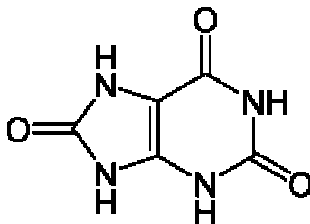


Oznaczanie kwasu moczowego kolorymetryczną metodą enzymatyczną z urykaza i peroksydazą

Wprowadzenie:

Kwas moczowy jest końcowym produktem degradacji puryn - zasad azotowych budujących kwasy nukleinowe DNA i RNA, a także występujących w pożywieniu. Proces ten zachodzi w wątrobie pod wpływem różnych enzymów.



Kwas moczowy jest usuwany z organizmu głównie przez nerki z moczem, ale w niewielkim stopniu również przez przewód pokarmowy (jelita). Zdrowy organizm reguluje poziom kwasu moczowego i jego stężenie mieści się w granicach normy (w zależności od źródeł 2,5-8 mg/dl). Jednak w różnych stanach chorobowych równowaga produkcji i wydalania kwasu moczowego może być zachwiana i obserwujemy zwiększenie stężenia kwasu moczowego powyżej przyjętej normy, czyli hiperurykemię, a w dużo rzadszych przypadkach obniżenie stężenia kwasu moczowego, czyli hipourykemię.

Nadmierne stężenie kwasu moczowego we krwi może być spowodowane jego zwiększoną produkcją w wątrobie (o charakterze pierwotnym lub wtórnym) lub zaburzeniami wydalania z organizmu przez nerki mogącymi wynikać z:

- wrodzonych defektów metabolizmu puryn (hiperurykemia pierwotna), np. zespół Lesh-Nyhana,
- zwiększonego spożywania pokarmów bogatych w puryny (dieta wysokobiałkowa): mięsa, niektórych owoców morza i jarzyn (szparagi, groch, szpinak, fasola),
- wielu chorób, np. dny moczanowej, niewydolności nerek, kamicy nerkowej i innych,
- rozpadu komórek np. nowotworowych po chemioterapii czy radioterapii (tzw. zespół lizy guza), chorób hematologicznych, niedokrwistości hemolitycznej,
- innych przyczyn, jak przyjmowanie niektórych leków, zawał serca, padaczka, duży wysiłek fizyczny, nadczynność przytarczyc, niedoczynność tarczycy, niewydolność oddechowa.

Obniżony poziom kwasu moczowego może być spowodowany m. in.:

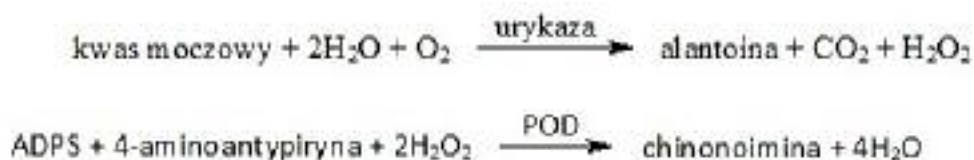
- wrodzonym niedoborem oksydazy ksantynowej – enzymu biorącego udział w przemianach puryn do kwasu moczowego,
- zespołem Schwartz-Barttera (zespół niewłaściwego uwalniania wazopresyny, SIADH),
- akromegalią,
- ciążą,
- wzmożonym wydalaniem kwasu moczowego przez nerki.

Najczęstszymi wskazaniami do wykonania badania stężenia kwasu moczowego jest diagnostyka dny moczanowej, monitorowanie leczenia u chorych na tę chorobę, monitorowanie chemioterapii i radioterapii nowotworów czy diagnozowanie kamicy nerkowej. Należy pamiętać, że interpretacja wyników badań laboratoryjnych powinna być dokonana przez lekarza oraz w odniesieniu do całości obrazu klinicznego pacjenta.

Kwas moczowy spełnia również kilka ważnych funkcji ochronnych w organizmie, m.in.:

- ma działanie antyoksydacyjne,
- może wykazywać korzystne działanie w chorobach neurodegeneracyjnych, jak stwardnienie rozsiane czy choroba Parkinsona,
- może pobudzać układ odpornościowy organizmu poprzez oddziaływanie na limfocyty T oraz komórki dendrytyczne.

Oznaczanie kwasu moczowego w surowicy krwi polega na enzymatycznym przekształceniu kwasu moczowego w alantoinę pod wpływem urykazy z równoczesnym wydzieleniem nadtlenu wodoru. W reakcji nadtlenu wodoru, w ilości proporcjonalnej do ilości kwasu moczowego, z mieszaniną reakcyjną peroksydaza / ADPS / 4-aminoantypiryna powstaje chinonoimina o czerwonym zabarwieniu. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do zawartości kwasu moczowego w badanej próbce.



Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości kwasu moczowego w płynach ustrojowych kolorymetryczną metodą enzymatyczną z udziałem urykazy i peroksydazy.

Sprzet i materiały:

- Roztwór wzorcowy kwasu moczowego 3-STANDARD o stężeniu 600 $\mu\text{mol/l}$ (10,1 mg/dl),
- Surowica krwi ludzkiej,
- Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia kwasu moczowego *Lquick Cor-UA* składa się z dwóch oddzielnych odczynników 1-UA i 2-UA. Skład i stężenie składników w odczynniku roboczym:
 - Bufor PIPES (pH 7,0) 100 mmol/l
 - 4-aminoantypiryna 0,78 mmol/l
 - ADPS 0,67 mmol/l
 - Urykaza > 1,65 $\mu\text{kat/l}$
 - Peroksydaza (POD) > 38,34 $\mu\text{kat/l}$
 - Żelazicyjanek potasowy 3,8 $\mu\text{mol/l}$
- 7 Probówek typu eppendorf,
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800 μl) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
- Wyrząsarka typu Vortex,
- Spektrofotometr.

Ostrzeżenia i uwagi:

Odczynniki są konserwowane azydkiem sodu (<0,1%). Unikać kontaktu odczynnika ze skórą i błonami śluzowymi. Stosować środki ochrony osobistej.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Próba odczynnikowa: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń 1-UA. Ogrzać do temperatury oznaczenia 25°C. Następnie dodać 250 μl odczynnika do oznaczeń 2-UA. Dokładnie wymieszać i przenieść 800 μl roztworu do kuwetki. Wykonać pomiary absorbancji próby wzorcowej i badanej względem próby odczynnikowej przy długości fali 546 nm.
2. Próba wzorcowa: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń 1-UA. Ogrzać do temperatury oznaczenia 25°C. Następnie dodać 20 μl roztworu wzorcowego. Dokładnie wymieszać i inkubować ok. 5 min. Następnie dodać 250 μl

odczynnika do oznaczeń 2-UA. Dokładnie wymieszać i przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Zmierzyć absorbancję próby wzorcowej względem próby odczynnikowej przy długości fali 546 nm. Obliczyć absorbancję. Pomiar wykonać dla czterech niezależnych prób.

3. Próba badana: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń 1-UA. Ogrzać do temperatury oznaczenia 25°C. Następnie dodać 20 µl roztworu badanego. Dokładnie wymieszać i inkubować ok. 5 min. Następnie dodać 250 µl odczynnika do oznaczeń 2-UA. Dokładnie wymieszać i przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Zmierzyć absorbancję próby badanej względem próby odczynnikowej przy długości fali 546 nm. Obliczyć absorbancję. Pomiar wykonać dla czterech niezależnych prób.

Próba Składnik próbki	Odczynnikowa (PO)	Wzorcowa (PW)	Badana (PB)
Odczynnik do oznaczeń 1-UA	1 ml	1 ml	1 ml
Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać:			
Roztwór wzorcowy	---	20 µl	---
Roztwór badany	---	---	20 µl
Dokładnie wymieszać i pozostawić na 5 min. w temperaturze pokojowej. Następnie dodać:			
Odczynnik do oznaczeń 2-UA	250 µl	250 µl	250 µl
Dokładnie wymieszać. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Pomiar absorbancji prób wzorcowych (PW) i prób badanych (PB) wykonać dla czterech niezależnych prób przy długości fali 546 nm względem próby odczynnikowej (PO) jako próby odniesienia.			

Opracowanie wyników:

- Obliczyć stężenie kwasu moczowego w badanej próbce korzystając ze wzoru:

$$\text{Stężenie kwasu moczowego} = A(\text{PB}) / A(\text{PW}) \times \text{stężenie wzorca}$$

WARTOŚCI PRAWDŁOWE (surowica/osocze)

Surowica / osocze	mg/dl	μmol/l
Kobiety	2,5-6,8	149-405
Mężczyźni	3,6-7,7	214-458

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

- Przeprowadzić analizę statystyczną wyników, obliczając średnią zawartość kwasu moczowego w próbce, odchylenie standardowe oraz procentowy błąd oznaczenia.

Literatura uzupełniająca:

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN Warszawa 1996.
2. A. Manz, N. Pamme, D. Iossifidis, *Bioanalytical Chemistry*, ICP, London 2004.
3. A. Dembińska Kieć, J.W. Naskalski, *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, Elsevier Urban & Partner, 2002.
4. L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.
5. L. Stryer, *Biochemia*, PWN Warszawa 1999.

Zagadnienia:

1. Kwas moczowy (budowa, poznanie zagrożeń wynikających z zachwiania równowagi kwasu moczowego w organizmie, metody jego oznaczania we krwi).
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).
3. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.