

# Dusíkaté látky nebílkovinné povahy

Petr Breinek



Dusíkaté látky\_2014

# Hlavní nebílkovinné dusíkaté látky

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

Nejčastěji se jedná o odpadní látky, výjimku tvoří aminokyseliny

# Jaké jsou doporučené metody?

Enzym	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál
<b>Kyselina močová</b>	ID-GC/MS HPLC	SRM 909b NIST NIST/SRM 913a
<b>Močovina</b>	ID-GC/MS ID-LC/MS	SRM 909b NIST NIST/SRM 912a
<b>Kreatinin</b>	ID-GC/MS ID-LC/MS	SRM 967 SRM 909b NIST NIST/SRM 914a
<b>Cystatin C</b>	IFCC/IRMM metoda	

# MOČOVINA (urea)

Je konečným produktem metabolismu bílkovin (aminokyselin) - detoxikace  $\text{NH}_3$



# 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 rozpad bílkovin - 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

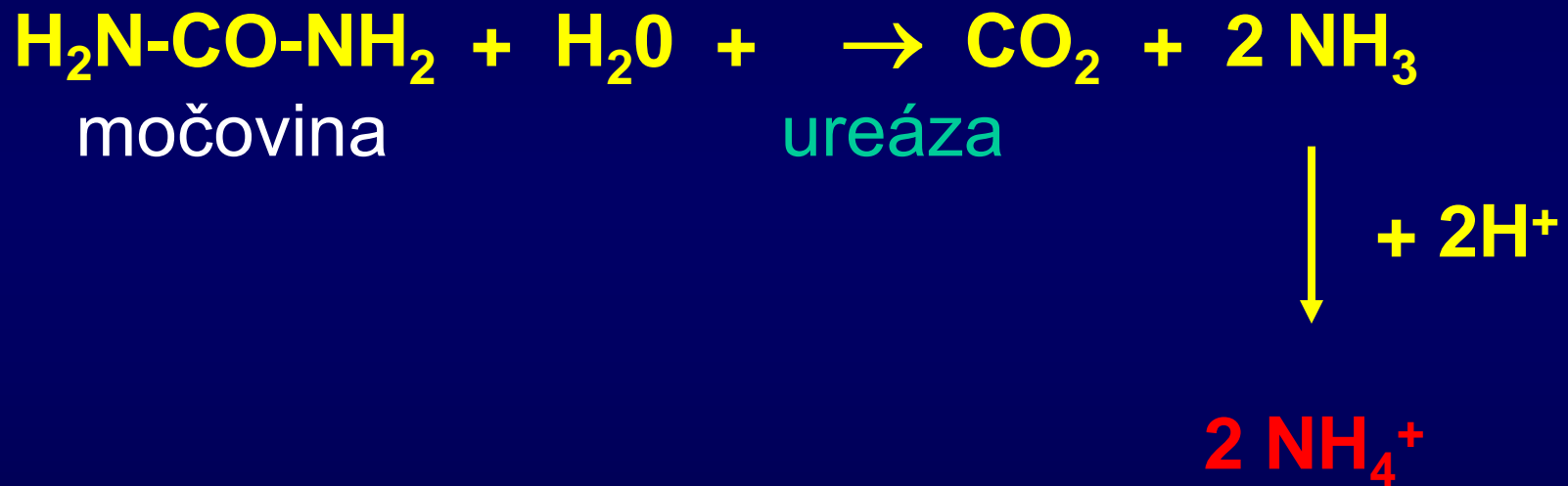
### **a) ID-GC/MS ID-LC/MS**

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)

