

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

Laboratorul 9

METABOLISMUL PROTEIC. DETERMINAREA UREEI SERICE ȘI URINARE. DETERMINAREA CREATININEI DIN SER ȘI URINĂ.

1. Determinarea ureei

Prin dezaminarea aminoacizilor și catabolizarea acizilor nucleici rezultă amoniac. Amoniacul este o substanță neurotoxică, astfel că are o concentrație foarte mică în sânge ca atare, pentru că circulează în sânge sub formă de glutamină. Glutamina este captată de:

- rinichi, unde este hidrolizată la acid glutamic și amoniac, acesta formând ioni de amoniu (amoniogeneză) care sunt excretați urinar.
- ficat, unde amoniacul este transformat în uree prin procesul de ureogeneză.

Ureogeneza reprezintă procesul de transformare a amoniacului în uree, cu semnificație în eliminarea acestuia din organism. **Ureea este o substanță cu toxicitate mult redusă și foarte difuzibilă, care se elimină ușor în urină.** De aceea, ureogeneza trebuie socotită drept un proces de **transformare, de eliminare a amoniacului**. Ea reprezintă una din activitățile cele mai importante de sinteză desfășurate în organism, zilnic realizându-se 0,3-0,6 moli uree, ceea ce corespunde la aproximativ 20-35 grame de substanță.

Ureogeneza se desfășoară în cadrul unui șir de cinci reacții cuplate. Ureogeneza este un *proces parțial ciclic*, deoarece unul dintre produșii celei de-a cincea reacții, **ornitina**, este reactant în cea de-a doua reacție. Procesul are ca localizare specifică celula hepatică, desfășurându-se parțial în mitocondrii, în spațiul matricial (primele două reacții), apoi în citoplasmă (următoarele trei reacții) - datorită prezenței aici a tuturor enzimelor ce intervin în sinteză. Ureea rezultată difuzează în plasmă, fiind transportată sanguin la rinichi, calea principală de eliminare. Cantități mici de uree se elimină și prin intermediul glandelor sudoripare și pe cale intestinală, ceea ce se poate exacerba în condiții patologice.

Aplicație practică

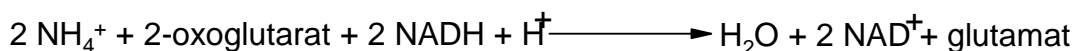
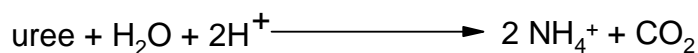
Determinarea ureei prin metoda enzimatică- testul optic

După îndepărtarea prin precipitare a proteinelor din sânge, în supernatant rămân o serie de substanțe neproteice, cu conținut de azot (azotul neproteic sau restant). Aceste substanțe sunt: ureea (15-50 mg%), acidul uric (2-8 mg%), creatinina (0,7-1,2 mg%), creatina, aminoacizi, colina, polipeptide, nucleotide, amoniacul, glutationul, histamina, etc. Dintre acestea, importanță clinică deosebită prezintă determinarea ureei, creatininei și a acidului uric.

Principiu

Ureea este hidrolizată în prezența ureazei la amoniac și CO₂. Amoniacul rezultat reacționează cu 2-oxoglutaratul și NADH în prezența glutamat dehidrogenazei (GLDH), cu formare de glutamat și NAD⁺. Reacția se urmărește prin măsurarea absorbției de radiație la 340 nm (se monitorizează astfel transformarea NADH, H⁺ în NAD⁺). Scăderea absorbției de

radiație datorată scăderii concentrației de NADH pe unitatea de timp este proporțională cu concentrația ureei.



Reactivi

1. Reactivul 1 (tampon): conține Tris, 80 mmoli/l, pH 8,0; 2-oxoglutarat 5 mmoli/l.
2. Reactivul 2 (enzimatic): conține urează >100U/ml; GLDH 6000 U/l; NADH 0,32 mmoli/l.
3. Reactivul 4 (standard): uree 50 mg/l (8,325 mmoli/l).
4. Reactiv de lucru: se prepară adăugând 1 flacon de reactiv 2 într-un flacon cu reactivul 1 (soluția tampon), după care se agită ușor timp de 30 minute. Soluția de lucru este stabilă timp de 14 zile la o temperatură de 2-8°C, sau 3 zile la 20-25°C.

