

# Stanovení uremických toxinů

Ing. Kristýna Krchová  
MUDr. Radomír Hyšpler

Ing. Jana Volková  
Dr. Ing. Zora Nývltová



**TJ 04000280**

***Metody hodnocení eliminace uremických toxinů peritoneální dialýzou***

# Obsah

- ✓ Uremické toxiny
  - ✓ Co je indoxyl sulfát (IS)?
  - ✓ Metabolismus a renální selhání
  - ✓ Dialýza (hemodialýza, peritoneální dialýza)
- 
- ✓ Výzkumný ústav organických syntéz (VUOS)
    - Chromatografická metoda
  - ✓ Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK)
    - Spektrofotometrická metoda

NEJPROPRACOVANĚJŠÍ  
ČISTIČKA NA SVĚTĚ

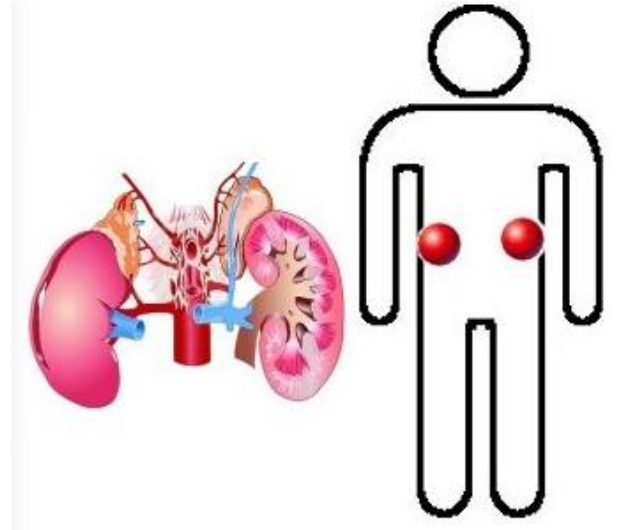
## LEDVINA

délka: 10–12 cm  
šířka: 5–6 cm  
tloušťka: 3–4 cm  
váha: 150 g



# Uremické toxiny

- ✓ biologicky aktivní sloučeniny - zadržovány v důsledku poškození ledvin
- ✓ klasifikovány dle velikosti molekulové hmotnosti a vazby na proteiny
- ✓ močovina, uremické soli ... **Indoxyl sulfát**



Current classification of major uremic retention solutes.

	Low Molecular Weight Molecules (<500 kDa)	Middle Molecules (500–60,000 kDa)	Protein-Bound Uremic Retention Solutes
Selection of clinically relevant molecules	-Urea	-B2 microglobuline	-Indoxyl sulfate
	-Phosphate	-Parathyroid hormone	-P-cresyl sulfate *
	-Uric acid	-Fibroblast-growth-factor 23	-Indole-3- acetic acid *
	-Creatinine	-Atrial natriuretic peptide	-Kynurenic acid *
	-Carbamylated compounds	-Interleukin 6, 8, 10	-hippuric acid *
	-Trimethylamine-N-oxide *	-TNF $\alpha$	-homocysteine
			-Carboxymethyllysine (AGEs)
			-3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid
			-spermine

Abbreviations are; TNF: tumor necrosis factor; AGEs: advanced glycation end products. \* refers to the molecules originating from colonic microbial metabolism.

