

Dusíkaté látky nebílkovinné povahy

Analytická část

Petr Breinek

CELKOVÝ DUSÍK

= celkové množství dusíku všech dusíkatých látek

= bílkovinný + nebílkovinný dusík

Metody stanovení: **KJELDAHLOVA metoda**

V supernatantu po DEPROTEINACI (kyselinou trichloroctovou) vznikne z DUSÍKATÝCH látek (za varu po rozkladu konc. H_2SO_4 a v přítomnosti katalyzátorů) SÍRAN AMONNÝ, z kterého se oddestiluje AMONIAK, který se stanoví TITRAČNĚ

Nejčastěji se jedná o odpadní látky,
výjimku tvoří aminokyseliny

1) MOČOVINA

2) KREATININ (KREATIN)

3) KYSELINA MOČOVÁ

4) AMONIAK

5) blíže nedefinované látky + peptidy

6) AMINOKYSELINY
(např. Homocystein)

Preanalytické požadavky

Analyzovaný materiál

Stabilita

Referenční rozmezí

Biologická variabilita

Metody stanovení

Referenční metoda a materiál – existuje?

Doporučené (rutinní) metody

Jiné metody

MOČOVINA (UREA)

Je konečným produktem metabolismu bílkovin (aminokyselin) - detoxikace NH_3

BÍLKOVINY



AMINOKYSELINY



Močovinový cyklus (játra)



MOČOVINA (krev → moč)

MOČOVINA

- **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).

Koncentrace v krvi závisí na:

- vylučování močovinou ledvinami močí
- její tvorbě (zvýšený katabolismus- 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
-------------	------------------

Metody stanovení

1. REFERENČNÍ metody

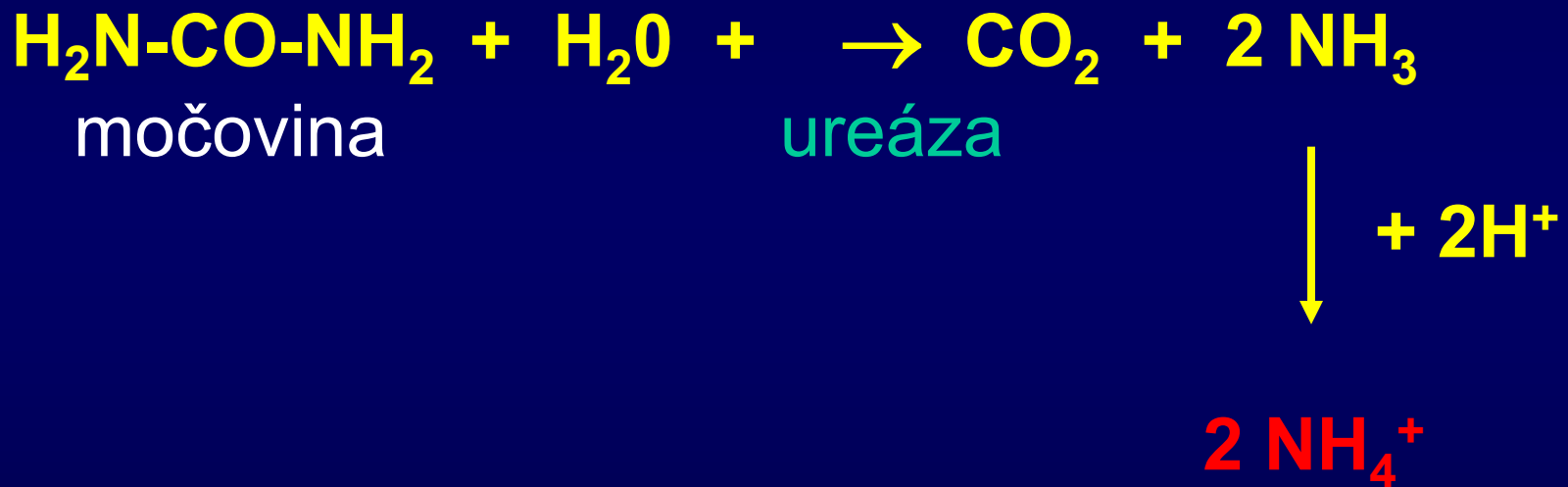
a) ID-GC/MS ID-LC/MS

standardní přidání značené močoviny (izotopová diluce) do analyzovaného vzorku a následné stanovení kombinací plynové nebo kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

