



Dusíkaté látky nebílkovinné povahy

Ing. Martina Podborská, Ph.D.

OKB FN Brno

Zpracováno s pomocí přednášek RNDr. Petra Breineka

Školní rok 2015/2016

Ledviny

□ hlavní exkreční orgán

□ **hlavní fce:**

✓ tvorba a vylučování moče:

- vodorozpustné odpadní a toxické látky
- produkty metabolismu

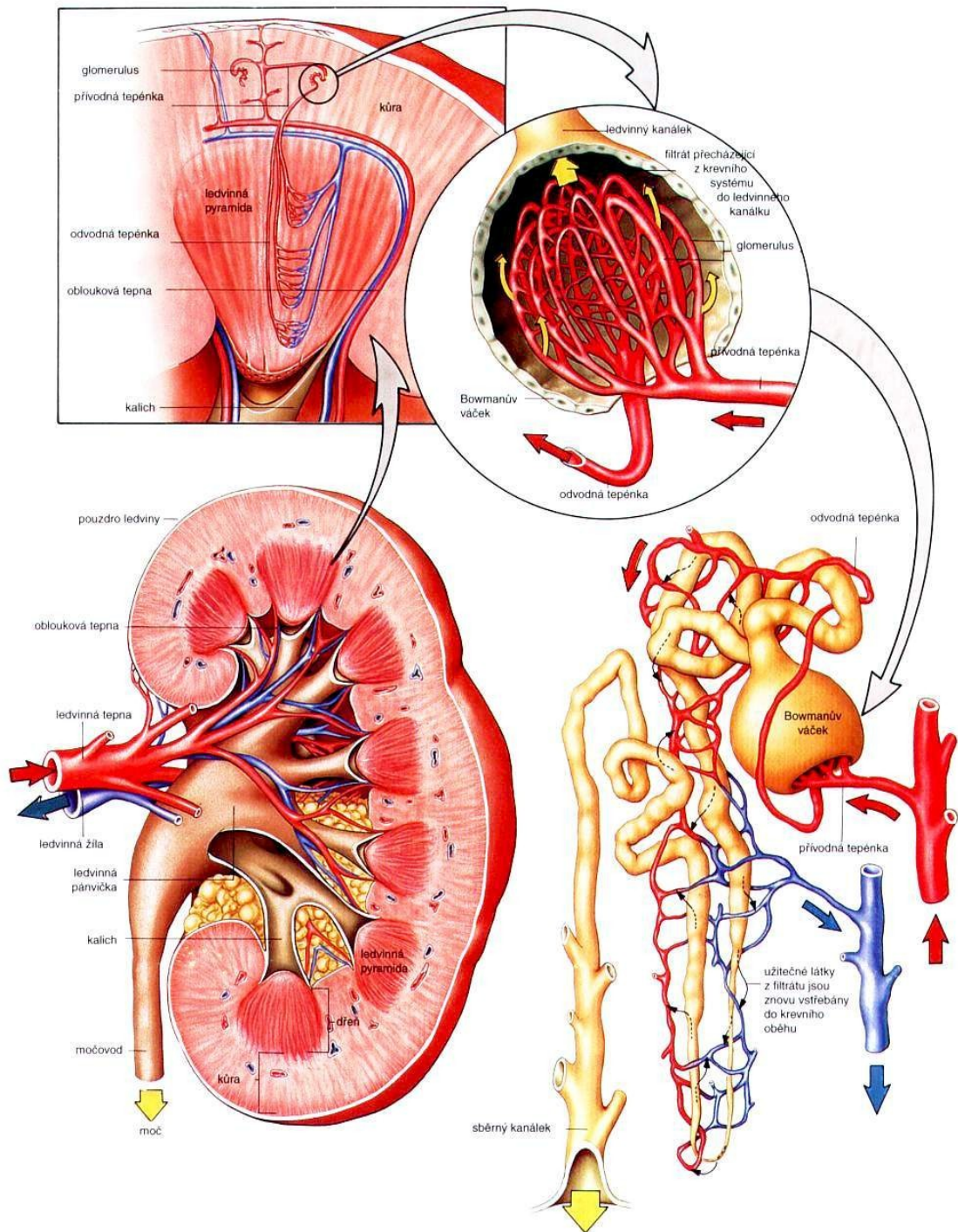
✓ regulační fce udržení homeostázy

✓ ovlivňují metabolismus vody a iontů, osmolalitu a acidobazickou rovnováhu organismu

✓ místem tvorby erythropoetinu

✓ tvorba aktivní formy vit. D

□ **k posouzení fce a chorob ledvin mohou sloužit následující biochemické parametry**



Hlavní dusíkaté látky nebílkovinné povahy

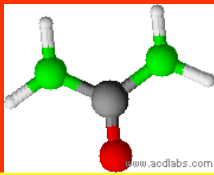
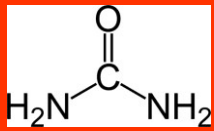
Analyt	Zdroj	Klinický význam
Močovina (urea)	Amoniak	<ul style="list-style-type: none">• Onemocnění ledvin• Onemocnění jater
Kreatinin	Kreatin	<ul style="list-style-type: none">• Onemocnění ledvin
Kyselina močová	Purinové nukleotidy	<ul style="list-style-type: none">• Zvýšený rozpad buněk• Poruchy metabolismu purinů
Amoniak	Aminokyseliny	<ul style="list-style-type: none">• Onemocnění jater• Onemocnění ledvin• Dědičné poruchy urosyntetického cyklu
Aminokyseliny	Bílkoviny	<ul style="list-style-type: none">• Onemocnění jater• Onemocnění ledvin• Dědičné poruchy metabolismu aminokyselin

Hlavní dusíkaté látky nebílkovinné povahy

- ❑ nejčastěji se jedná o odpadní látky, výjimku tvoří aminokyseliny
- ❑ jako odpadní látky jsou z organismu vylučovány močí
- ❑ o jejich účinné exkreci rozhoduje především **glomerulární filtrace**
- ❑ chorobné stavy, které vedou k jejímu poklesu působí tzv. **retenci těchto dusíkatých látek**
- ❑ jejich hromadění v organismu ➡ vzestup jejich koncentrace v plazmě ➡ vznik tzv. **hyperazotémie**
- ❑ zvláště hodnota **močoviny** a **kreatininu** se proto používá k **diagnostice a sledování průběhu ledvinových chorob**

Jaké jsou doporučené metody?

