

# 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  $\text{NH}_3$

**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

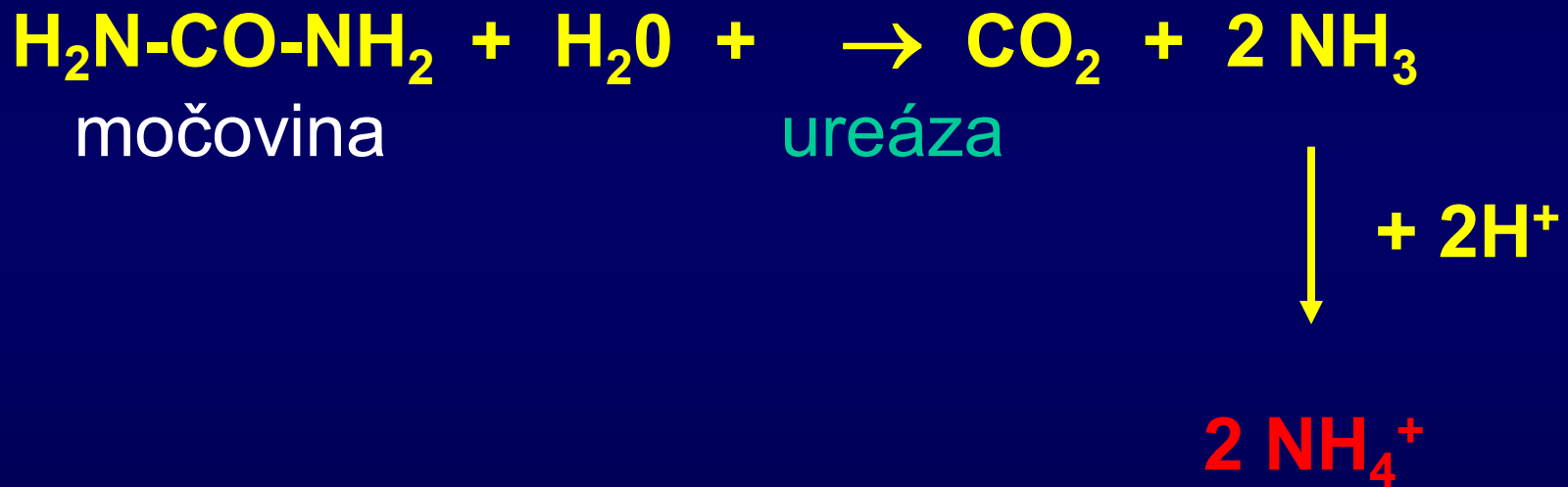
### **a) ID-GC/MS ID-LC/MS**

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  $\alpha$  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** + H<sub>2</sub>O

## 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

## 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 m<sup>2</sup>

rovnice CKD EPI: 1,13 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup>

rovnice Lund: 1,01 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup>

rovnice MDRD (IDMS traceable): 1,13 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup>

rovnice Mayo Clinic: 1,43 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup>

[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  $\text{mmol/l}$

Albumin v plazmě (séru) v  $\text{g/l}$

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

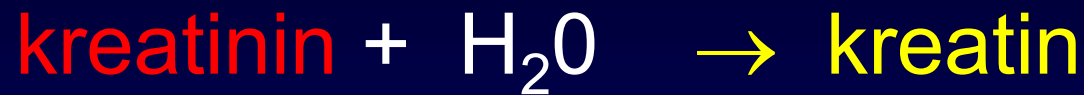
1. Stanovení **kreatinu** vzniklého z kreatininu

- 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

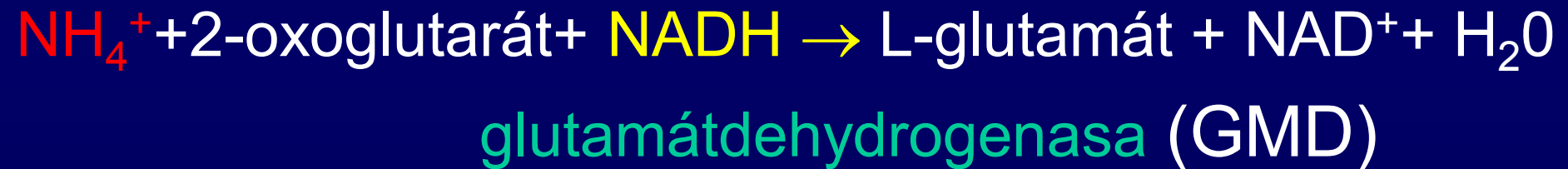
## 1. vzorek + R1



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

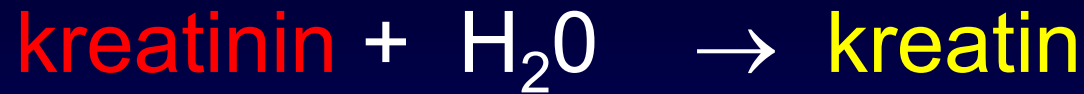
## 2. + R2





Spektrofotometricky, pokles absorbance NADH při  
340nm

## *Jiný princip enzymového stanovení*



kreatininasa



kreatinkinasa (CK)