b) HPLC

vysokoúčinná kapalinová chromatografie

2. Doporučená metoda (enzymová) (ureáza/GMD)





glutamátdehydrogenáza (GMD)

spektrofotometricky - pokles absorbance NADH při 340 nm

3. ELEKTROCHEMICKÉ metody (biosenzory)

4. Jiné možnosti stanovení (starší metody)

- enzymové metody (ureasa/Berthelotova reakce)
reakce amoniaku s chlornanem a fenolem za vzniku barevného (modrého) indofenolu
- chemické
 - reakce močoviny s α diketony nebo jejich oximy (např. diacetylmonoxim, DAM)
 - reakce močoviny s o-ftaldialdehydem (OFA)

KREATININ

Kreatinin vzniká ve svalové tkáni jako konečný produkt přeměny **kreatinu** (dehydratace).

(Kreatin vzniká v játrech, pankreatu a ledvinách, podílí se na tvorbě energie potřebné ke kontrakci svalů)

kreatin + ATP → kreatinfosfát + ADP (CK)

kreatinfosfát → kreatin → **kreatinin** + H₂O

Koncentrace v krvi závisí na:

- vylučování kreatininu ledvinami močí
- syntéze kreatinu (svalové hmotě)

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
--------------	-------------------

Clearance kreatininu

- Méně kvalitní ukazatel GFR než výpočet z eGFR z koncentrace kreatininu v séru
- za fyziologických podmínek nadhodnocuje glomerulární filtraci asi o 10% ,u renálního selhání o 100% (!)

Nutný sběr moče

Clearance kreatininu = $(U\text{-kreatinin} \times V) : S\text{-kreatinin}$

Doporučení IFCC

- 2005: pracovní skupina IFCC WG-GFRA
Working Group- GFR Assessment
- **Doporučení:**
....používání specifitějších metod na
stanovení kreatininu

www.ifcc.org



International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Home > Structure & Organization > Scientific Division > Working Groups > WG-GFRA

Latest News

[IFCC/ABBOTT AWARD 2007](#)

SD

- [Porphyrin Directory](#)
- [JCTLM: Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine](#)
- [Reference Materials](#)
- [Latest SD Minutes](#)
- [Project Proposal Form](#)
- [C-MD About us](#)

Main Menu

- [Home](#)
- [Contact Us](#)
- [Activities](#)
- [Publications](#)
- [Meetings & Congresses](#)

WG-GFRA

Tuesday, 12 September 2006



[National Kidney Disease Education Program \(NKDEP\)](#)

8.3.38 Standardisation of Glomerular Filtration Rate Assessment (WG-GFRA)

Membership

Name	Position	Country	Term	Time in Office
N. Greenberg	Chair	US	1st	2006 01 – 2008 12
C. Cobbaert	Member	NL		
J. Delanghe	Member	BE		
G. Jones	Member	AU		
G. Miller	Member	US		
G. Myers	Member	US		





Odhad glomerulární filtrace (GFR) z koncentrace kreatininu

Zadání vstupních hodnot:

Kreatinin v $\mu\text{mol/l}$	<input type="text" value="100,00"/>
Věk v rocích	<input type="text" value="65"/>
Pohlaví	<input checked="" type="radio"/> Muž <input type="radio"/> Žena
Výška v cm	<input type="text" value="185"/>
Váha v kg	<input type="text" value="80"/>

Výsledek výpočtu:



Odhad glomerulární filtrace (eGFR) je podle rovnice Lund-Malmö: 1,01 ml/s na 1,73 m²

rovnice CKD EPI: 1,13 ml/s na 1,73 m²
 rovnice Lund: 1,01 ml/s na 1,73 m²
 rovnice MDRD (IDMS traceable): 1,13 ml/s na 1,73 m²
 rovnice Mayo Clinic: 1,43 ml/s na 1,73 m²

[Návrat](#)



Odhad glomerulární filtrace (GFR) podle rovnice MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)

Zadáni vstupních hodnot:

Kreatinin v plazmě (séru) v $\mu\text{mol/l}$



nová kalibrace IFCC

Věk v letech

Pohlaví

 Muž Žena

Urea v plazmě (séru) v mmol/l

Albumin v plazmě (séru) v g/l

Výsledek výpočtu (v $\text{mls}^{-1} (1,73\text{m}^2)^{-1}$):

?