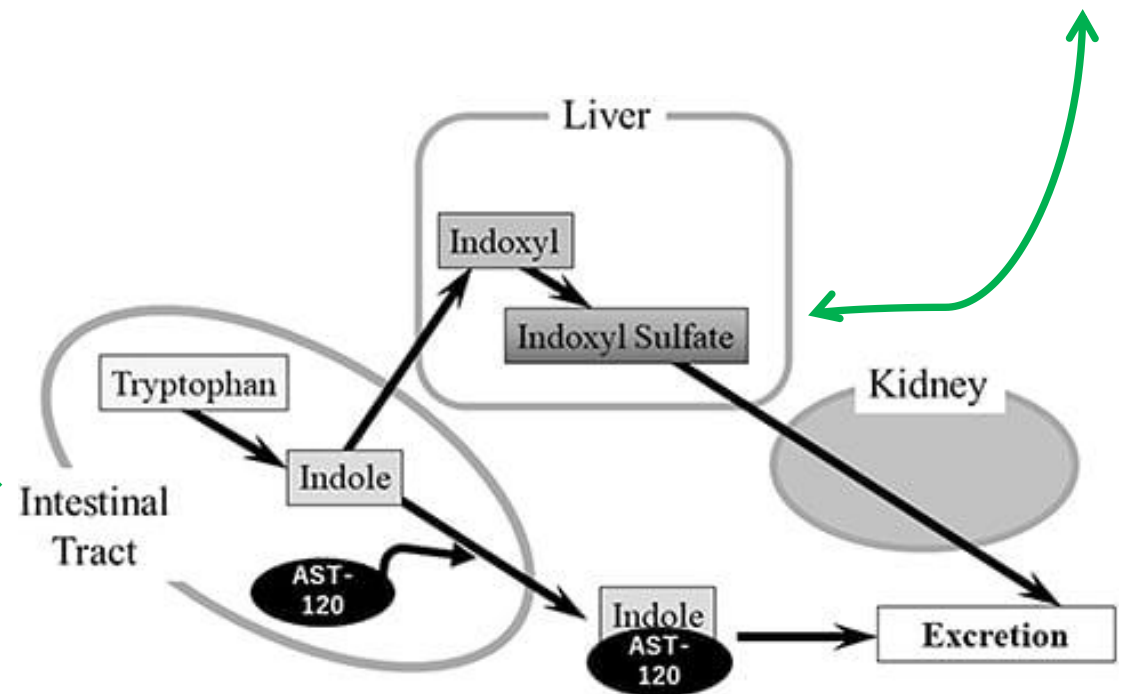
# Indoxyl sulfát (IS)

- ✓ toxický (nefrotoxický) metabolit tryptofanu  
→ akcelerace glomerulární sklerózy, renální fibrotizace, nefropatie
- ✓ vzniká fermentací tryptofanu v tlustém střevě

