

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 7

METABOLISMUL PROTEINELOR. DETERMINAREA HEMOGLOBINEI ȘI BILIRUBINEI.

1. Determinarea hemoglobinei

Hemoglobina este o heteroproteină, are o structură cuaternară cu patru subunități, două de tip α și două de tip β , iar fiecare subunitate este constituită din câte o componentă proteică numită GLOBINA și câte un grup prostetic HEM. Hemul este partea prostetică a hemoglobinelor, în raport molar 1:1 cu partea proteică - globina. Hemul este un derivat al nucleului porfirinic, protoporfirina III (9) legată de un atom de Fe^{2+} .

În stadiul adult HbA este de două tipuri, (HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$)) - 97-98% HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) - 2-3%. HbA devine importantă la 4 luni după naștere.

Hemoglobina este localizată în hematii și are rolul de transport al gazelor respiratorii (oxigenului și dioxidului de carbon) și de sistem tampon intraeritrocitar.

Partea experimentală

Metodele de determinare a hemoglobinei pot fi grupate astfel:

- Metode spectrometrice de absorbție, bazate pe măsurarea directă a oxihemoglobinei sau a hemoglobinei reduse, sau după ce în prealabil a fost convertită într-un derivat colorat stabil ca: hematină hidroclorică, hemoglobină, carboxihemoglobină etc.
- Metode gazometrice prin saturarea hemoglobinei cu un gaz (oxigen, oxid de carbon) și evaluarea cantității de hemoglobină din cantitatea de gaz fixată.
- Metode bazate pe determinarea fierului hemoglobinic. Hemoglobina conține o cantitate definită de fier (0,338%), lucru care permite un calcul exact al cantității de hemoglobină.

Determinarea hemoglobinei ca cianmethemoglobină

Hemoglobina este transformată în cianmethemoglobină prin tratare cu fericianură de potasiu și cianură de potasiu, iar absorbția de lumină a soluției de cianmethemoglobină se măsoară la 540 nm.

Reactivi

1. Reactiv Drabkin: 50 mg cianură de potasiu, 1 g bicarbonat de sodiu și 200 mg fericianură de potasiu se dizolvă în apă distilată și se aduce volumul la 1000 ml cu apă distilată.
2. Material biologic: sânge recoltat pe anticoagulant K₂EDTA

Mod de lucru

Se pipetează în eprubete conform tabelului:

Reactivi, ml	Probă	Martor
Reactiv Drabkin (ml)	5,00	5,00
Sânge (µl)	20	-
Apă distilată	-	20

Se lasă în repaus la temperatura camerei 20 de minute după care se măsoară absorbția de radiație la 540 m față de martor.

Conținutul în hemoglobină se calculează pe baza coeficientului molar de absorbție ($\epsilon = 11 \cdot 10^3$) și a masei moleculare a hemoglobinei (16144).

$$\text{grame hemoglobină/100 ml} = E_{\text{proba}} \times 36,8$$

Valori normale

Bărbați: 14 – 18 g hemoglobină/100 ml sânge

Femei: 12 - 16 g hemoglobină/100 ml sânge

Semnificația clinică

Valorile hemoglobinei scad în: anemii, LES, boală Crohn, insuficiența renală cronică, glomerulonefrită cronică, hemoglobinuria paroxistică nocturnă, hiperhidratare, infiltrația și supresia măduvei osoase.

Valorile hemoglobinei cresc în: deshidratare, poliglobulie, policitemia vera, AVC, tumori cerebrale, encefalită.

2. Determinarea bilirubinei

Bilirubina provine din catabolismul hemului din hemoproteine, care are loc în splină, ganglionii limfatici, măduva osoasă și ficat.

Bilirubina difuzează în plasmă. Fiind insolubilă, este atașată de albumina serică. Acest tip de bilirubină se numește **bilirubină prehepatică, insolubilă, neconjugată sau indirectă**.

La nivel hepatic, complexul bilirubină-albumină este capturat și bilirubina este legată de ligandină. În ficat, bilirubina este esterificată cu acid glucuronic, rezultând diglucuronid-bilirubină (numită **bilirubină posthepatică, solubilă, conjugată sau directă**). La nivelul ileonului terminal, bilirubina conjugată este deconjugată și bilirubina liberă este redusă la urobilinogen. Acesta este reoxidat în compuși colorați, numiți urobilină și stercobilină, pigmentii bruni ai fecalelor. O parte din urobilinogen este reabsorbit, ajunge în ficat unde este retransformat în bilirubină și excretat în bilă. Conversia nu este completă, o parte (1%) este eliminat în urină. Bilirubina neconjugată, fiind puternic atașată de albumină sau lipide, nu poate fi eliminată în urină, spre deosebire de cea conjugată care poate fi eliminată, conferind urinei o culoare galben-brun-intensă (când este eliminată în cantități mari). Bilirubina neconjugată are o afinitate ridicată pentru membranele lipidice, blocând funcțiile membranei celulare, în special la nivelul sistemului nervos.

Creșterea bilirubinei neconjugate este cel mai frecvent întâlnită la nou-născuți. Este cunoscută sub numele de icter fiziologic. Acest tip de icter apare în primele zile de la naștere și este cauzat de creșterea producției de bilirubină datorită unui sistem de metabolizare imatur.

Absența sau activitatea scăzută a glucuronil transferazei în defectul congenital Crigler-Najjar duce la hiperbilirubinemie neconjugată.

Boala hepatobiliara are drept consecință hiperbilirubinemie neconjugată și conjugată. Obstrucția căilor biliare duce la creșterea concentrației serice a bilirubinei conjugate,

fosfatazei alcaline, acizilor biliari, colesterolului și glutamil transferazei. Astfel, calculii biliari, colestaza cauzată de medicamente și steroizi, hepatita alcoolică și hepatita virală acută determină colestaza intrahepatică și creșterea bilirubinei serice conjugate.