Odhad glomerulární filtrace (GFR) podle rovnice MDRD = 1,08

Návrat

Glomerulární filtrace

- DTPA izotopové vyšetření ledvin je referenční metoda (zlatý standard).

Řekne kolik filtruje pravá a kolik levá ledvina, mluví i o odtoku vývodnými močovými cestami.

1. Referenční metoda

ID-GC/MS a ID-LC/MS

standardní přidání značeného kreatininu (izotopová diluce) do analyzovaného vzorku a následném stanovení kombinací plynové nebo kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

- Certifikovaný referenční materiál

SRM 967 (SRM-NIST 909b, SRM-NIST 914)

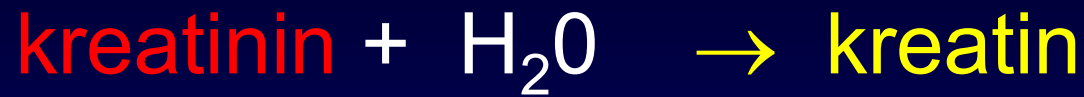
Kreatinin enzymaticky

1. Stanovení **kreatinu** vzniklého z kreatininu

- **kreatininasa**/kreatinasa/SOX/POD
- kreatininasa/CK/PK/LD

2. stanovení **amoniaku** vzniklého z kreatininu

- **kreatininiminohydrolasa**/G1DH



kreatininasa



kreatinasa



sarkosinoxidasa



peroxidasa (oxidační kopulace)

Princip a postup měření

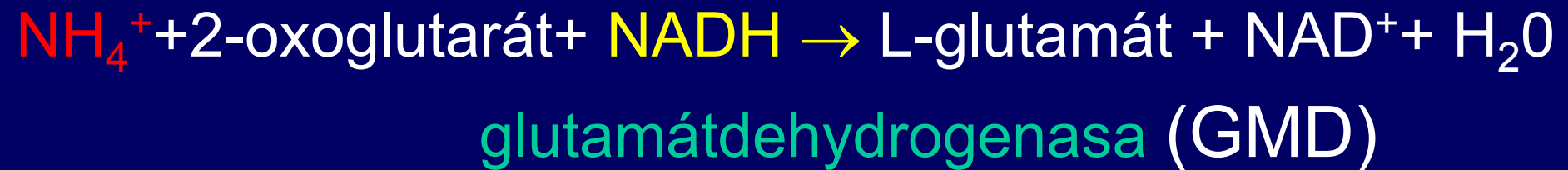
1. vzorek + R1



- Odstranění endogenního kreatinu,
 H_2O_2 (katalasa), kyseliny askorbové (AOX)

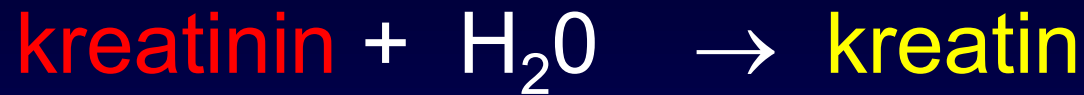
2. + R2





Spektrofotometricky, pokles absorbance NADH při
340nm

Jiný princip enzymového stanovení



kreatininasa



kreatinkinasa (CK)