Analyt	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál
Močovina (urea)	ID-GC/MS ID-LC/MS	<ul style="list-style-type: none">• SRM 909b NIST• NIST/SRM 912a
Kreatinin	ID-GC/MS ID-LC/MS	<ul style="list-style-type: none">• SRM-NIST 967• SRM 909b NIST• NIST/SRM 914a
Kyselina močová	ID-GC/MS HPLC	<ul style="list-style-type: none">• SRM 909b NIST• NIST/SRM 913a
Cystatin C	IFCC/IRMM metoda	<ul style="list-style-type: none">• ERM DA471/IFCC



Močovina (urea)

- je konečným produktem metabolismu bílkovin (aminokyselin) – detoxikace NH_3 :

Proteiny



Aminokyseliny



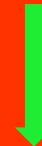
Močovinový cyklus (játra)



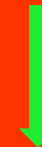
Močovina (krev \longrightarrow moč)
(ledviny)

α -aminokyselina

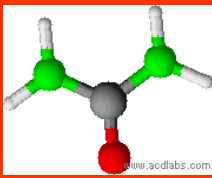
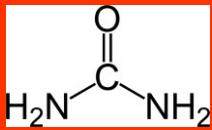
oxidativní desaminace



α -ketokyselina + NH_3

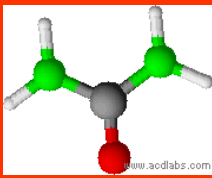
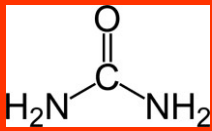


Močovina (moč)



Močovina (urea)

- **vzniká v játrech** (cca 16g/d= 0,5-0,7 mol/d) v močovinovém cyklu (metabolizováním 2,9 g bílkovin vzniká 1g močoviny)
- **vylučuje se glomerulární filtrací** močí (na rozdíl od kreatininu je zpětně resorbována), malá část je metabolizována ve střevě
- v proximálním tubulu se **zpětně resorbuje 40-50% profiltrované močoviny**, v distálním tubulu závisí resorpce na tom, zda je vylučována koncentrovaná nebo zředěná moč (dehydratace organismu se projevuje vzestupem močoviny)
- **klinické využití:**
 - ✓ **stanovení v séru** - diagnostika ledvinových chorob a sledování jejich průběhu
 - ✓ **stanovení v moči** – odhad stupně katabolismu bílkovin u kriticky nemocných pacientů, sledování dusíkové bilance



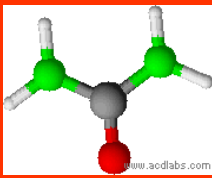
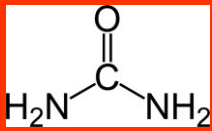
Močovina (urea)

□ koncentrace v krvi závisí na:

- ✓ vylučování močoviny ledvinami v moči
- ✓ její tvorbě (zvýšený rozpad proteinů → horečka, sepse, hladovění)
- ✓ obsah proteinů v dietě

□ referenční rozmezí:

- ✓ S-močovina: **Muži: 2,0-8,3 mmol/l**
Ženy: 2,0 – 6,7 mmol/l
- ✓ dU-močovina: **167- 583 mmol/24h**



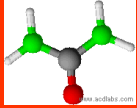
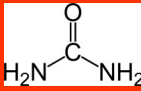
Močovina (urea)

□ zvýšená koncentrace v séru může být také způsobena:

- ✓ zvýšeným příjmem bílkovin v potravě
- ✓ zvýšeným katabolismem bílkovin u závažně nemocných pacientů
- ✓ zahuštěním vnitřního prostředí při dehydrataci
- ✓ snížením glomerulární filtrace při hypovolémii (extrarenální urémie)

□ snížená koncentrace v séru může být také způsobena:

- ✓ nízkým příjmem bílkovin v potravě (proteinová malnutrice)
- ✓ těžkou poruchou funkce jater - jaterní selhání (nedostatečná tvorba močoviny)
- ✓ hyperhydratací; retencí vody (infuzní léčba, gravidita)



Močovina (urea) – metody stanovení

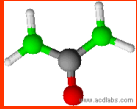
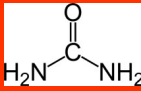
1. Referenční metody:

a) ID-GC/MS a ID-LC/MS

- ✓ standardní přidání značené močoviny (izotopová diluce) do analyzovaného vzorku a následné stanovení kombinací GC/LC-MS

b) HPLC

- ✓ vysokoúčinná kapalinová chromatografie



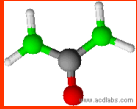
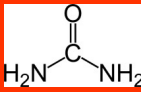
Močovina (urea) – metody stanovení

2. Doporučená rutinní metoda - **enzymová**:

- ✓ kinetický test s ureázou a glutamátdehydrogenázou (GMD):

