

DETERMINAREA CREATININEI URINARE LA PACIENȚII CU ALCAPTONURIE

Hlistun Victoria¹, Casian Igor^{1,2}, Casian Ana^{1,2}, Deleanu Calin^{3,4}, Nicolescu Alina^{3,4}, Ușurelu Natalia¹

¹Institutul Mamei și Copilului,

²Centrul Științific al Medicamentului, USMF „Nicolae Testemițanu”,

³Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” al Academiei Române, Iași, Romania,

⁴Centru de Chimie Organică “C. D. Nenitescu” al Academiei Române, București, Romania

Introducere

Nivelul creatininei urinare este utilizat pentru a recalcula concentrațiile multor metaboliți la estimarea vitezei de excreție a lor cu urina, în cazurile în care colectarea urinei nictemerale este dificilă. Metoda Jaffe, bazată pe reacția de reducere a anionului picrat în picramat cu creatinina și utilizată pe scară largă, este simplă și ieftină, dar nu-i suficient de selectivă față de alte substanțe reducătoare, care pot fi prezente în urina. La pacienții cu alcaptonurie (AKU), acidul homogentisic (HGA), un metabolit anormal, este excretat cu urina în cantități destul de mari. În condițiile metodei Jaffe, HGA nu interacționează imediat cu acidul picric, dar se oxidează în mediu alcalin cu oxigenul atmosferic, formând produse de culoare închisă (Fig. 1), fapt ce duce la rezultate majorate considerabil pentru creatinină.

Cuvinte-cheie: Creatinină, Alcaptonurie, Metoda Jaffe.

Scopul lucrării: Crearea unei variante a metodei Jaffe selective față de acidul homogentisic.

Materiale și Metode

Spectrofotometru UV-VIS "Lambda-25" (Perkin Elmer), probe de urină normală și de la pacienți cu alcaptonurie, substanțe de referință creatinină și HGA, reagenți (acid picric, hidroxid de sodiu).

Descrierea metodei elaborate:

Toate operațiunile s-au efectuat la temperatura aerului $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, adăugând probele și reactivivele la aceeași temperatură.

La 20 μl urină de analizat sau soluție standard creatinină ≈ 1 mg/ml (8.84 mMol/l) se adaugă 1.6 ml apă, 0.4 ml soluție acid picric 1% și, în ultimul rând, 0.4 ml soluție hidroxid de sodiu 0.75 Mol/l; se agită scurt. Exact după 3 minute de la adăugarea soluției hidroxid de sodiu se măsoare absorbanta optică la lungimile de undă 520 și 600 nm. Soluție de compensare se folosește proba preparată din 20 μl apă în loc de urină. Concentrația creatininei în urină (X , mMol/l) se calculează conform formulei:

$$X = C_{St} \cdot \frac{A_{U,520} - 2.3 \cdot A_{U,600}}{A_{St,520} - 2.3 \cdot A_{St,600}}$$

în care: C_{St} – concentrația soluției standard creatinină, mMol/l; $A_{U,520}$ și $A_{U,600}$ – valori de absorbanta optică a probei, preparate din urină, la 520 și 600 nm corespunzător; $A_{St,520}$ și $A_{St,600}$ – valori de absorbanta optică a probei, preparate din soluția standard creatinină, la aceleași lungimi de undă.

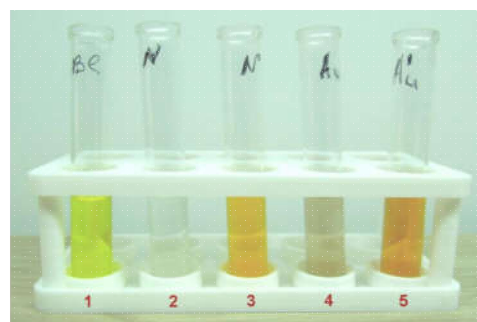


Fig. 1. Aspectul exterior al probelor:
1 – "blank" (acid picric + NaOH);
2 – Urina normală + NaOH;
3 – Urina normală + acid picric + NaOH;
4 – Urina cu HGA + NaOH;
5 – Urina cu HGA + acid picric + NaOH;