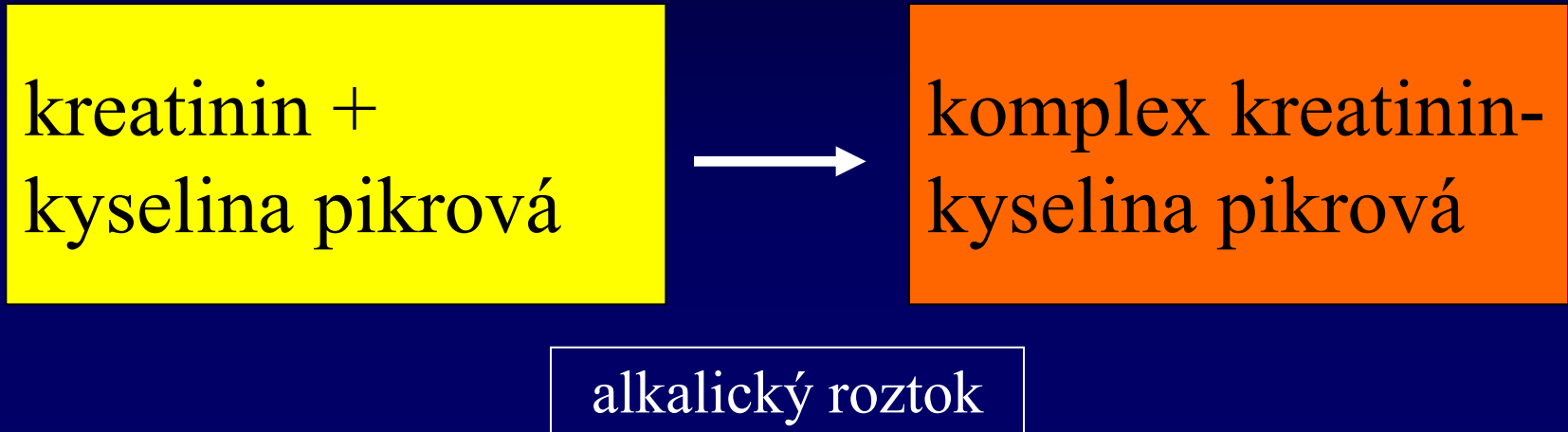
pyruvátkinasa (PK)



laktátdehydrogenasa (LD)

Spektrofotometricky, pokles absorbance NADH při
340nm

Metody využívající Jaffeho reakci



- Nespecifičnost měření
- Reagují: proteiny, ketony, bilirubin, některé léky,...

Snížení nespecifičnosti

- Celá řada modifikací v průběhu více než 100 roků
- Částečně snížena kinetickými metodami
- Rate-blank, kompenzace, detergenty,
- Optimalizace koncentrace reagensů
- Rozdílné výsledky mezi jednotlivými modifikacemi Jaffeho metody

4. Jiné metody:

a) elektrochemické metody (**biosenzory**)

POCT

b) HPLC

c) CE

KYSELINA MOČOVÁ (1,3,8-trioxypurin)

U člověka je konečným produktem metabolismu purinů, vylučuje se ledvinami a močí, část stolicí.

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.

Je vylučována z 1/3 zažívacím traktem a ze 2/3 ledvinami. Není to jen látka odpadní, má význačný antioxidační účinek.

Zvýšenou koncentraci v krvi (hyperurikemie)
způsobuje:

- její **zvýšená produkce** (maso, zvýšená degradace buněk-leukémie)
- její **snížené vylučování**

Metody stanovení

1. Referenční metody

ID-GC-MS a HPLC

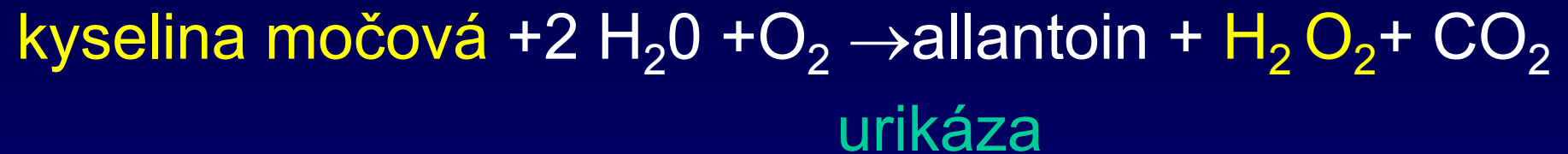
standardní přidání značené 1,3-¹⁵N kyseliny močové (izotopová diluce) do analyzovaného vzorku a následné stanovení plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií

nebo stanovení kyseliny močové vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

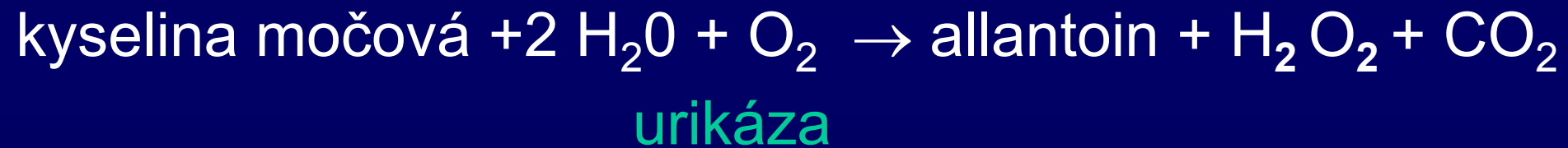
2. Doporučená rutinní metoda (enzymové stanovení, urikáza/peroxidáza)