Probe biologice: ser, plasmă (recoltată pe anticoagulant-heparina; nu se utilizează anticoagulanți ce conțin fluorură - inhibă activitatea ureazei, sau ioni de amoniu - interferează cu dozarea); **urină** - se diluează cu apă bidistilată, în raport de 1:50.

Mod de lucru

În două eprubete se pipetează conform tabelului:

Reactivi, μl	Standard	Proba ser	Proba urină
Reactiv de lucru	1000	1000	1000
Standard	100	—	—
Proba ser	—	100	-
Proba urină (diluată 1/50)	—	-	100

Se execută pe rând analiza standardului și a probelor, metoda fiind cinetică. După amestecul reactanților pentru standard se citește, în dinamică, absorbția de radiație a acestuia la **340 nm** (în cuve cu grosimea de strat de 1 cm), la timpul 0 și la 1 minut și 30 sec. Se prepară probele (serul, respectiv urina) și se citește absorbția de radiație la 340 nm în același mod ca pentru standard.

Etalonarea spectrofotometrului se face față de cuva goală.

Calcul

$$\text{uree în ser mg / 100 ml} = \Delta E_P / \Delta E_S \times 50$$

unde: ΔE_P = variația absorbției de radiație a probei;
 ΔE_S = variația absorbției de radiație a standardului;
 50 mg/dl = concentrația standardului.

Concentrația ureei în urină (grame uree/urina de 24 ore):

$$\frac{\frac{\Delta E_P}{\Delta E_S} \times 50 (\text{mg/dl}) \times \frac{\text{diureza (l)}}{0,1} \times 50}{1000} = \text{g uree/urina de 24 ore}$$

unde: ΔE_P = variația absorbției de radiație a probei;
 ΔE_S = variația absorbției de radiație a standardului;

50 mg/dl = concentrația standardului.

Valori normale

Ser: 15 - 45 mg/ 100ml (2,5 - 7,51 mmol/l)

Urina pe 24 ore: 20 - 36 g (330 - 600 mmol).

Variații fiziologice în sânge

Valoarea ureei sanguine este dependentă de aportul proteic alimentar, volumul de urină excretată și de starea funcțională a rinichiului. Variația ureei sanguine în funcție de aportul proteic este ilustrată în tabelul de mai jos:

Aport proteic g/kg masă corporală / zi	Valori normale mg uree/100 ml ser
0,5	13 – 25
1,5	24 – 52
2,5	31 – 59

Variații patologice în sânge

Valori crescute se întâlnesc în: **insuficiența renală acută și cronică (numai dacă și creatinina este crescută în sânge, ureea urinară este scăzută)**, anurii extrarenale: insuficiență cardiacă, boli infecțioase acute, hemoragii gastro-intestinale, encefalite, diabet zaharat, boala Addison, deshidratări prin vărsături și diaree masivă (azotemie prin lipsă de sare), etc.

Valori scăzute se întâlnesc în: stadiul final al insuficienței hepatice decompensate (coma hepatică)

Variații fiziologice în urină

Ureea urinară variază mult în funcție de regimul alimentar astfel încât, luată izolat, valoarea este fără semnificație clinică. Ea crește în regim bogat în proteine și scade în regim vegetarian, astfel încât eliminarea urinară de uree este de 20-35 g/zi pentru un regim alimentar normal și de numai 10 g/zi pentru un regim alimentar lipsit de proteine. Raportată la valoarea ureei sanguine și la diureză, determinarea ureei în urină servește în special la stabilirea coeficienților de eliminare.

Variații patologice în urină

Valori crescute se întâlnesc în hipercatabolism protidic.

Valori scăzute se întâlnesc în insuficiența renală acută și cronică, precum și în insuficiența hepatică decompensată.

2. Determinarea creatininei

Creatinina provine din transformarea prin deshidratare a creatinei (este anhidrida creatinei).