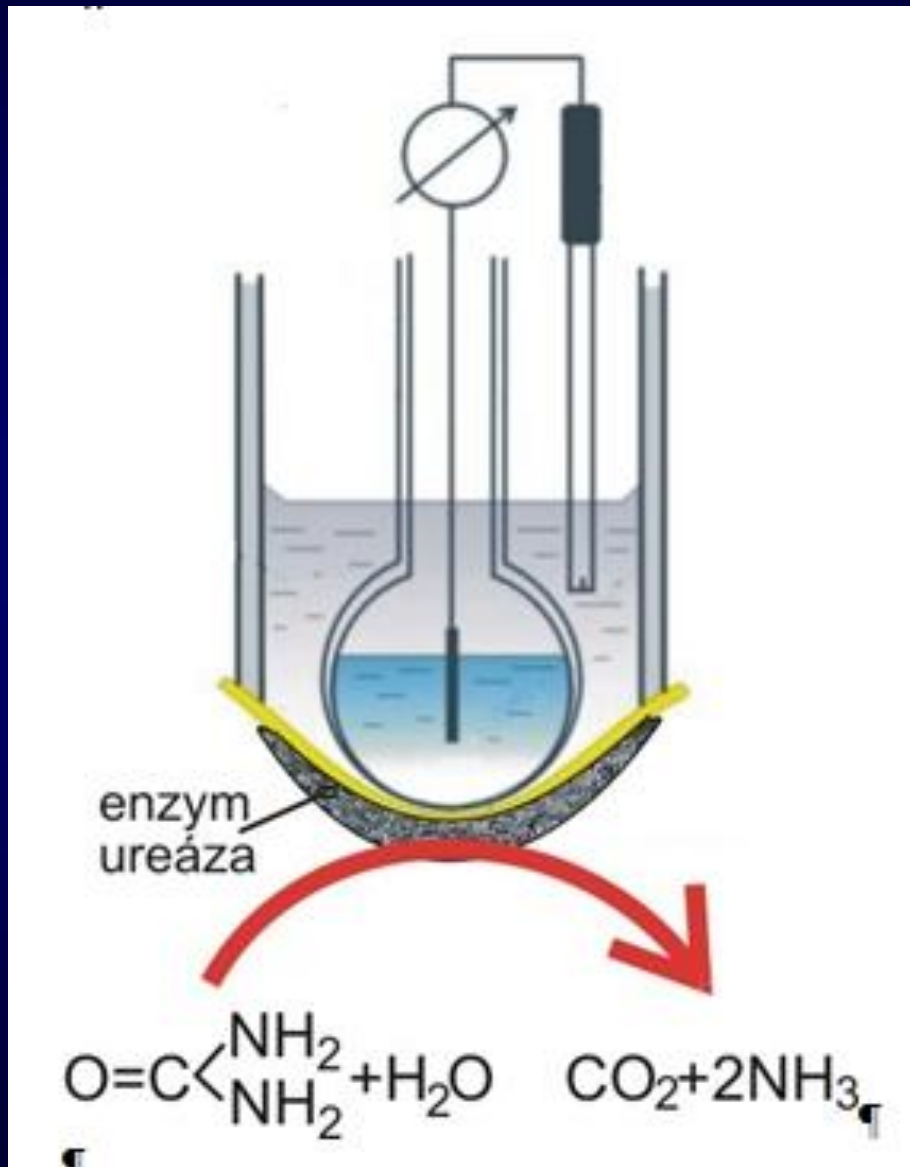




glutamátdehydrogenáza (GMD)

spektrofotometricky - pokles absorbance NADH při 340 nm

### 3. ELEKTROCHEMICKÉ metody (biosenzory)



**GEM 4000,IL**



# 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** + H<sub>2</sub>O



## Koncentrace v krvi závisí na:

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

## Referenční rozmezí: pro věk 18 až 64 let

S-Kreatinin	muži	60 (64)-100(104) $\mu\text{mol/l}$
	ženy	50(49)- 90 $\mu\text{mol/l}$