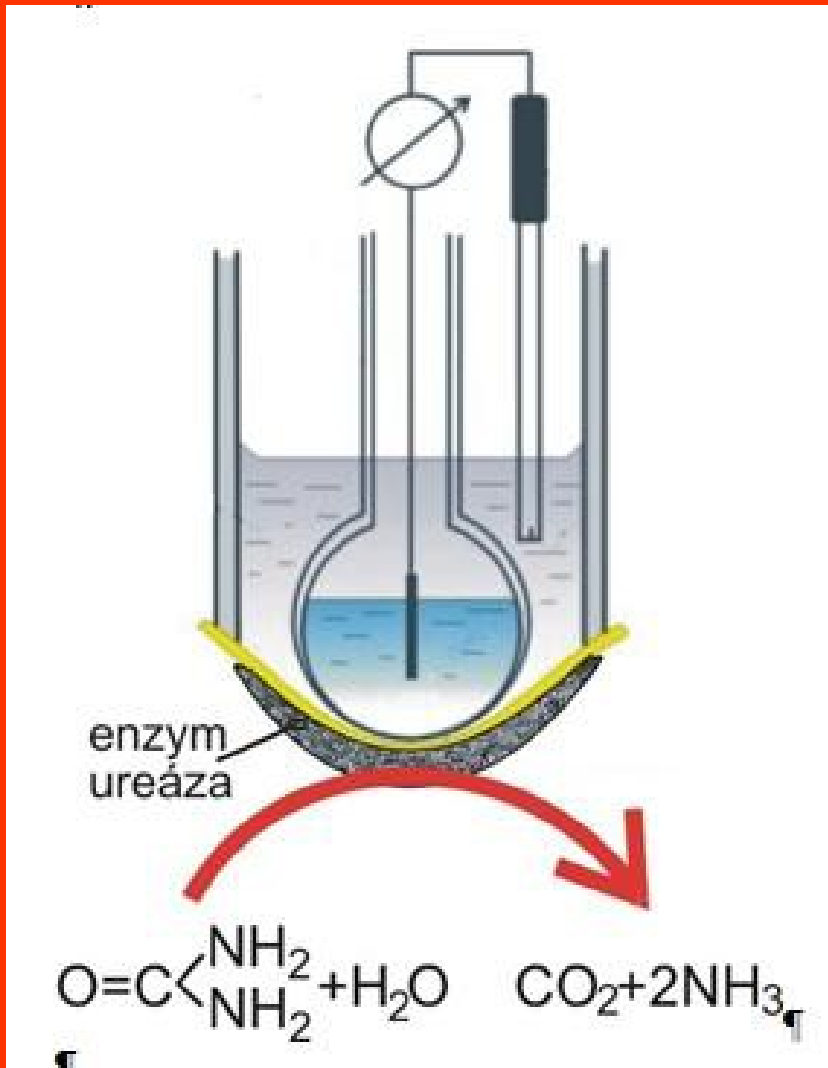


- ✓ rychlost poklesu koncentrace NADH je přímo úměrná koncentraci močoviny ve vzorku a měří se fotometricky při 340 nm

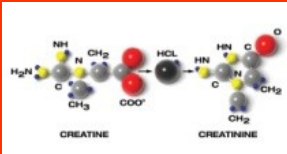
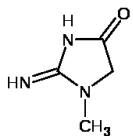


Močovina (urea) – metody stanovení

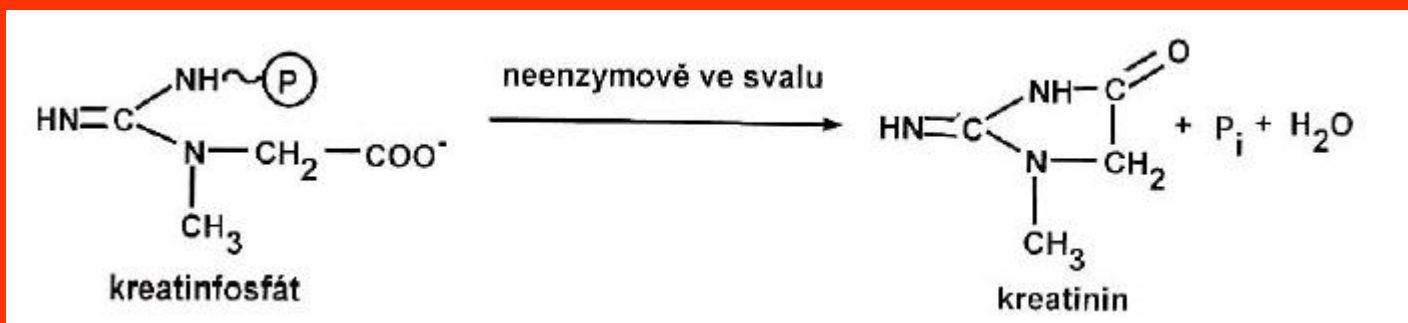
3. Elektrochemické metody (biosenzory):

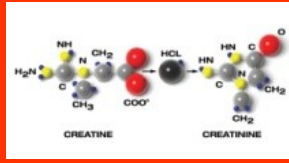
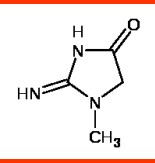


Kreatinin



- vzniká ve svalové tkáni jako konečný produkt přeměny svalového **kreatinu** (dehydratace)
- kreatin vzniká v játrech, pankreatu a ledvinách, podílí se na tvorbě energie potřebné ke kontrakci svalů





Kreatinin

□ klinické využití:

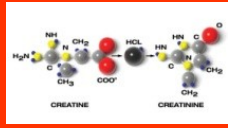
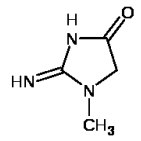
- ✓ **stanovení v séru** - diagnostika ledvinových chorob a sledování jejich průběhu
- ✓ **stanovení v moči** – hodnota pro výpočet kreatininové clearance

□ koncentrace v séru závisí na:

- ✓ na jeho vylučování glomerulární filtrací ledvinami
- ✓ na jeho syntéze ze svalového kreatinu (svalová hmota)

□ referenční rozmezí:

- ✓ **S-kreatinin:** Muži: 60 – 100 $\mu\text{mol/l}$
 Ženy: 50 – 90 $\mu\text{mol/l}$
- ✓ **dU-kreatinin:** 8,8 – 15,0 mmol/24h

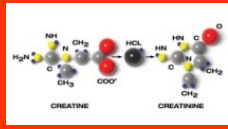
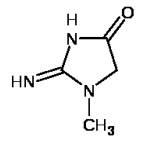


Kreatinin – metody stanovení

1. Referenční metody:

a) ID-GC/MS a ID-LC/MS

- ✓ standardní přidání značeného kreatininu (izotopová diluce) do analyzovaného vzorku a následné stanovení kombinací GC/LC-MS
- ✓ Certifikovaný referenční materiál: **SRM-NIST 967**



Kreatinin – metody stanovení

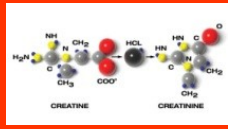
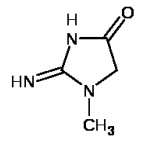
2. Doporučené rutinní metody - enzymové stanovení:

2.1 Stanovení kreatinu vzniklého z kreatininu:

- a) kreatinináza/kreatináza/SOX (sarkosinoxidáza)/POD (peroxidáza)
- b) kreatinináza/CK (kreatinkináza)/PK (pyruvátkynáza)/LD (laktátdehydrogenáza)

2.2 Stanovení amoniaku vzniklého z kreatininu:

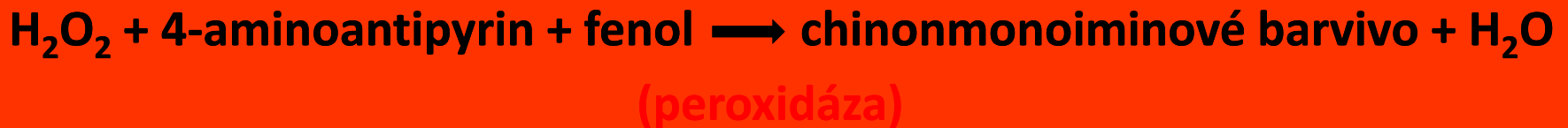
- ✓ kreatininiminohydroláza/GIDH (glutamátdehydrogenáza)