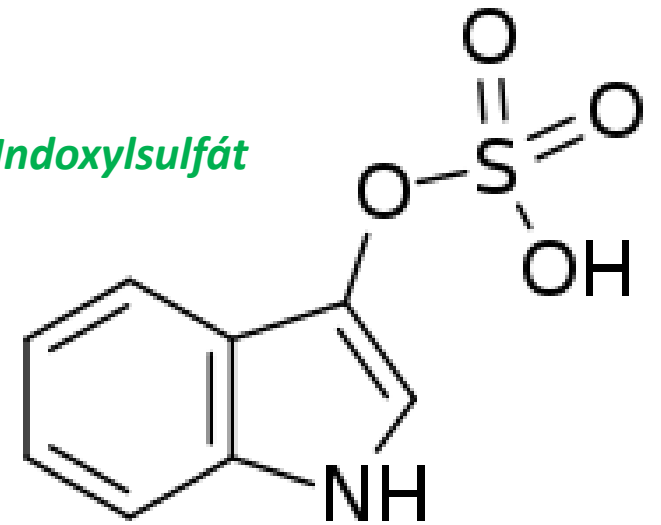


tryptofan přijatý stravou

rozklad střevními bakteriemi



Indoxylsulfát

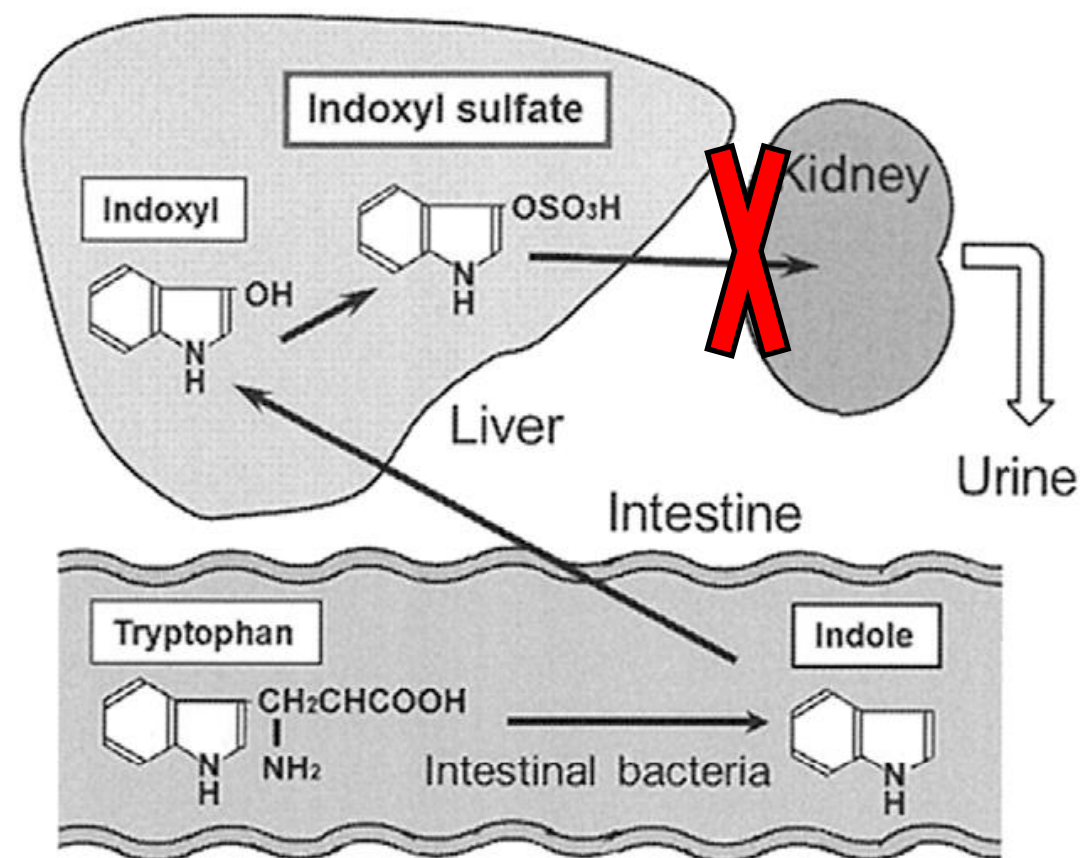


# Metabolismus a renální selhání

- ✓ fyziologická koncentrace IS v krvi: **2 – 10  $\mu\text{mol/l}$**
- ✓ koncentrace IS v krvi dialyzovaných pacientů je **vyšší až 10 – 80x**

- střevní dysbióza
- chronické onemocnění ledvin → selhávání ledvin
- další komplikace  
(kardiovaskulárním onemocnění, malabsorbce, ...)