Sinteza creatinei începe în rinichi și continuă în ficat. Din ficat este transportată pe cale sanguină spre mușchi și creier. În mușchi creatina se află sub formă de **creatin fosfat (compus macroergic) care reprezintă rezerva energetică a mușchiului. Creatin fosfatul din mușchi este deshidratat și defosforilat la creatinină, care este eliminată pe cale renală și care reprezintă o formă de eliminare a azotului din organism.**

Creatinina se elimină prin urină și de aceea **determinarea creatininei serice și urinare are o importanță deosebită în practica medicală pentru investigarea funcției renale. Pentru că este produsă în totalitate în mușchi, cantitatea de creatinină formată este**

proporțională cu masa musculară, nefiind afectată de alți factori fiziologici. Din acest motiv se consideră **creatinina** ca fiind **metabolitul cu concentrația cea mai stabilă**. Acest lucru permite utilizarea ei ca **marker al filtrării glomerulare**.

Aplicație practică

Determinarea creatininei cu metoda Jaffe (variantea Popper-Mandel-Mayer)

Creatinina din proba biologică reacționează, în mediu alcalin, cu acidul picric formând un complex de picrat de creatinină de culoare roșu-portocaliu, cu maxim de absorbție la 520 nm, direct proporțional cu cantitatea de creatinină din probă.

Este o metodă foarte simplă dar are dezavantajul interferenței cu numeroase substanțe: acid ascorbic, piruvat, acetona, acidul acetoacetic, glucoză, acidul uric, proteinele, antibioticele, levuloza.

Aceste substanțe, numite cromogeni necreatinici, pot conduce în cazul prezenței lor în ser la interferențe de peste 20%. Acești cromogeni necreatinici nu influențează determinarea creatininei în urină.

În timp au fost elaborate variante ale reacției Jaffé ce urmăresc eliminarea acestor interferenți (variantele cinetice-viteza de reacție a creatininei este mai mare decât a cromogenilor).

Această variantă utilizează acidul picric atât ca deproteinizant cât și ca reactiv de culoare.

Reactivi

1. soluție acid picric 1,2%.
2. soluție de hidroxid de sodiu 10%.
3. soluție standard de creatinină 2 mg/100 ml în HCl 0,1N.
4. Proba de ser, plasmă (sânge recoltat pe anticoagulant-heparină),
5. Proba de urină: urina diluată 1/100 cu ser fiziologic!

Mod de lucru

În 4 eprubete se pipetează conform tabelului:

Reactivi, ml	P _{ser}	P _{urină}	Standard	Martor
Ser	0,2	-	-	-
Urină	-	0,2	-	-
Standard	-	-	0,20	-
Apă distilată	-	-	-	0,20
Acid picric	0,6	0,6	0,6	0,6
NaOH	0,1	0,1	0,1	0,1

Se agită, se lasă în repaus 20 minute și se măsoară absorbțiile P_{ser}, P_{urină} și standard față de martor la 530 nm.

Calcul

În ser: mg creatinină/100 ml ser = $E_{\text{ser}}/E_{\text{std}} \times 2$

În urină: mg creatinină/ 24 ore = $(E_{\text{Purina}}/E_{\text{std}} \times 2) \times \text{volum urinar (mL) pe 24 ore}$

Valori normale:

Ser: Femei: < 0,9 mg/dl (< 80 μmol/l)

Bărbați: < 1,1 mg/dl (< 97 μmol/l)

Urină: 0,6 - 1,8 g/24 ore (5,3 - 16 mmol/24 ore).

Valori patologice

Creatininemia crește în nefropatii acute și cronice, boli consumptive grave, boli ce afectează musculatura (miastenia gravis, distrofia musculară progresivă).

Pentru că creatininemia depinde numai de masa musculară și de eliminarea sa renală prin filtrare glomerulară, determinarea creatininei în ser și urină și calcularea clearance-ului creatininei endogene reprezintă metode de apreciere a funcției renale.

Clearance-ul de creatinină exprimă volumul de plasmă filtrat de rinichi într-un minut.

Calculul clearance-ului creatininei endogene

$$\text{Clearance creatinină (ml/min)} = (U \times V) / (P \times 1440)$$

Unde: U = concentrația creatininei în urina (în mg/100 mL);

V = volumul de urină pe 24 ore (în mL);

P = concentrația creatininei în ser (mg/100mL);

1440 = numărul de minute din 24 de ore.

Valori normale

95 - 150 ml/min.

Valori patologice

Clearance-ul creatininei scade, în nefropatiile acute și cronice, înainte de creșterea creatininei serice.