

WYBRANE PARAMETRY DIAGNOSTYCZNE W CHOROBYCH NEREK

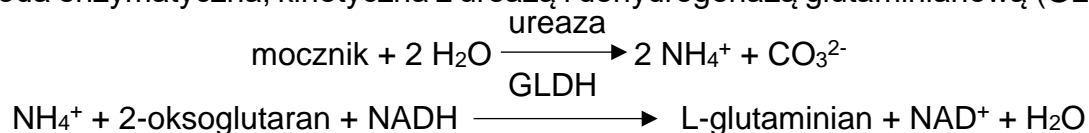
1. Oznaczanie stężenia mocznika w surowicy krwi (zestaw diagnostyczny)

Wprowadzenie:

Mocznik jest produktem katabolizmu aminokwasów. Powstaje w wątrobie i jest wydalany z moczem. Zawartość mocznika we krwi wyraża się często jako azot mocznikowy krwi (ang. *blood urea nitrogen* - BUN). Podwyższone stężenie mocznika w surowicy, zwane mocznicą, obserwuje się m. in. przy odwodnieniu, niewydolności nerek, diecie wysokobiałkowej, zwiększonym katabolizmie białek spowodowanym uszkodzeniem tkanek lub intensywnym krwawieniem do przewodu pokarmowego. Powodem obniżonego stężenia mocznika może być nadmierne nawodnienie, dieta niskobiałkowa lub głodzenie, a także ciężkie schorzenia wątroby.

Zasada metody:

Metoda enzymatyczna, kinetyczna z ureazą i dehydrogenazą glutaminianową (GLDH):



Zmiana absorbancji w czasie mierzona przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$ jest wprost proporcjonalna do stężenia mocznika.

Wykonanie oznaczenia:

1. Do probówki napipetować 1000 μl odczynnika roboczego.
2. Preinkubować przez 3 min. w temperaturze 25°C .
3. Następnie do probówki dodać 10 μl materiału badanego (surowicy) i wymieszać.
4. Po upływie 1 min. odczytać absorbancję (A_1) próby badanej wobec próby zerowej (woda destylowana) przy $\lambda = 340 \text{ nm}$.
5. Po dokładnie 1 min. ponownie zmierzyć absorbancję (A_2) próby badanej.

Obliczanie wyników:

Obliczyć $\Delta A/\text{min}$ ($A_1 - A_2$) próby badanej.

$$\text{Stężenie mocznika} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{\Delta A_{PB}}{\Delta A_{PW}} \times \text{stężenie próby wzorca}$$

Wartości ΔA_{PW} i stężenie próby wzorcowej podaje prowadzący zajęcia.

Oblicz stężenie BUN w próbce.

Wartości referencyjne:

Surowica, osocze: $< 50 \text{ mg/dl}$ ($< 8,3 \text{ mmol/l}$).

1 mg mocznika odpowiada 0,467 mg azotu mocznikowego.

2. Oznaczanie stężenia kreatyniny w surowicy krwi (zestaw diagnostyczny)

Wprowadzenie:

Kreatynina jest produktem zachodzącej w mięśniach szkieletowych nieenzymatycznej dehydratacji kreatyny. Ilość powstającej i wydalanej przez nerki kreatyniny jest proporcjonalna do masy mięśniowej i zazwyczaj jest wyższa u mężczyzn niż u kobiet. Dzienna produkcja kreatyniny utrzymuje się na niemal stałym poziomie, z wyjątkiem rozległego uszkodzenia mięśni w wyniku wypadku lub choroby degeneracyjnej mięśni. Poziom kreatyniny we krwi i w moczu zależy od filtracji kłębuszkowej, więc klirens kreatyniny jest doskonałym wskaźnikiem funkcji nerek.

Zasada metody:

Modyfikacja metody Jaffé'go, bez odbiałczania. W wyniku reakcji pikrynianów z kreatyniną w środowisku alkalicznym powstaje pochodna 2,4,6-trinitro-cykloheksadienu o zabarwieniu żółtoczerwonym. Intensywność zabarwienia (mierzona przy $\lambda = 500$ nm) jest wprost proporcjonalna do stężenia kreatyniny.

Wykonanie oznaczenia:

1. Do probówki napipetować 1000 μ l odczynnika roboczego.
2. Preinkubować przez 3 min. w temperaturze 25°C.
3. Następnie do probówki dodać 100 μ l materiału badanego (surowicy) i wymieszać.
4. Po upływie dokładnie 30 sek. odczytać absorbancję (A1) próby badanej wobec próby zerowej (woda destylowana) przy $\lambda = 500$ nm.
5. Po dokładnie 1 min. ponownie zmierzyć absorbancję (A2) próby badanej.