dU-Kreatinin	8,8-15,0 mmol/24h
--------------	-------------------

# 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-NIST 967



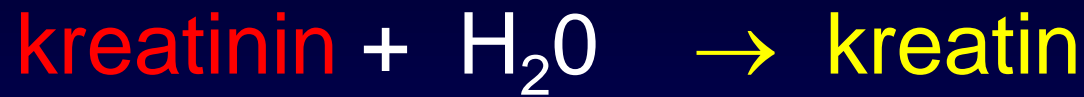
## 2. Kreatinin enzymaticky

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

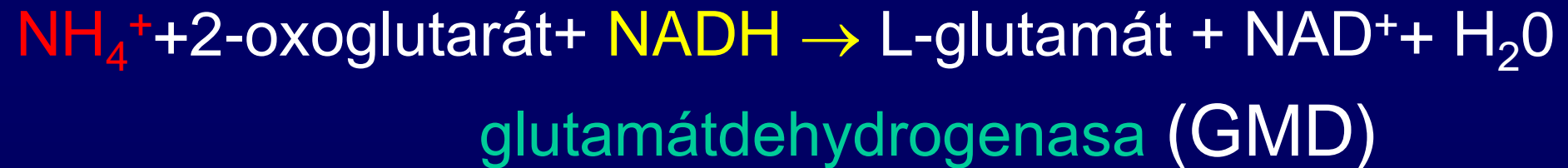
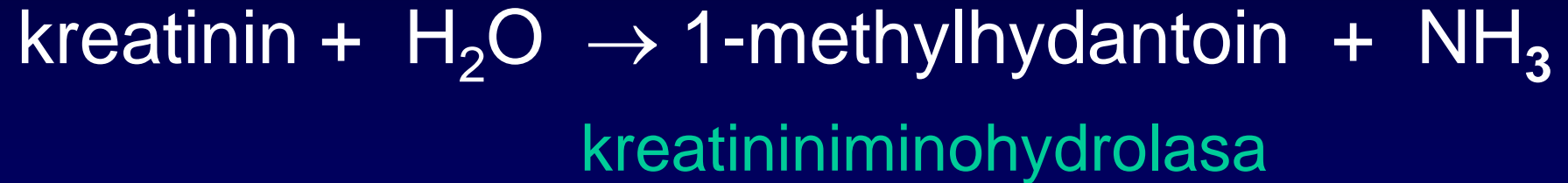
## 1. vzorek + R1



- Odstranění endogenního kreatinu,  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  (katalasa), kyseliny askorbové (AOX)

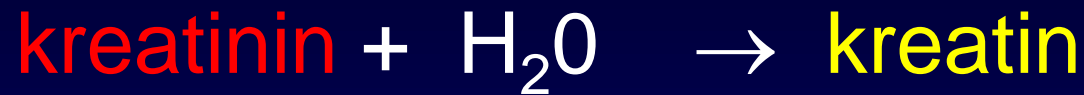
## 2. + R2





Spektrofotometricky, pokles absorbance NADH při  
340nm

## *Jiný princip enzymového stanovení*



kreatininasa



kreatinkinasa (CK)



pyruvátkinasa (PK)



laktátdehydrogenasa (LD)

Spektrofotometricky, pokles absorbance NADH při  
340nm

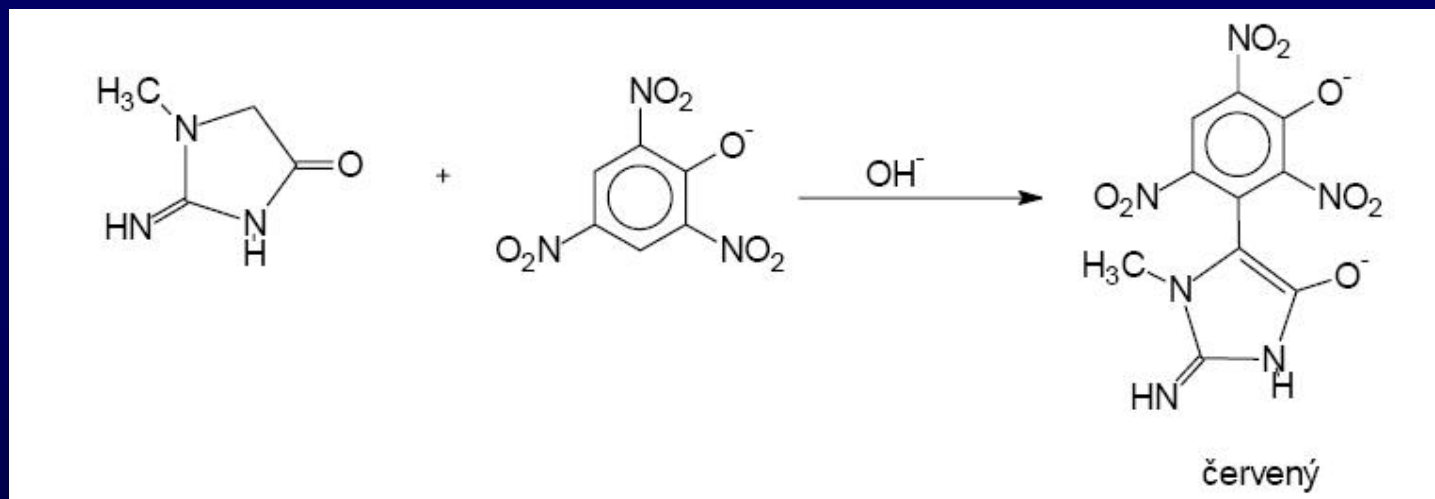
### 3. Metody využívající Jaffého reakci

kreatinin +  
kyselina pikrová

alkalický roztok



komplex kreatinin-  
kyselina pikrová



- Nespecifičnost měření
- Reagují: proteiny, ketony, bilirubin, některé léky, ...<sup>22</sup>

