

Medicină Dentară
Anul I
Grupele 1-10
As.univ.Dr. Buzatu Alina Ramona

Pentru materialul de laborator, corespondența se realizează cu titularul de laborator, la adresa de email buzatu.ramona@umft.ro

Laboratorul 13

METABOLISMUL ACIZILOR NUCLEICI. DETERMINAREA ACIDULUI URIC ÎN SER.

Diagnosticul hiperuricemiilor se bazează pe determinarea concentrației serice a acidului uric.

Catabolismul acizilor nucleici constă în degradarea enzimatică a acestora până la elementele lor constitutive: baze azotate, pentoze și acid fosforic. La rândul lor sunt degradate și bazele azotate, dar într-un mod diferențiat: cele pirimidinice la CO_2 , H_2O și NH_3 iar cele **purinice la acid uric (2,6,8-trihidroxipurină)** (inițial se dezaminează heterociclul purinic, iar în continuare acesta este oxidat progresiv la hipoxantină, xantină și în final la acid uric).

Acidul uric produs predominant în ficat din purinele endogene și exogene este eliminat renal prin secreție tubulară. **Concentrația normală de acid uric în ser este de 1-7 mg/100 ml, ceea ce corespunde unei rezerve de urat (cantitatea totală de urat din organism) de 1 g.** În mod patologic, rezerva de urat poate crește (la 25-30 g) pe baza unui defect de eliminare renală (70-80%), respectiv datorită unei producții crescute (20%), ceea ce se traduce și printr-o creștere a concentrației serice a acidului uric în ser, care, fiind puțin solubil, se poate depune în țesuturile moi, producând boala numită **gută (depunerea în țesuturile moi și la nivelul articulațiilor a tofilor gutoși - cristale de urat de sodiu monohidrat precum și la nivel renal)**. Diagnosticul de gută se stabilește pe baza concentrației de acid uric în ser, dar mai ales pe vizualizarea la microscop a cristalelor de urat de sodiu monohidrat. Tratamentul gutei constă în dietă hipoproteică, fără alcool, administrarea de antiinflamatoare nesteroidiene și Allopurinol (inhibitor de xantin oxidază).

Determinarea concentrației acidului uric se poate face prin metode chimice și enzimatic. Cea mai veche metodă de determinare a acidului uric are la bază capacitatea acestuia de a reduce soluția alcalină de fosfowolframat la albastru de wolfram. Metoda originală realizează îndepărtarea proteinelor prin precipitare și izolarea acidului uric din filtrat, înainte de reacția cu fosfowolframatul.

Utilizarea uricazei a permis dezvoltarea unor metode enzimatic, mai specifice. Oxidarea acidului uric la alantoină și apă oxigenată a condus la o varietate de tehnici. Una din metode are la bază absorbția diferențiată a alantoinei și a acidului uric în ultraviolet. În timp ce acidul uric are un maxim de absorbție între 290-293 nm, alantoina nu absoarbe. Această proprietate de a urmări absorbția de radiație la această lungime de undă, înainte și după incubarea probelor cu uricază, este folosită la determinarea acidului uric în ser, plasmă și urină.

Oxidarea acidului uric cu uricază poate fi măsurată și prin viteza de consum a oxigenului în reacție, aceasta fiind proporțională cu concentrația acidului uric.

A. Determinarea acidului uric în ser prin metoda chimică

Metoda se bazează pe caracterul reducător al acidului uric: acidul uric reduce acidul fosfowolframic, în mediu alcalin, formând un compus colorat în albastru, intensitatea culorii fiind direct proporțională cu concentrația acidului uric din proba de analizat. Deoarece acidul ascorbic interferează reacția, el este eliminat de pH-ul alcalin (10-11), asigurat de soluția tampon.

Reactivi

1. Soluția deproteinizantă: 150 g sulfat de sodiu anhidru se dizolvă (prin încălzire) în 1000 ml acid sulfuric 0,1 N.
2. Reactiv fosfowolframic: 50 g wolframat de sodiu, 40 ml acid fosforic 85% și 400 ml apă distilată se introduc într-un balon de 1litru, cu șlif, la care se atașează un refrigerent și se fierb la reflux timp de patru ore. Dacă soluția obținută este verde, se adaugă 1-2 picături de brom și se mai fierbe câteva minute, fără refrigerent, până se îndepărtează tot bromul. După răcire, soluția se trece într-un balon cotat de 500 ml și se aduce la semn cu apă distilată.
3. Soluția tampon glicină (pH~12,5): 3 g glicină se dizolvă în 100 ml NaOH 1N.
4. Soluție standard stoc de acid uric (100 mg%): se dizolvă 100 mg acid uric și 50 mg carbonat de litiu în 60 ml apă bidistilată la 60°C, se răcește și se adaugă 2,5 ml formol 40% și 0,3 ml acid acetic glacial, după care se aduce la 100 ml în balon cotat.
5. Soluție standard de lucru de acid uric (5 mg%): într-un balon cotat de 100 ml se introduc 5 ml soluție standard stoc de acid uric și se aduce la semn cu apă distilată.
6. Ser, plasma