Kreatinin – metody stanovení

2. Doporučené rutinní metody - enzymové stanovení:

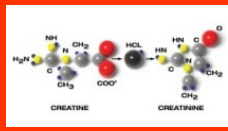
2.1 a) Stanovení kreatinu vzniklého z kreatininu:



✓ absorbance vzniklého barviva je úměrná koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku

✓ reakční uspořádání musí eliminovat endogenní kreatin přítomný v analyzovaném vzorku

✓ rušící vliv kyseliny askorbové se odstraňuje přidavkem askorbát oxidázy (AOX)



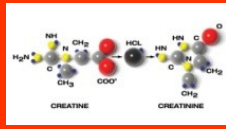
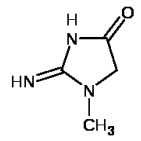
Kreatinin – metody stanovení

2. Doporučené rutinní metody - enzymové stanovení:

2.1 b) Stanovení kreatinu vzniklého z kreatininu:



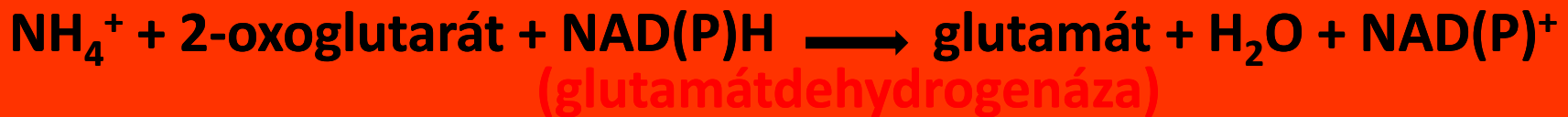
✓ pokles absorbance při 340 nm způsobený úbytkem NADH je úměrný koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku



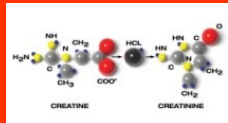
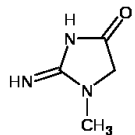
Kreatinin – metody stanovení

2. Doporučené rutinní metody - enzymové stanovení:

2.2 Stanovení amoniaku vzniklého z kreatininu:



- ✓ sleduje se spektrofotometricky pokles absorbance NAD(P)H při 340 nm (optický test), který je úměrný koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku
- ✓ výsledek musí být korigován na obsah přítomného amoniaku v analyzovaném vzorku

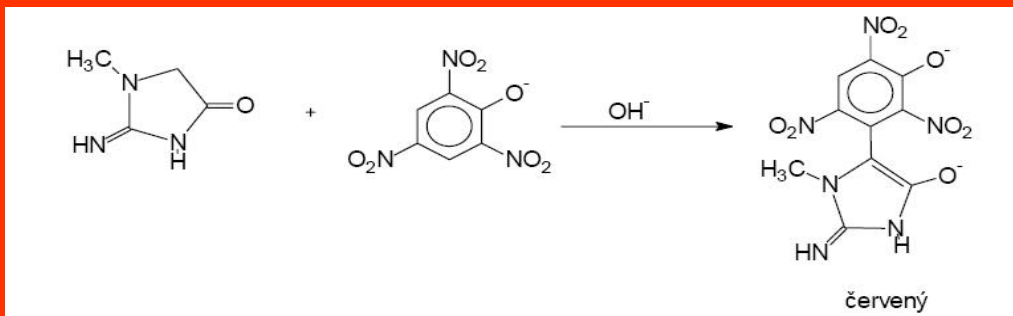


Kreatinin – metody stanovení

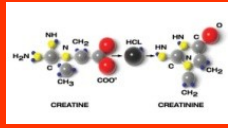
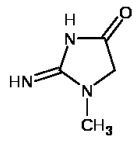
3. Doporučené rutinní metody – používající Jaffého reakci:

alkalický
roztok
(NaOH); pH>7

kreatinin + kyselina pikrová \longrightarrow komplex kreatinin-kyselina pikrová



- ✓ rychlost tvorby barevného komplexu je přímo úměrná koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku
- ✓ nespecifičnost měření
- ✓ reagují: proteiny, ketony, bilirubin, některé léky,...

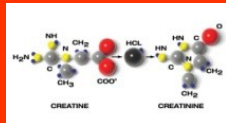
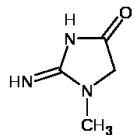


Kreatinin – metody stanovení

3. Doporučené rutinní metody – používající Jaffého reakci:

Minimální požadavek pro používání:

- ✓ metrologická návaznost (SRM-NIST 967)
- ✓ návaznost na referenční metodu (ID-GC/MS)
- ✓ matematická korekce (odečet pseudokreatininových chromogenů)
- ✓ **Jaffého metody v pediatrii jsou pro výpočet eGFR nevhodné**
- ✓ **pro stanovení kreatinu v moči lze považovat metody enzymatické a Jaffého za rovnocenné**

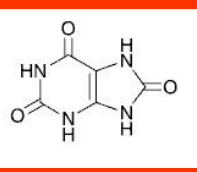


Kreatinin – metody stanovení

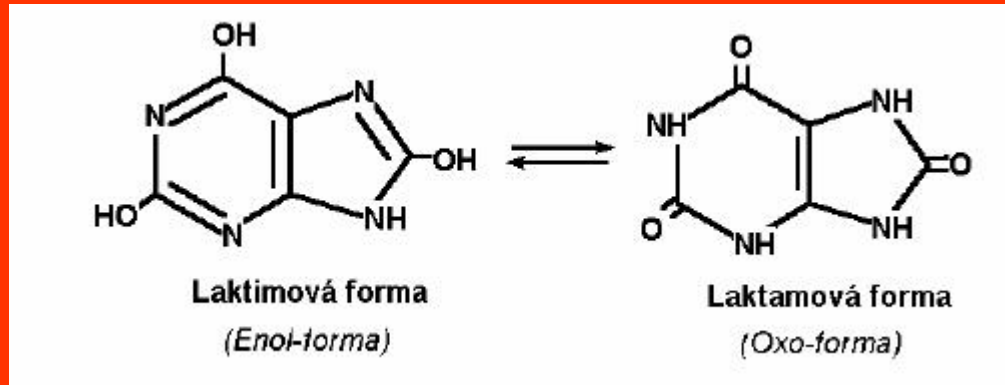
4. Jiné metody:

- Elektrochemické metody (biosenzory)
- HPLC
- CE

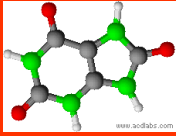
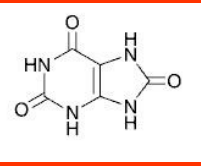




Kyselina močová (2,6,8-trioxypurin)

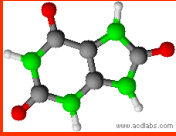
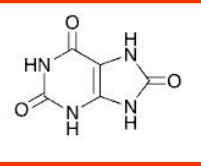


- u člověka je **konečným produktem metabolismu purinů**
 - ✓ puriny jsou součástí nukleových kyselin (DNA), do krve se dostávají z potravy nebo při rozpadu a obnově buněk těla
- je málo rozpustná a cirkuluje v krvi v hladinách blízkých hodnotě, při které již není rozpustná (sodná sůl je rozpustnější (uráty))
- u lidí a primátů **chybí enzym urikáza**, která umožňuje přeměnu kyseliny močové na lépe rozpustný allantoin



Kyselina močová (2,6,8-trioxypurin)

- je vylučována z 1/3 zažívacím traktem a ze 2/3 ledvinami; není to jen látka odpadní, má význačný **antioxidační účinek**
- **klinické využití: diagnostika hyperurikémie**
 - ✓ dna
 - ✓ rizikový faktor u aterosklerózy
 - ✓ léčba cytostatiky (leukémie, lymfomy)
 - ✓ hyperurikémie jako součást retence dusíkatých látek při renální insuficienci



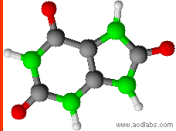
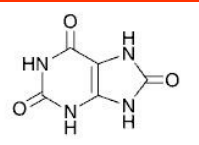
Kyselina močová (2,6,8-trioxypurin)

□ koncentrace v krvi závisí na:

- ✓ její produkci - **potrava bohatá na maso**
- ✓ zvýšená produkce např. při zvýšeném rozpadu buněk (leukémie, léčena cytostatiky)
- ✓ vylučování ledvinami močí

□ referenční rozmezí:

- ✓ S-kyselina močová: Muži: 200 – 420 $\mu\text{mol/l}$
 Ženy: 140 – 340 $\mu\text{mol/l}$
- ✓ dU-kyselina močová: 0,5 – 6,0 mmol/24h



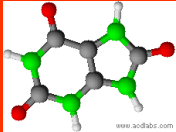
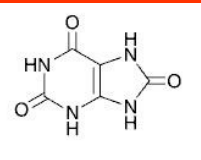
Kyselina močová – metody stanovení

1. Referenční metody:

a) ID-GC-MS

- ✓ standardní přidání značené 1,3-¹⁵N kyseliny močové (izotopová diluce) do analyzovaného vzorku a následné stanovení GC-MS
- ✓ Certifikovaný referenční materiál: **SRM 909b NIST, NIST/SRM 913a USA**

b) HPLC

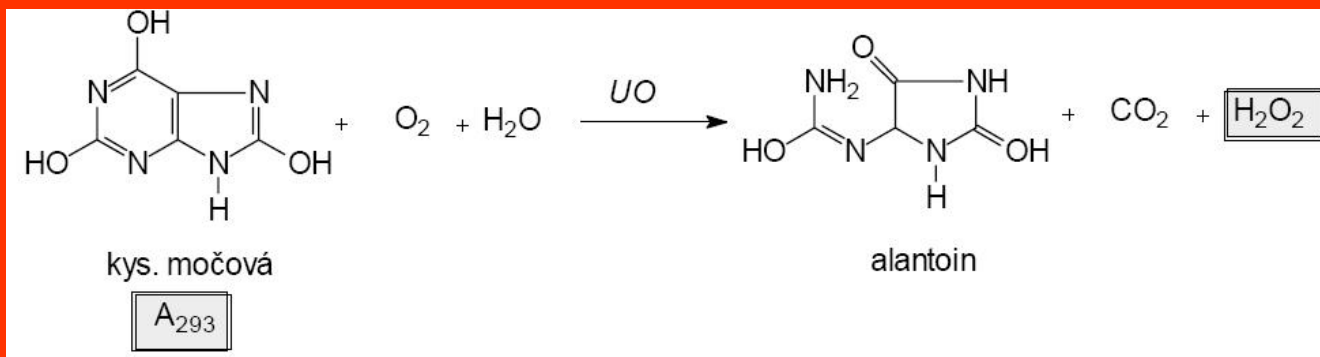


Kyselina močová – metody stanovení

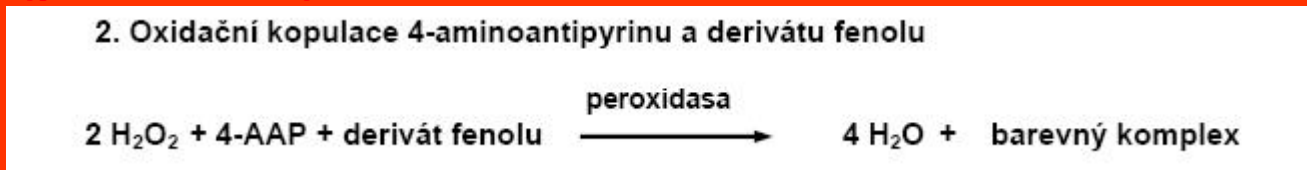
2. Doporučená rutinní metoda – enzymové stanovení:

□ používající enzymy **urikázu a peroxidázu**:

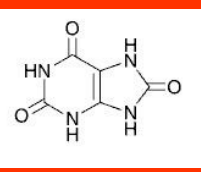
kyselina močová + O₂ + 2H₂O \longrightarrow **allantoin** + CO₂ + H₂O₂ (**urikáza**)



H₂O₂ + 4-aminoantipyrin + derivát fenolu \longrightarrow H₂O + **chinonmonoiminové barvivo** (**peroxidáza**)



✓ **barevný komplex je přímo úměrný koncentraci kyseliny močové a stanovuje se spektrofotometricky v analyzovaném vzorku**



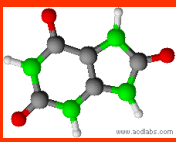
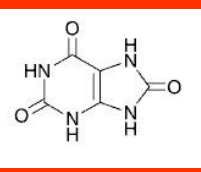
Kyselina močová – metody stanovení

3. Jiné metody – enzymové stanovení:

- používající enzymy **urikázu a katalázu**:



- ✓ vznik žlutého derivátu dihydrolutidinu - **Hantschova kondenzační reakce** (stanovení absorbance při 405 nm)



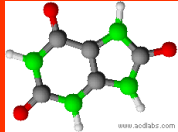
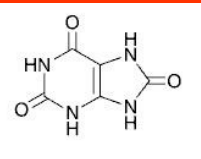
Kyselina močová – metody stanovení

4. Jiné metody – enzymové stanovení:

- používající enzym **urikázu /UV metoda:**



- ✓ jedno z absorpčních maxim kyseliny močové je při **293 nm** (UV oblast)
- ✓ allantoin vzniklý oxidací kyseliny močové při této vlnové délce **neabsorbuje**
- ✓ koncentraci kyseliny močové = **úbytek absorbance při 293 nm před a po přidání urikázy** k analyzovanému vzorku



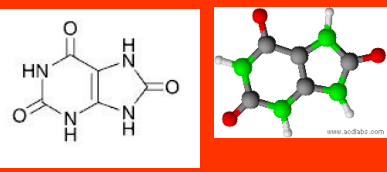
Kyselina močová – metody stanovení

5. Elektrochemické metody:

□ **přímá potenciometrie:**

- ✓ měření úbytku O_2 Clarkovou elektrodou po přidání urikázy k reakční směsi obsahující analyzovaný vzorek

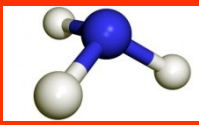
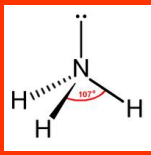
□ **enzymové elektrody (biosenzory)**



Kyselina močová – metody stanovení

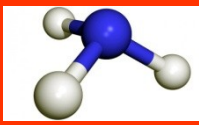
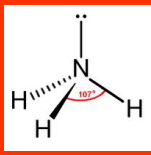
6. Chemické metody:

- **založené na redukčních vlastnostech kyseliny močové:**
 - ✓ redukce kyseliny fosfowolframové v alkalickém prostředí za **vzniku molybdenové modři** nebo redukci železitých nebo měďnatých iontů na železnaté a měďné, které se stanovují **specifickými činidly** (deriváty fenantrolinu nebo kuproinu) **za vzniku barevných komplexů**
 - ✓ všechny tyto metody jsou nespecifické a pro kvantitativní stanovení kyseliny močové **se již nepoužívají**



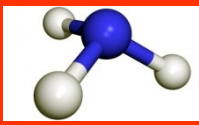
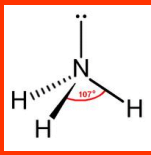
Amoniak (NH₃)

- amonné kationty NH₄⁺
- vzniká při **degradaci bílkovin (katabolismu aminokyselin; oxidativní deaminace)** ve všech tkáních, především **v játrech** (také v ledvinách a svalech).
 - ✓ nezanedbatelným zdrojem amoniaku je také rozklad bílkovin bakteriálními enzymy ve střevě
- **je toxický, v játrech je přeměňován na močovinu a glutamin**
 - ✓ v mozku a jiných tkáních, které nemají schopnost tvořit močovinu, se amoniak detoxikuje transaminační reakcí s 2-oxoglutarátem, za vzniku glutamátu



Amoniak (NH₃)

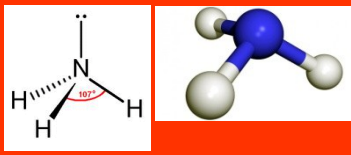
- Dva hlavní zdroje amoniaku v organismu:
 - ✓ **dehydrogenační deaminace glutamátu** v buňkách většiny tkání
 - ✓ **bakteriální fermentace proteinů** v tlustém střevě
amoniak difuzí přechází do portální krve → portální krev má relativně vysokou koncentraci NH₃
→ odstraněn játry



Amoniak (NH₃)

□ **Zvýšená koncentrace v plazmě:**

- ✓ **závažná onemocnění jater (př. selhání jater - akutní nebo chronické těžké poškození jater)**
- ✓ snížení průtoku krve játry
- ✓ při vrozených poruchách enzymů v močovinovém cyklu
- ✓ Reyeův syndrom (vzácné poškození krve, jater a mozku, většina případů je vyvolána virovou infekcí)
- ✓ selhání ledvin



Amoniak (NH₃)

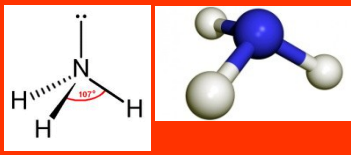
❑ Preanalytická fáze:

- ✓ stanovení z plazmy (nesrážlivá krev)
- ✓ krev se musí po odběru ihned zchladit a zpracovat co nejdříve (centrifugovat v chlazené centrifuze, do 20 min oddělit plazmu od krevních elementů), neboť hrozí falešně zvýšené hodnoty

❑ Referenční rozmezí:

- ✓ P-amoniak: 18 – 72 μmol/l
Muži: 15 – 55 μmol/l
Ženy: 11 – 48 μmol/l

❑ Certifikovaný referenční materiál: není k dispozici



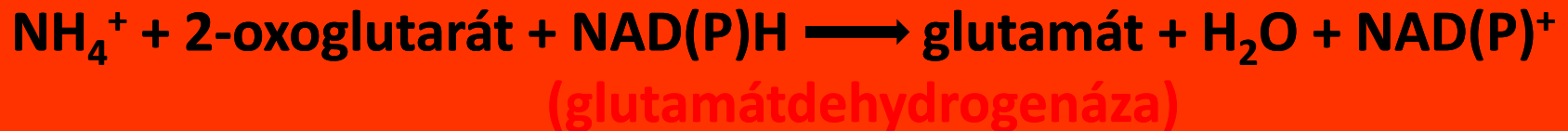
Amoniak (NH₃) – metody stanovení

1. Referenční metoda: není k dispozici

2. Doporučená rutinní metoda:

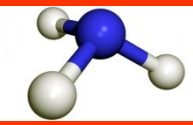
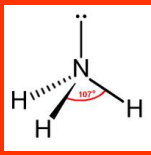
2.1 Enzymové stanovení:

□ používající enzym **GMD (glutamátdehydrogenázu)/UV:**



✓ spektrofotometricky se stanoví pokles absorbance, která je úměrná množství přeměněného NADH na NAD⁺ při 340 nm