# Metody využívající Jaffeho 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

## 4. Jiné metody:

a) elektrochemické metody (biosenzory)

b) HPLC

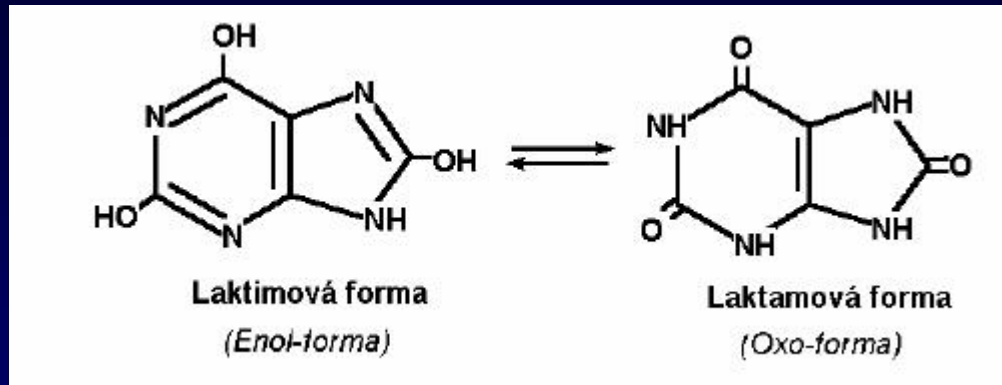
c) CE

POCT





# 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.

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**

## 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

# Metody stanovení

## 1. Referenční metody

### ID-GC-MS a HPLC

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

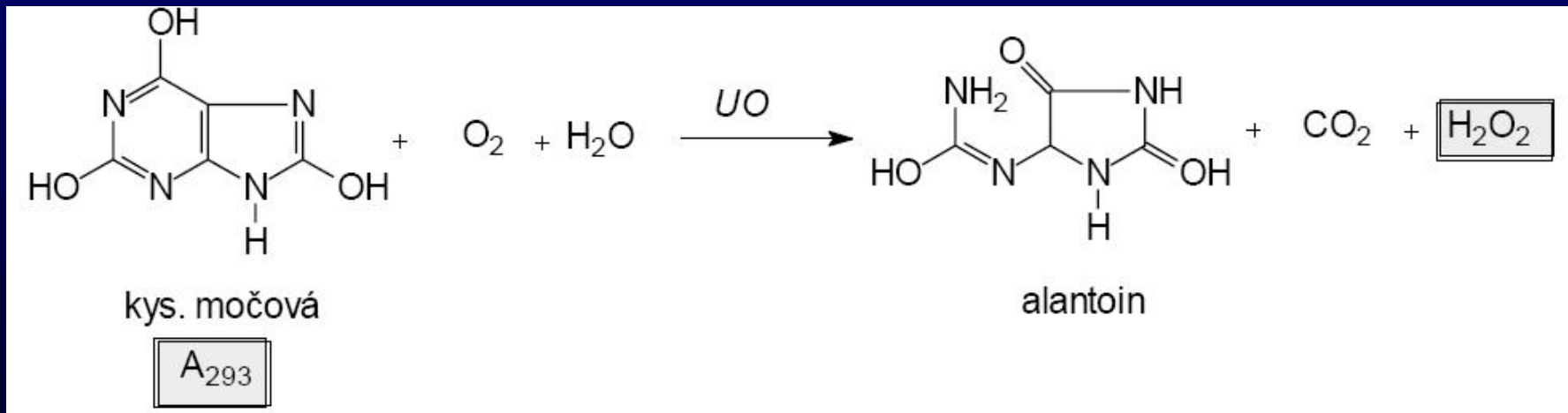
nebo stanovení kyseliny močové vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