Obliczanie wyników:

Obliczyć ΔA ($A_2 - A_1$) próby badanej.

$$\text{Stężenie kreatyniny } \left[\frac{mg}{dl} \right] = \frac{\Delta A_{PB}}{\Delta A_{PW}} \times \text{stężenie próby wzorcowej}$$

ΔA_{PW} i stężenie próby wzorcowej poda prowadzący zajęcia.

Wartości referencyjne:

Surowica, osocze:

- kobiety: 0,6 – 1,1 mg/dl (53 - 97 μ mol/l),
- mężczyźni: 0,7 – 1,3 mg/dl (62 - 115 μ mol/l).

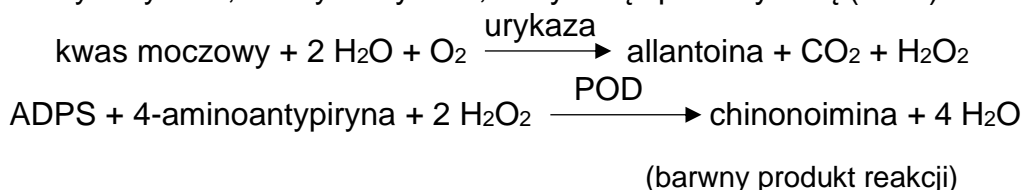
3. Oznaczanie stężenia kwasu moczowego w surowicy krwi (zestaw diagnostyczny)

Wprowadzenie:

Kwas moczowy jest produktem degradacji puryn. Powstaje w wątrobie i jest wydalany z moczem. Zarówno ilość powstającego kwasu moczowego, jak i efektywność jego wydalania przez nerki, mają wpływ na zawartość moczanów we krwi. Podwyższony poziom kwasu moczowego może być spowodowany dną moczanową, białaczką, cukrzycą, nadczynnością tarczycy lub przytarczyc, niewydolnością lub kamicą nerek. Stężenie kwasu moczowego we krwi zależy od przesączania kłębuszkowego i jest wykorzystywane do monitorowania funkcji nerek.

Zasada metody:

Metoda enzymatyczna, kolorymetryczna, z urykazą i peroksydazą (POD):



ADPS – pochodna aniliny

Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia kwasu moczowego.

Pomiar absorbancji przy $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Wykonanie oznaczenia:

Przygotowanie próby zerowej (przez osobę z grupy wskazaną przez prowadzącego zajęcia):

1. Do probówki napipetować 1000 μl odczynnika roboczego.
2. Preinkubować przez 3 min. w temperaturze 25°C .

Przygotowanie próby badanej:

1. Do probówki napipetować 1000 μl odczynnika roboczego.
2. Preinkubować przez 3 min. w temperaturze 25°C .
3. Następnie do probówki dodać 20 μl materiału badanego (surowicy) i wymieszać.
4. Inkubować przez 10 min. w temperaturze 25°C .
5. Po inkubacji odczytać absorbancję próby badanej wobec próby zerowej przy $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Obliczanie wyników:

$$\text{Stężenie kwasu moczowego} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{A_{PB}}{A_{PW}} \times \text{stężenie próby wzorcowej}$$

A_{PW} i stężenie próby wzorcowej poda prowadzący zajęcia.

Wartości referencyjne:

Surowica, osocze:

- kobiety: 2,5 – 6,8 mg/dl (149 - 405 $\mu\text{mol/l}$),
- mężczyźni: 3,6 – 7,7 mg/dl (214 - 458 $\mu\text{mol/l}$).

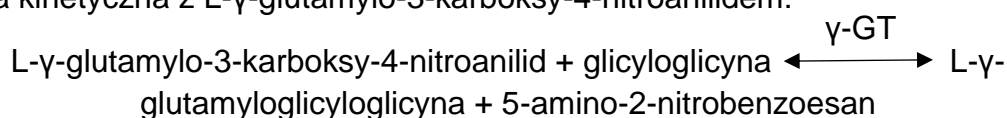
4. Oznaczanie aktywności γ -glutamylotransferazy w surowicy krwi (zestaw diagnostyczny)

Wprowadzenie:

γ -Glutamylotransferaza (GGT, GGTP, γ -GT) jest błonowym enzymem katalizującym przenoszenie grup glutamylowych z glutationu na aminokwasy lub peptydy. Duże ilości GGT występują w narządach o charakterze sekrecyjnym: nerkach, wątrobie, drogach żółciowych, trzustce. Pomimo tego, że aktywność tego enzymu jest najwyższa w komórkach nerek, wzrost poziomu GGT w surowicy jest najczęściej spowodowany schorzeniami wątroby. Ponieważ alkohol indukuje syntezę glutamylotransferazy, oznaczenie poziomu jej aktywności jest wykorzystywane do monitorowania abstynencji u pacjentów na leczeniu odwykowym.