✓ pokles absorbance je přímo úměrný koncentraci amoniaku



Amoniak (NH₃) – metody stanovení

2. Doporučená rutinní metoda:

2.2 Elektrochemické metody (biosenzory):

- ▣ přímá potenciometrie
- ▣ konduktometrie

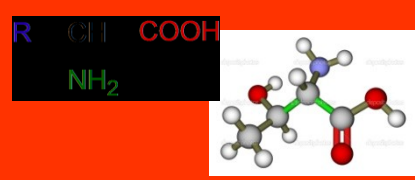
- ✓ měří se změna potenciálu nebo vodivosti reakční směsi, která je závislá na množství uvolněných amonných iontů v reakci

3. Jiné metody:

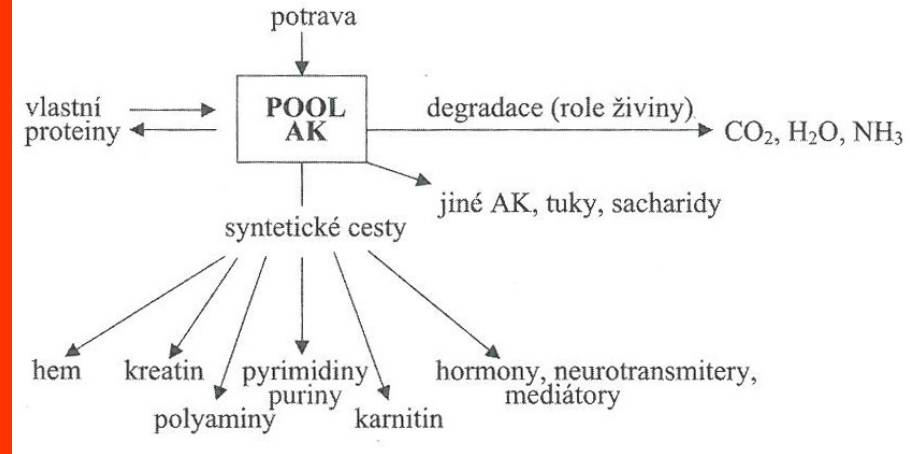
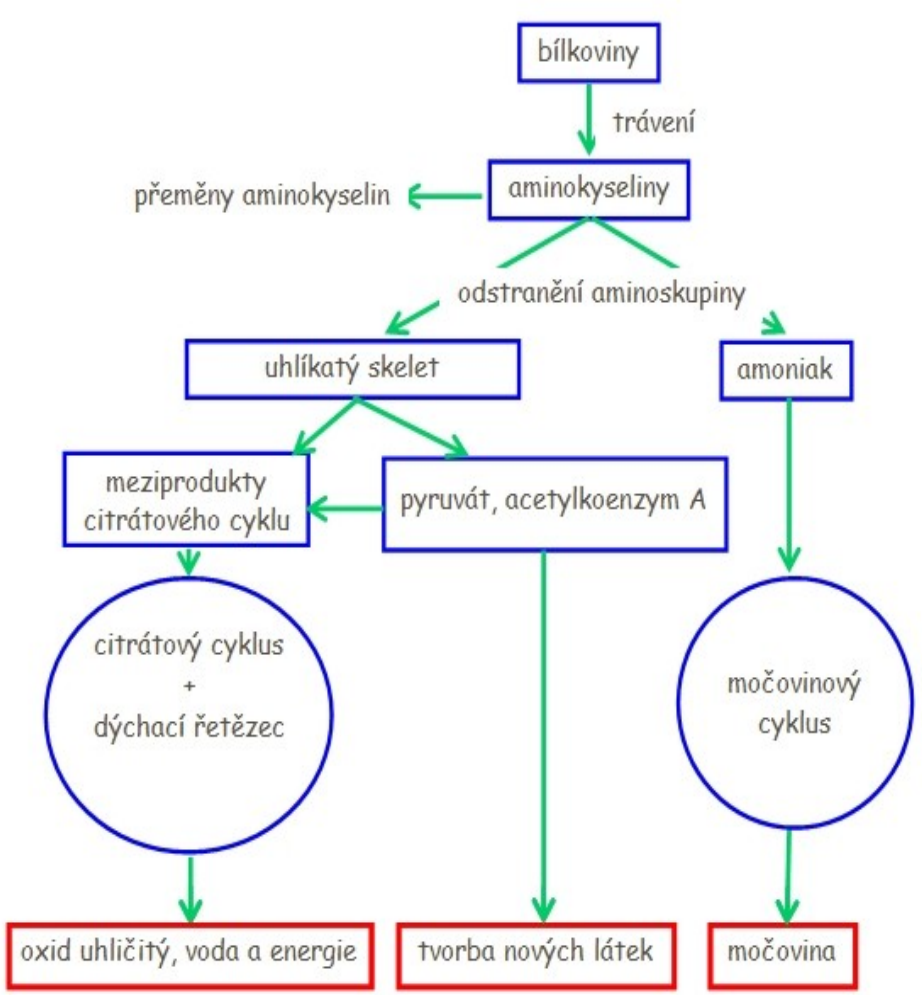
3.1 Chemické metody:

- ✓ amoniak reaguje s *Nesslerovým činidlem* (alkalický roztok jodidortuňatanu) za tvorby oranžového zbarvení
- ✓ amoniak reaguje s fenolem a chlornanem za vzniku modře zbarveného indofenolu (*Berthelotova reakce*)
- ✓ metody se již v klinické biochemii nepoužívají

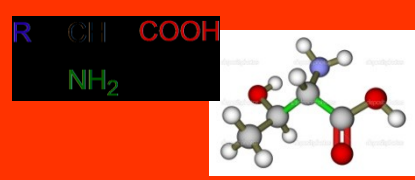
3.2 Mikro-difúzní metoda



Aminokyseliny



- ❑ Význam stanovení:
- ✓ diagnostika dědičných poruch metabolismu AK (screening)
- ✓ monitorování výživy u nemocných v těžkém stavu



Aminokyseliny – metody stanovení

1. Referenční metoda: neuvádí se

2. Chromatografické metody:

- ✓ Ionexová chromatografie
- ✓ HPLC
- ✓ GC po převedení aminokyselin na těkavé deriváty
- ✓ TLC používaná jako semikvantitativní metoda

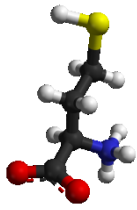
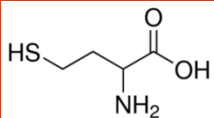
□ pro analýzu většího spektra aminokyselin se používají automatické analyzátory aminokyselin

