2. — Dacă observațiile noastre anterioare, făcute în legătură cu metoda dozării fosfatazei alcaline din ser sînt valabile și pentru dozarea din omogenizat hepatic?

Material și metodă

Experiențele noastre au fost făcute pe un număr de 40 de șobolani albi, nutriți cu hrană obișnuită, cu greutatea variind între 150—200 gr. Prima serie (15 animale) a fost tratată din două în două zile cu CCl_4 (: 0,1 ml/100 gr corp soluție uleioasă 90% sub formă de injecții i. m.:). A doua serie (15 animale) a fost tratată cu acid tanic (: inj. i. m. dintr-o soluție apoasă de 1—2% în doze de 1—2 ml 100 gr. corp administrate în cantități crescînde și decrescînde, după procedeele dscrise de *Korpassy* (5). A treia serie (10 animale) ne-a servit drept lot martor.

Leziunile hepatice produse au fost urmărite prin examinări histopatologice, sacrificînd un animal din fiecare serie, la intervale de 2 săptămîni după începerea tratamentului. În medie, la 65—75 de zile, ficatul animalelor aparținînd seriilor tratate a arătat semne histopatologice caracteristice pentru o hepatită cronică cu proliferare conjunctivă, cu infiltrație perilobulară limfo-histiocitară, cu proliferarea elementelor reticulare și cu senne distrofice din partea celulelor hepatice (Fig. 1). Din seriile tratate, 6 animale au sucombat în urma tratamentului. După ce ne-am convins de instalarea leziunilor, cele 18 animale restante au fost sacrificate prin decapitație. Din ficatul animalelor s-a recoltat un fragment pentru dozarea imediată a fosfatazei alcaline, iar un alt fragment cu scopul executării unei analize histopatologice.

Dozarea fosfatazei alcaline. Fragmentul hepatic a fost omogenizat cu ajutorul unui omogenizator (confectionat de noi) într-o soluție izotonică tamponată (pH 8,6) în proporție de 1:3. După omogenizarea și îndepărtarea prin centrifugare a rămășițelor nucleare, din supernatant, se măsoară în patru eprubete cantități diferite

și anume: 0,2—0,4—0,8—1,6 ml, la care se adaugă 8 ml soluție tampon borat (pH 8,6—37° C) care conține substratul (beta-glicero-fosfat în concentrație finală de 0,032 M). Eprubetele au fost completate până la 10 ml cu soluție izotonică de clorură de sodiu. În momentul amestecării substratului cu omogenizat, din fiecare eprubetă se scoate o cantitate de 2 ml la care se adaugă sol. de acid tricloracetic 30% pentru inactivare — servind drept martor. Din restul de 8 ml se scot probe de cite 2 ml la intervale de 4, 16, 32 și 64 de minute. În această perioadă sistemul este păstrat în termostat la 37° C. Din probele luate, fosforul anorganic eliberat se dozează cu metoda obișnuită. Cu ajutorul acestui procedeu activitatea fosfatazei alcaline a fost dozată în funcție de concentrația omogenizatului și în funcție de timpul de incubare.

Rezultate

Fig. nr. 1 reprezintă activitatea fosfatazei alcaline a omogenizatului, determinată după metoda Bodansky (rezultate obținute cu o cantitate de 1,6 ml omogenizat, după o incubare de 64 de min:) (Fig. nr. 1).

Din figură se constată că în general animalele tratate cu CCl_4 și acid tanic, prezentând semne histopatologice caracteristice pentru hepatita cronică, cu proliferare conjunctivă, arată o activitate fosfatazică ridicată față de grupul martor. Seria tratată cu acid tanic prezintă o creștere mai evidentă.

Analizând activitatea fosfatazei alcaline în funcție de timpul incubării, precum și în funcție de concentrația omogenizatului (fig. 2) am constatat că activitatea fosfatazei alcaline în omogenizatul animalelor normale (martori) nu este direct proporțională cu timpul incubației. Se poate constata în timp o inhibiție netă a activității, ceea ce denotă existența unor factori de inhibiție în ficatul animalului normal. În seria tratată cu acid tanic inhibiția activității este mai mică, iar în grupul tratat cu CCl_4 activitatea fosfatazei alcaline în timp prezintă o creștere aproape liniară. Pe baza caracteristicilor acestor curbe se poate presupune că în urma afecțiunii hepatice, acțiunea factorului inhibitor scade într-o măsură considerabilă. (Fig. nr. 2).

Din fig. nr. 3 în care am reprezentat activitatea fosfatazei alcaline a omogenizatului în funcție de concentrația folosită, rezultă de asemenea că la animalele cu leziuni hepatice acțiunea inhibitoră existentă în ficatul animalului normal este diminuată. (Fig. nr. 3).