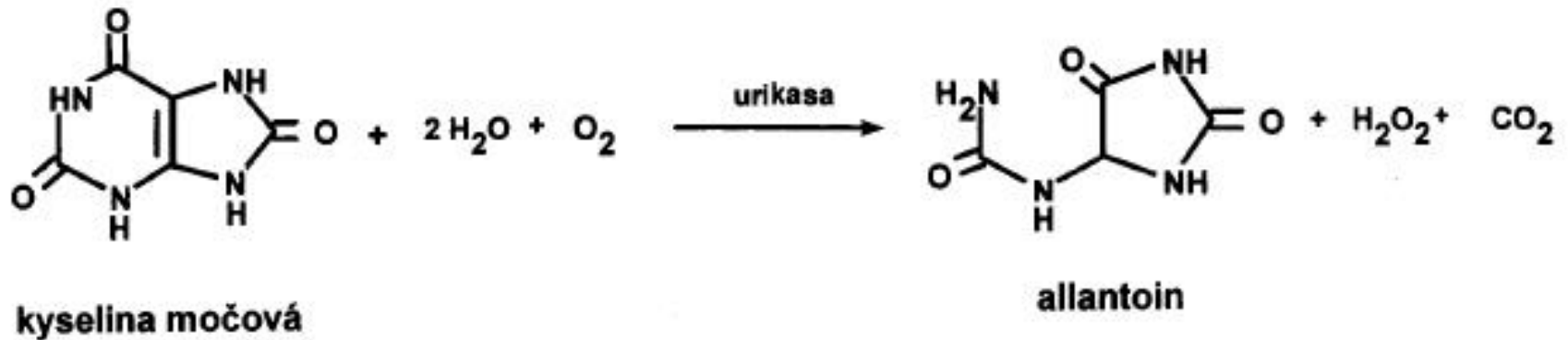
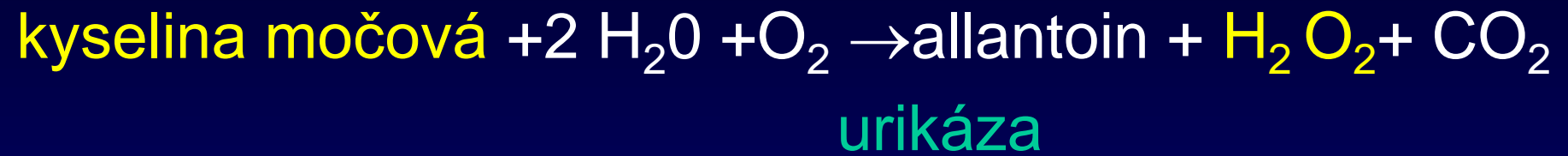
## 2. Doporučená rutinní metoda

(enzymové stanovení, urikáza/peroxidáza)