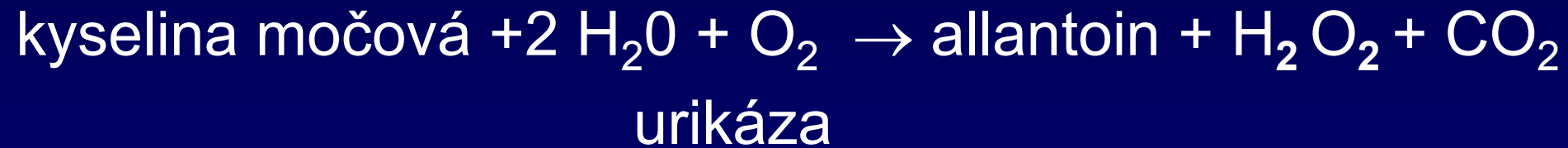


URIKASA



3. Jiný princip enzymového stanovení (urikasa/kataláza)





HANTZSCHOVA kondenzační reakce (A 405nm)

4. ENZYMOVÉ stanovení (urikasa/UV)

282-293 nm

5. Chemické metody

založené na redukčních vlastnostech kyseliny močové (oxidace)

např. redukce kyseliny fosfowolframové v alkalickém prostředí za vzniku wolframové modře

AMONIAK (NH₃)

Vzniká při **degradaci bílkovin (aminokyselin)** 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.

Zvýšená koncentrace v plazmě:

- **Závažné jaterní onemocnění**
- Snížení průtoku krve játry
- Reyeův syndrom
- Selhání ledvin
- Při vrozených poruchách enzymů v močovinovém cyklu

Preanalytika:

Krev se musí po odběru ihned zchladit a zpracovat co nejdříve (30min), neboť hrozí falešně zvýšené hodnoty.

Referenční rozmezí:

P-Amoniak	muži	15 - 55 $\mu\text{mol/l}$
	ženy	11 - 48 $\mu\text{mol/l}$
		18 - 72 $\mu\text{mol/l}$

Metody stanovení:

1. Referenční metoda: není k dispozici
2. Rutinní metody
 - a) enzymové metody (GMD/UV)



spektrofotometricky

pokles absorbance NADH při 340 nm

3. Elektrochemické metody (biosenzory, POCT)

- přímá potenciometrie
- konduktometrie

4. Jiné možnosti stanovení

- chemické metody
- mikrodifuzní metody

Aminokyseliny

- Významně se účastní metabolických procesů
- Základní stavební jednotky proteinů
- Přeměna na jiné biologické sloučeniny
- Získání energie

- Nejvýznamnějších je 20 (kódované) a z těchto je 7 esenciálních (nepostradatelných, např. Met)

- Diagnostika dědičných metabolických poruch (DMP)
 - skupina asi 200 definovaných chorob (nejméně 20 je léčitelných speciální dietou)

Význam stanovení:

- diagnostika dědičných poruch metabolismu AK (screening)
- monitorování výživy u nemocných v těžkém stavu

Metody stanovení:

1. Referenční metoda: neuvádí se
2. Chromatografie: GC, HPLC, TLC (automatické analyzátory)
3. Elektroforéza
4. Jednoduché chemické reakce
5. Imunoanalytické metody (např. homocystein)
6. Techniky DNA

Homocystein

- neesenciální siriá aminokyselina
- není součástí tělesných bílkovin
- vzniká v organismu při přeměně methioninu (Met) na cystein(Cys)
jako degradační produkt S-adenosylmethioninu (donor merhylenevé skupiny)
- **nezávislý rizikový faktor**

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.

Referenční rozmezí:

P-Homocystein 5-15 $\mu\text{mol/l}$

Metody stanovení:

1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

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

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
ELISA, imunoturbidimetrie, chemiluminiscence,...

3. Enzymová metoda („cyklická“):



CBS (cystathion β -syntáza)



BBL (cystathion β -lyáza)



LD (laktátdehydrogenáza)

SPEKTROFOTOMETRICKY

(pokles absorbance při 340 nm)

4. Kombinace plynové chromatografie s hmotovou spektrometrií (GC-MS)