Mod de lucru

În 3 eprubete de 160/16 se pipetează conform tabelului următor:

Reactivi	P (μl)	S (μl)	M (μl)
Apă distilată	900	900	1000
Ser	100	-	-
Soluție standard acid uric (5 mg %)	-	100	-
Soluție tampon glicină	250	250	250
Se agită probele și se lasă în repaus 5 minute, apoi se adaugă:			
Reactiv fosfowolframic	100	100	100

Se agită și se lasă în repaus 15 minute, după care se măsoară absorbanta probei și a standardului față de martor la 710 nm.

Calcul

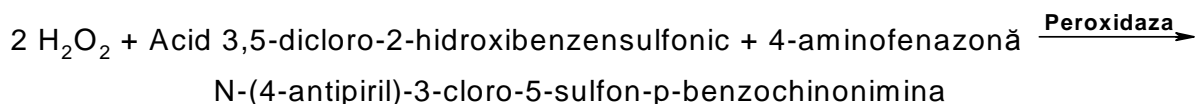
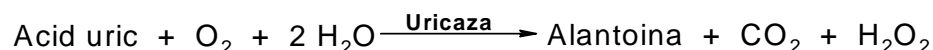
$$\text{mg acid uric / dl ser} = E_P / E_S \times 5$$

Valori normale

Acid uric = 1 – 7 mg/dl

B. Determinarea acidului uric în ser prin metodă enzimatică

Acidul uric se transformă sub acțiunea uricazei în alantoină, cu producerea de apă oxigenată. Apa oxigenată oxidează, în prezența peroxidazei, acidul 3,5-dicloro-2-hidroxi-benzensulfonic și 4-aminofenazona, cu formarea unui compus chinoniminic colorat în roșu-violet.



Reactivi

1. Soluție tampon fosfat 50 mM pH 7; conține acid 3,5-dicloro-2-hidroxibenzen-sulfonic 4 mM.
2. Reactiv enzimatic: conține 4-aminofenazonă 0,3mM; Peroxidază 1000 U/l; Uricază 200 U/l. Reactivul de lucru enzimatic se prepară amestecând în raport volumetric de 1:1 reactivul 1 (tampon) cu reactivul 2 (enzimatic). Stabilitatea soluției obținute este de 21 zile la 2-8°C și de 5 zile la 15-25°C (se păstrează la întuneric).
1. Soluție standard acid uric: 10 mg/100 ml (595 mM),
2. Ser, plasma

Mod de lucru

În eprubete de format 120/12 se pipetează conform tabelului:

Reactivi (μl)	Probă	Standard	Martor
Ser	20	-	-
Standard acid uric	-	20	-
Reactiv de lucru	1000	1000	1000

Se amestecă, se incubează 15 minute la 20-25°C.

Se măsoară absorbanta probei și a standardului față de martor, într-un interval de 30 minute de la adăugarea ultimului reactiv, la $\lambda=520$ nm, în cuve de 1 cm.

Metoda poate servi și la determinarea acidului uric din urina de 24 de ore, utilizând un standard de 110 mg/100 ml (6545 mmol/l).

Calcul: mg acid uric/100 ml ser = $(E_p/E_s) \times 10$

Valori normale

Ser: Bărbați: 3 - 9 mg/dl
Femei: 2,5 - 7 mg/dl.

Valori patologice

Hiperuricemii: se întâlnesc în insuficiență renală acută și cronică, **gută**, leucemii, mielom multiplu, limfom Hodgkin, mononucleoză infecțioasă, psoriazis, cură de slăbire, intoxicații cu plumb și mercur, boli febrile, arsuri întinse, etc.

Hipouricemii: se întâlnesc mai rar, în urma administrării unor medicamente de tipul inhibitorilor xantin oxidazei (Allopurinol) sau uricozuricelor (Probenecid), în prezența unor defecte enzimatice (deficitul de xantin oxidază determină xantinuria ereditară) sau în afecțiuni parenchimatoase hepatice grave.