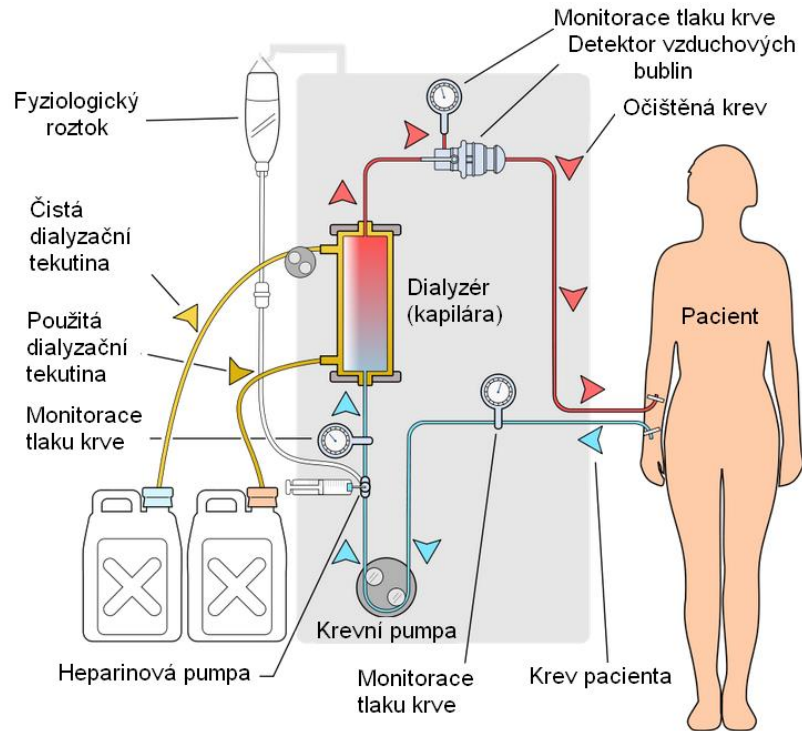
✓ **Dialýza ...**



# Dialýza



## Hemodialýza



silná vaznost IS  
k albuminu



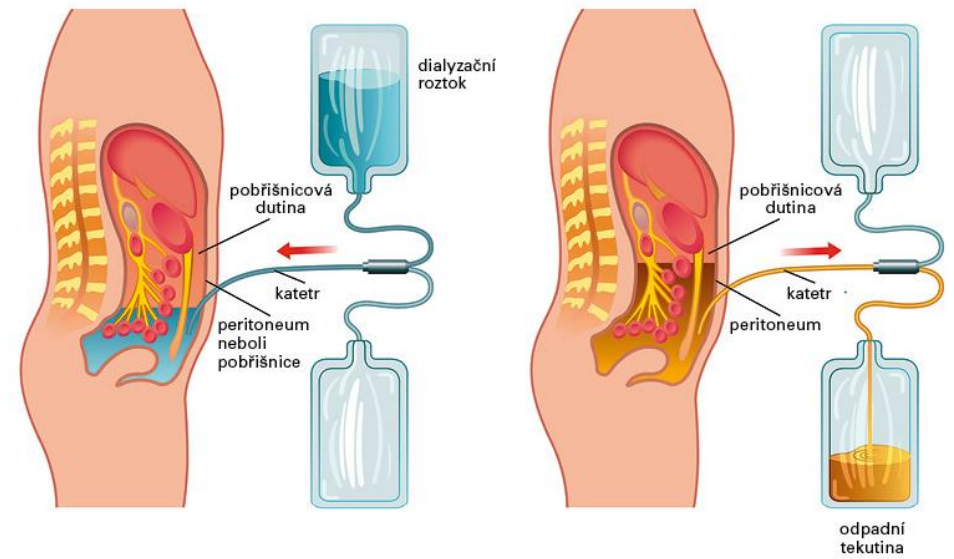
Krevní sérum

Moč

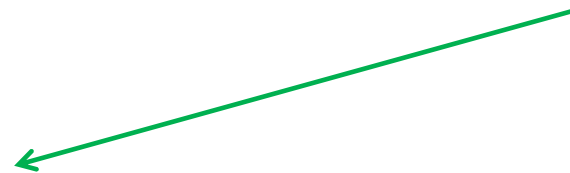
výzkum



## Peritoneální dialýza



*Peritoneální dialyzát*



# FNHK – Spektrofotometrická metoda

## Náš hlavní cíl:

Vyvinout **dostupnou a efektivní** metodu pro stanovení koncentrace IS v **peritoneálním dialyzátu** a v **krevním séru**.

- monitorovat dialyzované pacienty
- zlepšení nutriční péče o pacienty s diagnózou renálního selhávání
  - méně bílkovin v potravě → pozitivní vliv 😊



- ✓ **Vývoj funkčního analytického kitu** – vytvoření vhodné reakční směsi

10 mg	3,5-dichlorfenyldiazonium tetrafluoroboritanu
3 g	kyselina citronová
0,4 g	kyselina dodecylbenzensulfonová
0,5 g	difenylfosfát
1 ml isopropanolu	
Doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml.	