Concluzii

1. După o administrare de CCl_4 (în medie de 65—75 de zile) activitatea fosfatazică a omogenizatului hepatic de șobolan, dozată după principiul lui Bodansky, prezintă o creștere moderată. La animalele tratate cu acid tanic această creștere este mai evidentă. Aceste constatări sînt în concordanță cu rezultatele noastre obținute prin examinări histochemice la bolnavii suferind de hepatită cronică.

2. Analizînd curbele activității fosfataze în funcție de timpul de incubare al omogenizatului cu substrat și în funcție de concentrația omogenizatului folosit, se poate afirma că activitatea fosfatazică depinde în mare măsură de acești factori. Pe baza curbei activității fosfataze stabilite în funcție de acești factori (metodă elaborată de noi) se poate constata prezența unor substanțe de inhibiție în ficatul animalului normal, care scad sub influența leziunii hepatice experimentale.

3. Observațiile cuprinse la punctul 2 de mai sus confirmă constatările noastre anterioare (4), referitoare la dozarea fosfatazei alcaline din ser. Conform acestor constatări, la dozarea activității fosfatazei alcaline — care ar reprezenta cantitatea enzimei exprimată în unități convenționale — trebuie să ținem cont de substanțele cu acțiune inhibantă, aflate în sistemul biologic respectiv.

Cercetările noastre în curs se referă la dozarea activității fosfatazei alcaline din țesut de ficat, obținut prin punctii-biopsii și biopsii intraoperatorii, la bolnavii suferind de diverse afecțiuni hepatice.

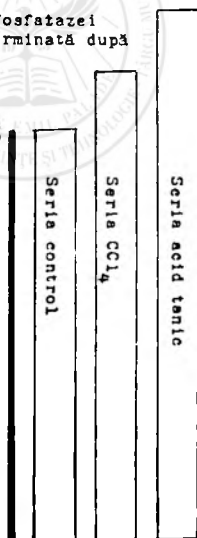
Sosit la redacție: 21 ianuarie 1964.



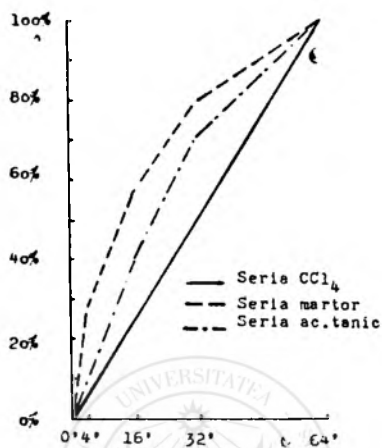
Fig. nr. 1.

Activitatea fosfatazei
alcaline determinată după
Bodansky.

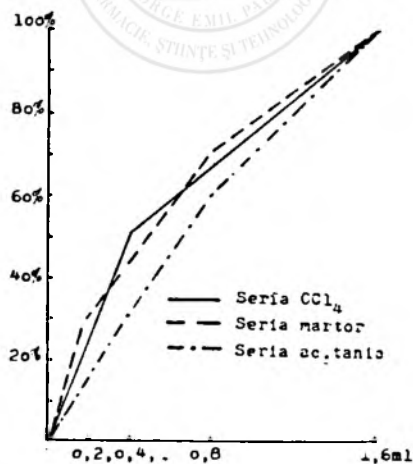
100%



Graful nr. 1.



Graficul nr. 2. Activitatea fosfatazei alcaline în funcție de timpul de incubare



Graficul nr. 3. Activitatea fosfatazei alcaline în funcție de cantitatea omogenizatului

Bibliografie

1. DALE G. B.: Am. J. med. Sci. (1953), 42, 226;
2. GALEA GH. și colab.: Med. internă, (1962), 4, 445;
3. KEMÉNY GH., FESZT T., RONA L.: Rev. Medicală, (1961), 2, 180;
4. KIFOR E., FALL A.: Rev. Medicală, (1963), 4, 134;
5. — KORPÁSSY B.: Orv. Hetilap, (1949), 27, 522;
6. MANȘUROVA I. D.: Sov. medicina, (1962), 1, 31;
7. MOGOȘ GH.: Med. internă, (1963), 10, 1233;
8. MORETTI J. și colab.: Presse med., (1960), 58, 2278;
- 9 (a—f) SCHMIDT E., WILDHIRT E.: Klin. Wchnschr., a) (1958), 4, 173; b) (1958), 5, 227; c) (1958), 6, 281; d) (1958), 13, 611; e) (1959), 23, 1221; f) (1959), 23, 1229;
10. SOMMERVILE I. R.: I. Clin. Invest. (1960), 6, 926;
11. WATERLOW J. C. Lancet, (1950), 908.