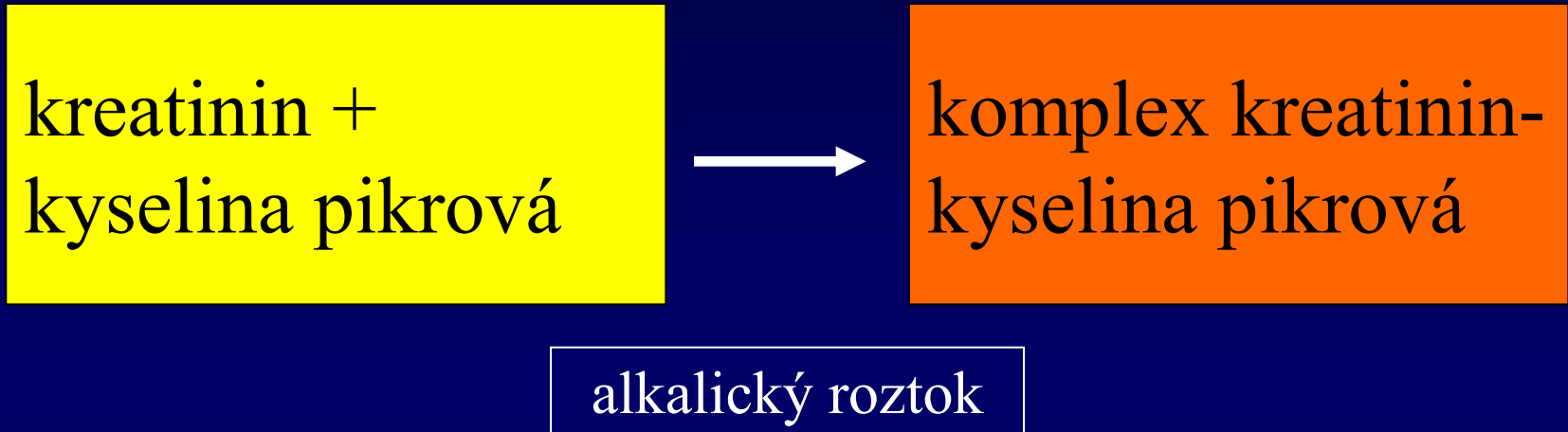
pyruvátkinasa (PK)



laktátdehydrogenasa (LD)

Spektrofotometricky, pokles absorbance NADH při  
340nm

# 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**

## 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

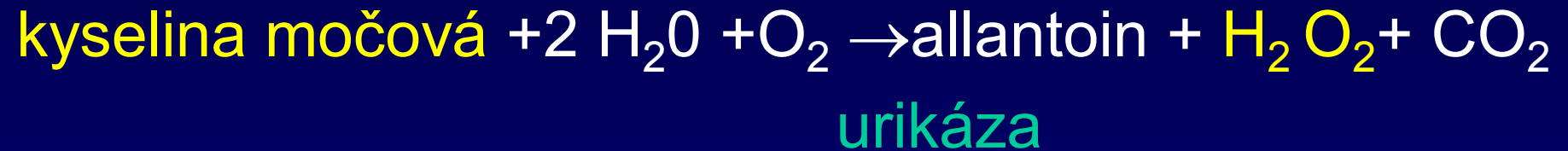
nebo stanovení kyseliny močové vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

## 2. Doporučená rutinní metoda

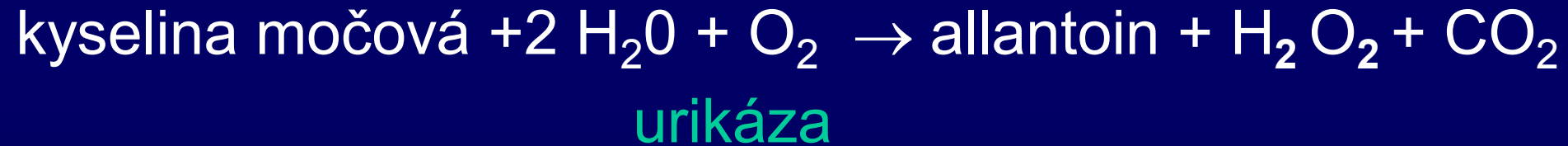
(enzymové stanovení, urikáza/peroxidáza)

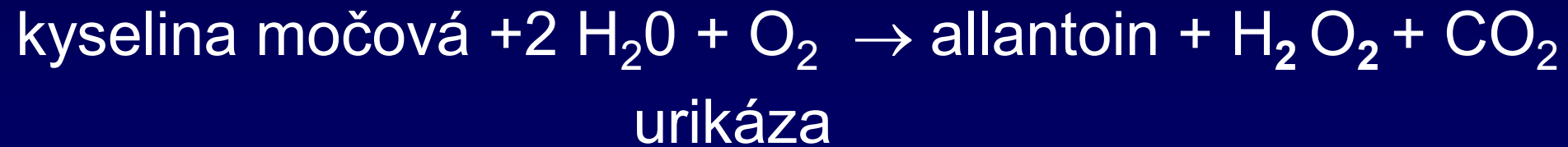


URIKASA



### 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 (NH<sub>3</sub>)

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 analyzátořy)
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  $\beta$ -syntáza)



BBL (cystathion  $\beta$ -lyáza)



LD (laktátdehydrogenáza)

**SPEKTROFOTOMETRICKY**

(pokles absorbance při 340 nm)

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