# FNHK – Spektrofotometrická metoda

- ✓ Úprava vzorku před vlastní analýzou
  - deproteinace a uvolnění IS z vazby na albumin

**Anorganická kyselina HClO<sub>4</sub>**  
(nízký výtěžek)

Vzorek 250 µl  
(vodný roztok IS, serum, dialyzát)

+350 µl redestilovaná voda  
+700 µl 7% kyselina chloristá

→ centrifugace  
(10 min, 10.000 g, 20 °C)

Různé objemy vzorku + REAKČNÍ KIT

**Organické rozpouštědlo ACN mísitelné s vodou**

→ vysolení ACN (výtěžek 90 %)

Vzorek 250 µl (vodný roztok IS, serum, dialyzát).

→ přidavek 750 µl Acetonitrilu  
→ točení na Stuart (10 min, otáčky 40)  
→ centrifugace (10 min, 10.000 g, 20 °C)

Po centrifugaci odebráno 750 µl.

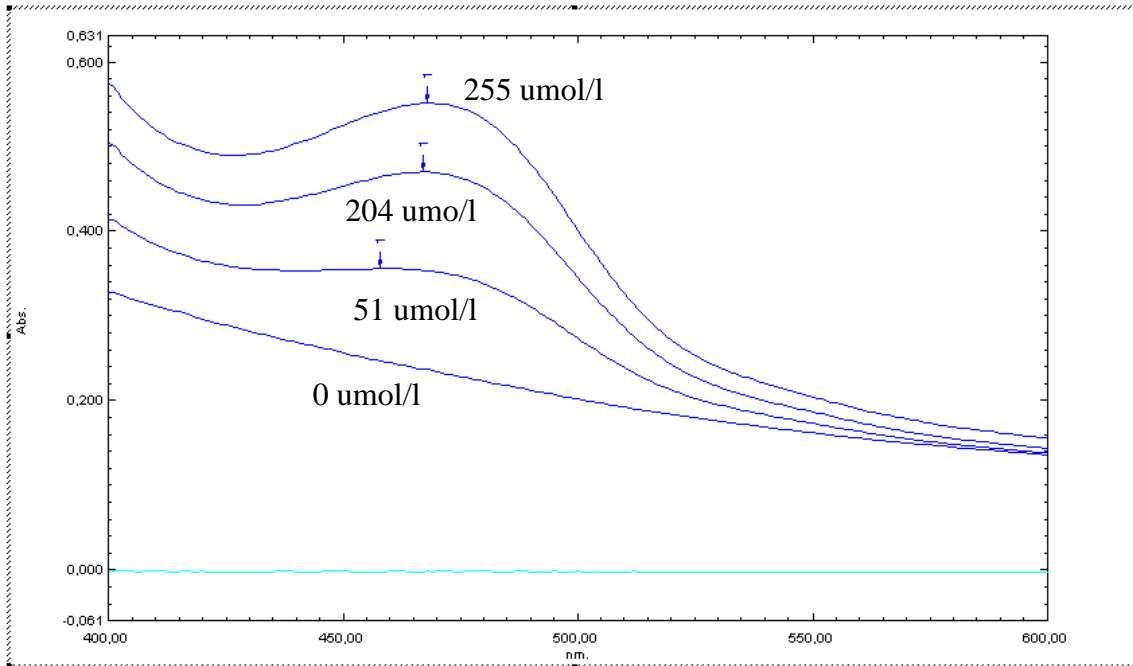
→ přidavek 250 µl roztoku (NaCl (5 mol/l) + HCl (0,1 mol/l))  
tj. 14,6 g NaCl a 0,5 ml konc. HCl do 50 ml destilované vody  
→ točení na Stuart (10 min, otáčky 40)  
→ centrifugace (10 min, 10.000 g, 20 °C)