Bilirubinele au solubilitate diferită în apă și abilități diferite de a reacționa chimic. Bilirubina serică dă reacții lente și rapide; reacțiile lente pot deveni rapide în prezența unor acceleratori adăugați la amestecul de reacție. **Fracția de bilirubină care reacționează direct și rapid, în absența unui accelerator, este cunoscută sub denumirea de bilirubină directă, iar cea care necesită un "accelerator" pentru ca reacția să devină rapidă, este cunoscută sub denumirea de bilirubină "indirectă".** Acceleratorul solubilizează bilirubina neconjugată și crește disponibilitatea ei de a interacționa. Bilirubina directă este bilirubina conjugată ușor solubilă iar fracția indirectă o reprezintă bilirubina neconjugată. Când bilirubina reacționează în prezența unui accelerator, bilirubina determinată este bilirubina totală. **Prin determinarea bilirubinei totale și a celei directe se poate calcula bilirubina neconjugată (indirectă) prin diferență.**

Bilirubina totală - bilirubina conjugată = bilirubina neconjugată

În marea lor majoritate, **metodele de determinare a fracțiunilor bilirubinei au la bază reacția bilirubinei cu săruri de diazoniu. Bilirubina conjugată este hidrosolubilă și reacționează direct cu acidul sulfanilic diazotat. De aceea se numește curent bilirubină directă.**

Bilirubina neconjugată nu reacționează direct cu reactivul diazo (bilirubină indirectă). Reacția este posibilă numai după adăugarea de acceleratori (alcooli, cafeină, uree etc.), care permit dezvoltarea culorii pe seama ambelor componente (directă și indirectă) reprezentând de fapt bilirubina totală.

Hemoliza conduce la valori fals scăzute, iar serurile lipemice dau valori fals crescute din cauza efectului de turbiditate. **Bilirubina este distrusă de lumină și căldură**, aspecte de care trebuie ținut seama atunci când se fac determinări.

Partea experimentală

Determinarea bilirubinei serice cu metoda Jendrassik-Grof

Bilirubina formează cu acidul sulfanilic diazotat un colorant azoic a cărui absorbție de lumină este proporțională cu conținutul în bilirubină. Bilirubina conjugată reacționează direct cu acidul sulfanilic diazotat (bilirubina directă), iar bilirubina totală se determină în prezența unui accelerator de cafeină/benzoat. Bilirubina indirectă (neconjugată) se determină prin calcul din diferență.

Reactivi (Fluitest BIL T/D, Analyticon)

Bilirubină totală și directă:

1. R1: Acid sulfanilic 29 mmoli/l; HCl 0,17 moli/l
2. R2: Azotit de sodiu 25 mmoli/l
3. R3: Cafeină 0,26 moli/l; Benzoat de sodiu 0,52 moli/l
4. Tartrat 0,93 moli/l; NaOH 1,9 moli/l
5. NaCl 0,9% (ser fiziologic)
6. Material biologic: ser nehemolizat, nelipemic

Interferențe

- Hemoliza conduce la valori fals scăzute din cauză că în multe determinări crește absorbanta probei martor.
- Serurile lipemice dau valori fals crescute din cauza efectului de turbiditate.

- Bilirubina este distrusă de lumină și căldură, aspecte de care trebuie ținut seama atunci când se fac determinări.

Mod de lucru

Bilirubina directă

Reactivi (μl)	Probă	Martor
R1	200	200
R2	50	-
NaCl 0,9 %	2000	2000
Ser	200	200

Se lasă **exact** 5 minute la temperatura camerei. Se măsoară absorbanta probei față de martor la 540 nm.

$$\text{mg bilirubină directă/dL} = A_p \times 13,7$$

Bilirubina totală

Reactivi (μl)	Probă	Martor
R1	200	200
R2	50	-
R3	1000	1000
Ser	200	200
Se incubeaza 30 minute la temperatura camerei.		
R4	1000	1000
Se incubeaza 5 minute la temperatura camerei		

Se măsoară absorbanta probei față de martor la 578 nm.

$$\text{mg bilirubină totală/dL} = A_p \times 10,8$$

unde A_p – absorbanta probei

10,8 – factor calculat pe baza coeficientului molar de absorbție al colorantului

azoic

$$\text{Bilirubină indirectă} = \text{Bilirubină totală} - \text{Bilirubină directă}$$

Valori normale

Bilirubină directă: < 0,2 mg/dl

Bilirubină totală: < 1,0 mg/dl

Bilirubina indirectă: < 0,8 mg/dl

Semnificație clinică

Bilirubina directă crește în:

- cauze hepatocelulare: hepatită, ciroză, leziuni toxice, infecții severe, insuficiență cardiacă dreaptă
- cauze colestatice: ficat gras, abces hepatic, tumori hepatice, sarcină, icter obstructiv
- cauze medicamentoase: indometacina, metildopa, tetraciclina, fenotiazine, estrogeni, steroizi anabolizanți, citostatice, tuberculostatice (icterul devine vizibil când bilirubina totală > 2mg%).

Bilirubina indirectă crește în:

- cauze hemolitice: anemie hemolitică, resorbția hematoamelor, infarct pulmonar, hemoragie intestinală, policitemia vera, hiperbilirubinemia de șunt

- cauze hepatocelulare: hepatită, ciroză, leziuni toxice, infecții severe, insuficiență cardiacă dreaptă, icter juvenil intermitent, hipertiroidie, șunt portocav, rifampicină, steroizi
- cauze colestatice: ficat gras, abces hepatic, tumori hepatice, sarcină, icter obstructiv (dar mult mai puțin decât bilirubina directă).