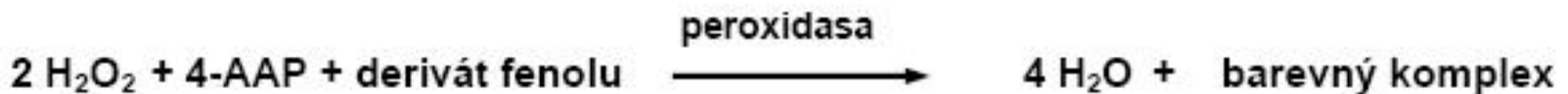


urikáza

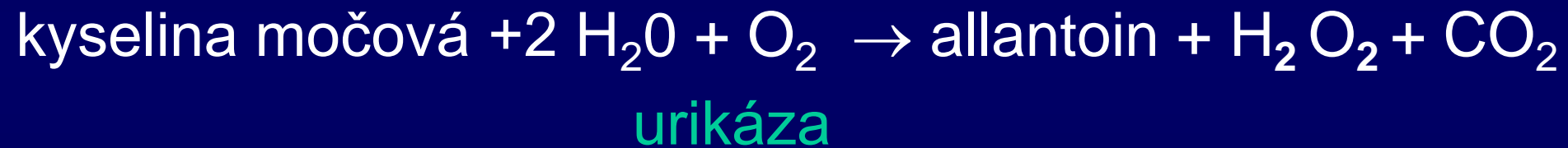


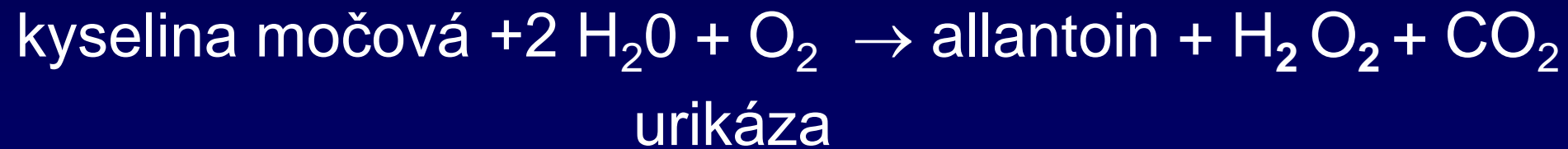


2. Oxidační kopulace 4-aminoantipyrinu a derivátu fenolu



### 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 ( $\text{NH}_3$ ), amonný kation $\text{NH}_4^+$

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.

# 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  $\text{NH}_3$  ⇒ odstraněn játry

## Zvýšená koncentrace v plazmě:

- **Závažné jaterní onemocnění**
- 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

## **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

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 analyzátoary)
3. Elektroforéza
4. Jednoduché chemické reakce
5. Imunoanalytické metody (např. homocystein)
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 methylenové 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-Homocysteinin      5-15  $\mu\text{mol/l}$

## Metody stanovení:

### 1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

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

Referenční materiál: NIST SRM 1955

## 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,...

### 3a. Enzymová metoda („cyklická“):



CBS (cystathion  $\beta$ -syntáza)



BBL (cystathion  $\beta$ -lyáza)



LD (laktátdehydrogenáza)

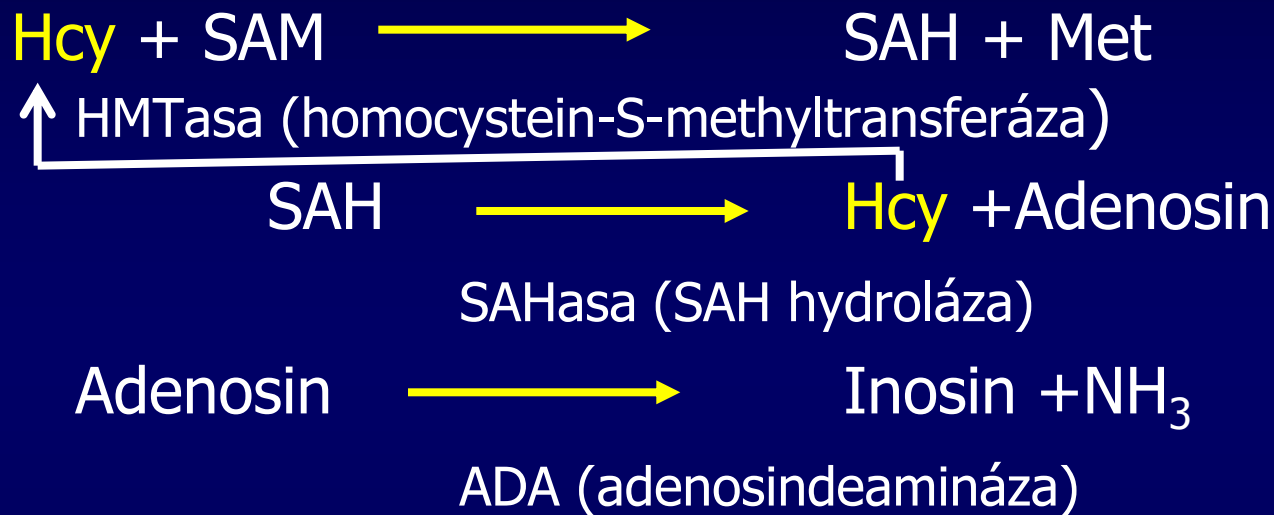
**SPEKTROFOTOMETRICKY**

(pokles absorbance při 340 nm)



### 3b. Enzymová metoda („cyklická“) - Roche:

Nejdříve je oxidovaná forma Hcy redukována na volný Hcy



**Spektrofotometricky** (pokles absorbance při 340 nm)

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

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