3. Elektroforetické metody

4. Jednoduché chemické reakce

5. Imunoanalytické metody (viz. stanovení homocysteinu)

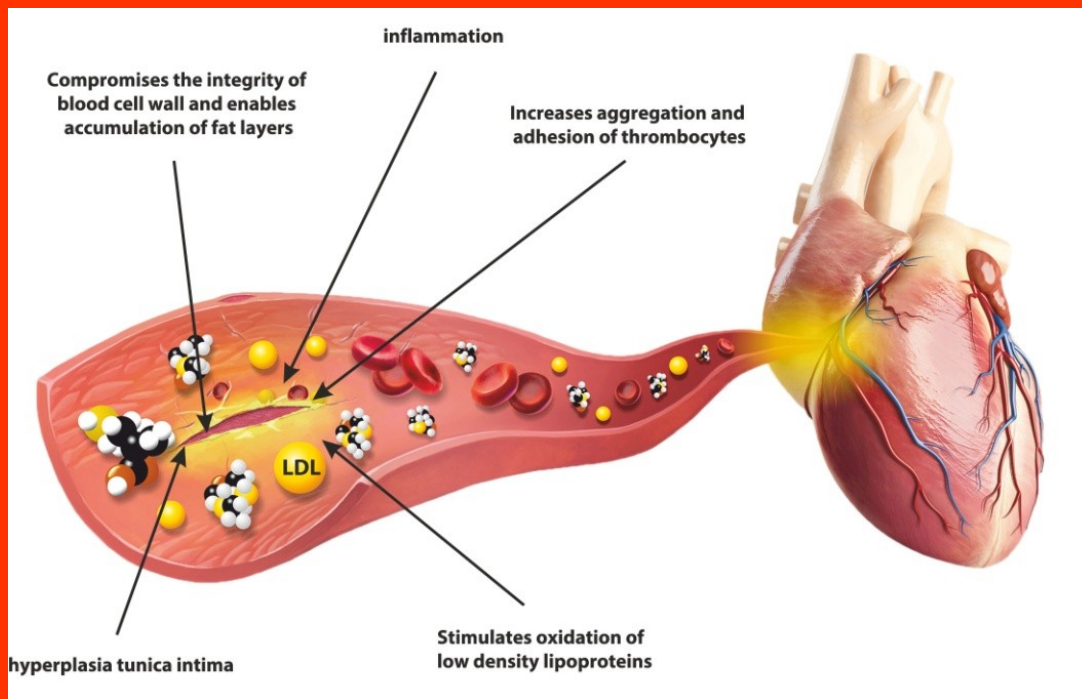
6. Techniky DNA

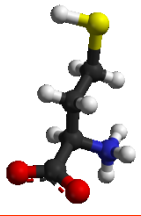
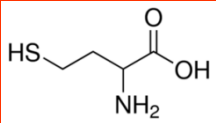


Homocystein

- ❑ neesenciální sirná aminokyselina
- ❑ není součástí tělesných bílkovin
- ❑ vzniká v organismu při přeměně methioninu (Met) na cystein(Cys) - jako degradační produkt S-adenosylmethioninu (donor merhlyenové skupiny)
- ❑ **nezávislý rizikový faktor:**
 - ✓ kardiovaskulární onemocnění
 - ✓ periferní vaskulární onemocnění (arteriální i žilní trombóza)
 - ✓ cerebrovaskulární onemocnění
 - ✓ opakované ztráty plodu

Rizikový faktor je přibližně stejný jako u hyperlipidémie a kouření.





Homocystein

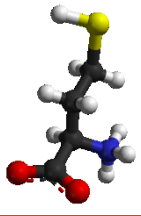
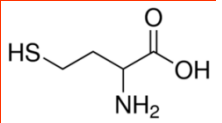
☐ Referenční rozmezí:

✓ P-homocystein: 5 – 15 $\mu\text{mol/l}$

☐ **Certifikovaný referenční materiál: NIST SRM 1955**

☐ Metody stanovení:

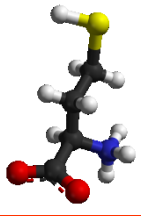
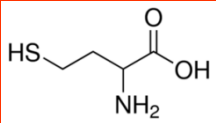
1. HPLC
2. Imunochemické metody
3. Enzymové metody
4. GC-MS



Homocystein – metody stanovení

1. HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

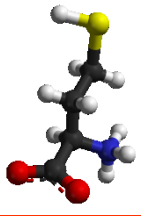
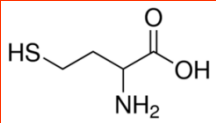
- ✓ deproteinace
- ✓ redukce
- ✓ derivatizace
- ✓ analýza
- ✓ detekce (fluorometrická)



Homocystein – metody stanovení

2. Imunochemické metody

- ✓ redukce oxidovaných forem (např. 1,4-dithio-D,L-threitol)
 - ✓ enzymatická přeměna homocysteinu na S-adenosylhomocystein
 - ✓ kompetitivní imunochemická reakce se specifickou monoklonální protilátkou
 - ✓ detekce
- **Další metody:** ELISA, imunoturbidimetrie, chemiluminiscence,...



Homocystein – metody stanovení

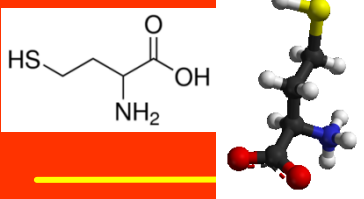
3.1 Enzymová metoda („cyklická“):

Hcy + L-serin \longrightarrow cystathionin (CBS - cystathion β -syntáza)

cystathionin \longrightarrow pyruvát + amoniak + Hcy (BBL - cystathion β -syntáza)

pyruvát + NADH \longrightarrow L-laktát + NAD⁺ (LD - laktátdehydrogenáza)

✓ spektrofotometrické stanovení - pokles absorbance při 340 nm



Homocystein – metody stanovení

3.2 Enzymová metoda („cyklická“) – Roche:

- nejdříve je oxidovaná forma Hcy redukována na volný Hcy



HMTasa (homocystein-S-methyltransferáza)



SAHasa (SAH hydroláza)



ADA (adenosindeamináza)



GIDH

✓ spektrofotometrické stanovení - pokles absorbance při 340 nm

SAM (S-adenosylmethionin), SAH (S-adenosyl-homocystein), Hcy (Homocystein), Met (Methionin), GIDH (Glutamátdehydrogenáza)



Děkuji za pozornost.