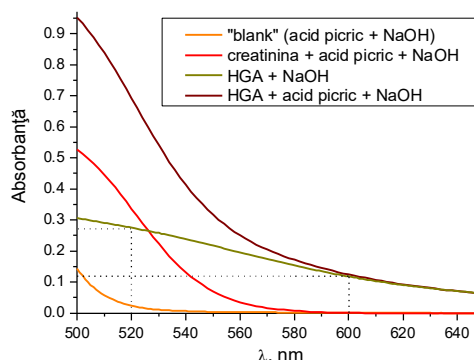


Fig. 2. Spectrele UV-VIS ale probelor model, preparate din soluțiile stoc de creatinină (8.84 mMol/l) și HGA (25 mMol/l).

Notă: Soluție de compensare s-a folosit apă pentru "blank" și "blank" pentru alte probe.

Rezultate

Pe bază analizei spectrelor UV-VIS ale probelor model (Fig. 2) s-au selectat 2 lungimi de undă pentru măsurare: 520 nm, utilizată și în metoda Jaffe tradițională datorită raportului optim dintre absorbanta acidului picramic (produsul reducerii acidului picric cu creatinina) și absorbanta de fon a reactivului, și 600 nm – în afara benzii de absorbanta a acidului picramic. Coeficientul 2.3 în formula de calcul este raportul dintre valorile absorbantei produselor de oxidare a HGA în mediu alcalin la 520 și 600 nm. Totodată s-a observat că, în prezența HGA, răspunsul analitic pentru creatinină scade în timp, probabil din cauza interacțiunii dintre acidul picramic și produsele intermediare a oxidării HGA de natură chinonă. Din acest motiv reacția trebuie de efectuat la temperatură constantă și în timp limitat.

Metoda propusă a fost testată pe probe de urină de la pacienții cu alcaptonurie (AKU 1, AKU 2, AKU 3, AKU 4) și cu fenilcetonurie (urină fără HGA) (Control 1, Control 2, Control 3), comparând rezultatele cu cele obținute prin metoda HPLC, utilizată ca metoda de referință (Tabelul 1). Metoda oferă rezultate veridice pentru creatinina urinară independent de prezența HGA.

Tabelul 1

Rezultatele analizei unor probe de urină de la pacienții cu alcaptonurie și fenilcetonurie prin diferite metode

Proba	Metoda Jaffe, cu 1 lungime de undă			Metoda Jaffe modificată, cu 2 lungimi de undă			Metoda de referință (HPLC)	
	Creatinină						Creatinină, mMol/l	HGA, mMol/l
	Valoarea medie, mMol/l	Abaterăa mediei ¹ , %	Precizia ² , %	Valoarea medie, mMol/l	Abaterăa mediei ¹ , %	Precizia ² , %		
AKU 1	15.7	76.2	0.87	8.49	-4.7	3.8	8.91	22.7
AKU 2	22.3	130	0.85	11.3	16.5	1.8	9.70	32.5
AKU 3	8.77	108	0.77	4.50	6.6	1.9	4.22	10.8
AKU 4	26.7	81.6	1.3	15.3	4.1	1.6	14.7	39.5
Control 1	3.82	5.8	1.3	3.89	7.8	1.1	3.61	n/d ³
Control 2	12.1	-5.5	1.7	12.8	0.0	1.8	12.8	n/d ³
Control 3	7.14	-3.8	0.61	7.29	-1.8	0.83	7.42	n/d ³

¹ Abaterăa mediei de la valoarea determinată prin metoda de referință;

² Precizia este exprimată ca coeficientul de variație al rezultatelor analizelor repetate a unei probe analizate;

³ n/d – n-a fost depistat.

Concluzii: A fost creată o variantă simplă și fiabilă a metodei Jaffe, cu măsurarea la 2 lungimi de undă, utilă pentru determinarea creatininei urinare la pacienții cu alcaptonurie.