Zasada metody:

Metoda kinetyczna z L- γ -glutamyl-3-karboksy-4-nitroanilidem:



Szybkość powstawania 5-amino-2-nitrobenzoesanu mierzona kolorymetrycznie jest wprost proporcjonalna do aktywności γ -glutamylotransferazy.

Pomiar absorbancji przy $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Wykonanie oznaczenia:

1. Do probówki napipetować 1000 μl odczynnika roboczego.
2. Preinkubować przez 3 min. w temperaturze 25°C .
3. Następnie do probówki dodać 100 μl materiału badanego (surowicy) i wymieszać.
4. Inkubować przez 1 min. w temperaturze 25°C .
5. Odczytać absorbancję (A_0) wobec próby zerowej (woda destylowana) przy $\lambda = 405 \text{ nm}$.
6. Powtórzyć pomiar po dokładnie 1 min. (A_1), 2 min. (A_2) i 3 min. (A_3).

Obliczanie wyników:

Obliczyć średnią zmianę absorbancji na minutę ($\Delta A/\text{min}$).

$$\text{Aktywność GGT} \left[\frac{U}{l} \right] = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times F$$

$F = 1511$ (współczynnik kalibracji)

Wartości referencyjne:

Surowica, osocze:

- kobiety: $< 38 \text{ U/l}$,
- mężczyźni: $< 55 \text{ U/l}$.

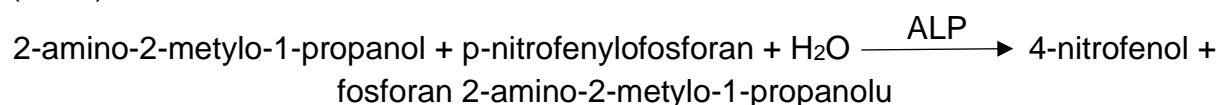
5. Oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej (EC 3.1.3.1) w surowicy krwi (zestaw diagnostyczny)

Wprowadzenie:

Fosfataza alkaliczna (ALP) to w rzeczywistości grupa izoenzymów hydrolizujących monoestry fosforanowe w środowisku zasadowym. Optymalne pH dla aktywności ALP wynosi 9-10. Najwyższy poziom fosfatazy alkalicznej występuje w wątrobie, kościach, jelitach, nerkach i łożysku. Oznaczanie izoenzymów ALP wykorzystywane jest przy diagnozowaniu schorzeń poszczególnych narządów.

Zasada metody:

Metoda kinetyczna zalecana przez Międzynarodową Federację Chemii Klinicznej (IFCC):



Szybkość powstawania 4-nitrofenolu mierzona kolorymetrycznie jest wprost proporcjonalna do aktywności fosfatazy alkalicznej.

Pomiar absorbancji przy $\lambda = 410 \text{ nm}$.

Wykonanie oznaczenia:

1. Do probówki napipetować 1000 μl odczynnika roboczego.
2. Preinkubować przez 3 min. w temperaturze 37°C .
3. Następnie do probówki dodać 20 μl materiału badanego (surowicy) i wymieszać.
4. Inkubować przez 1 min. w temperaturze 37°C .
5. Odczytać absorbancję (A_0) wobec próby zerowej (woda destylowana) przy $\lambda = 410 \text{ nm}$.
6. Powtórzyć pomiar po dokładnie 1 min. (A_1), 2 min. (A_2) i 3 min. (A_3).

Obliczanie wyników:

Obliczyć średnią zmianę absorbancji na minutę ($\Delta A/\text{min}$).

$$\text{Aktywność ALP} \left[\frac{U}{l} \right] = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times F$$

$F = 3038$ (współczynnik kalibracji)

Wartości referencyjne:

Surowica, osocze:

- kobiety: 39 – 118 U/l (0,65 – 1,97 $\mu\text{kat/l}$),
- mężczyźni: 56 – 119 U/l (0,95 – 2,02 $\mu\text{kat/l}$).