Odebrána horní vrstva 400 µl pro měření + REAKČNÍ KIT



# FNHK – Spektrofotometrická metoda

✓ Odečet spektra - vodný roztok IS



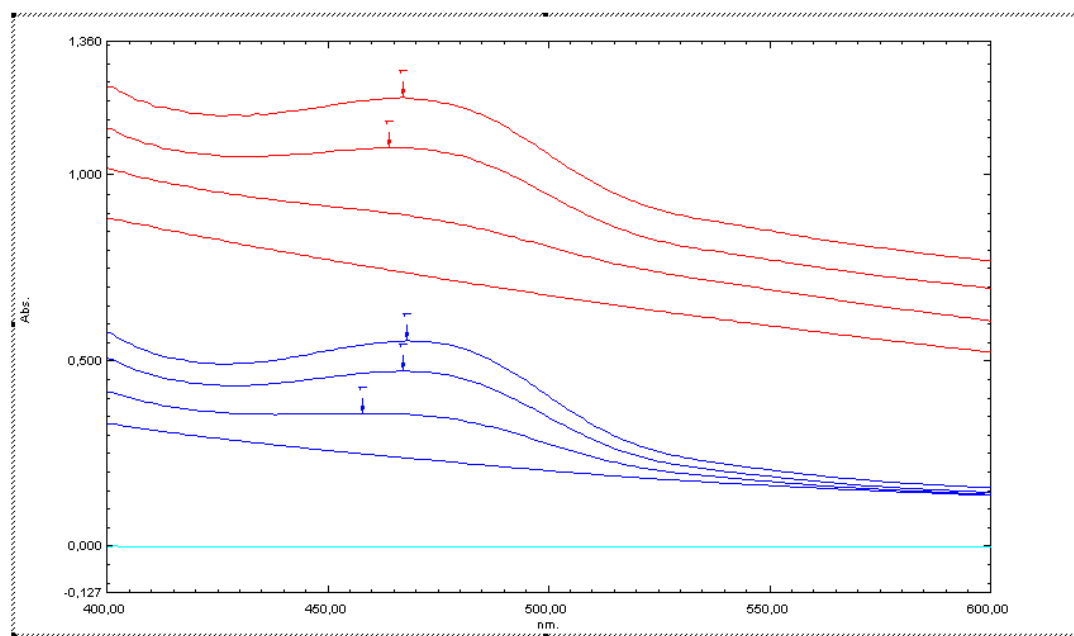
*Spektrofotometr UV-1700 PharmSpec,  
Shimadzu*

Redestilovaná voda

Vodný indoxyl sulfát (0, 51, 204, 255 ( $\mu\text{mol/L}$ ))

# FNHK – Spektrofotometrická metoda

## ✓ Odečet spektra - vodný roztok IS a spike serum



Redestilovaná voda

Vodný indoxyl sulfát (0, 51, 204, 255 (μmol/L))

Spike serum (0, 51, 204, 255 (μmol/L))

*Postup přípravy kalibrační řady – vodný roztok a spike serum.*

*Bylo pipetováno do ependorfky 400 ul voda (serum) a vytvořena kalibrační řada pro vodný roztok (serum).*

*K vodě (seru) byly pipetovány objemy standardního roztoku IS a vody pro vytvoření kalibrační řady -viz. tabulka.*

*Celkový objem byl 500 ul – odebráno 250 ul vzorku pro VUOS a 250 ul pro FNHK a zpracováno dle předchozího postupu vysolením s ACN.*

SERUM (μl)	Standard IS (ul) (zásobní roztok IS ve vodě o koncentraci 1275 umol/L)	Redestilovaná voda (μl)	Koncentrace (μmol/L)
400	0	100	0
400	20	80	51
400	40	60	102
400	60	40	153
400	80	20	204
400	100	0	255

VODA (μl)	Standard IS (μl) (zásobní roztok IS ve vodě o koncentraci 1275 umol/L)	Redestilovaná voda (μl)	Koncentrace (μmol/L)
400	0	100	0
400	20	80	51
400	40	60	102
400	60	40	153
400	80	20	204
400	100	0	255

# FNHK – Spektrofotometrická metoda

## ✓ Kvantifikační postup

### Měření 3 vlnové délky

→ 420 nm (místo zdvihu baseline)

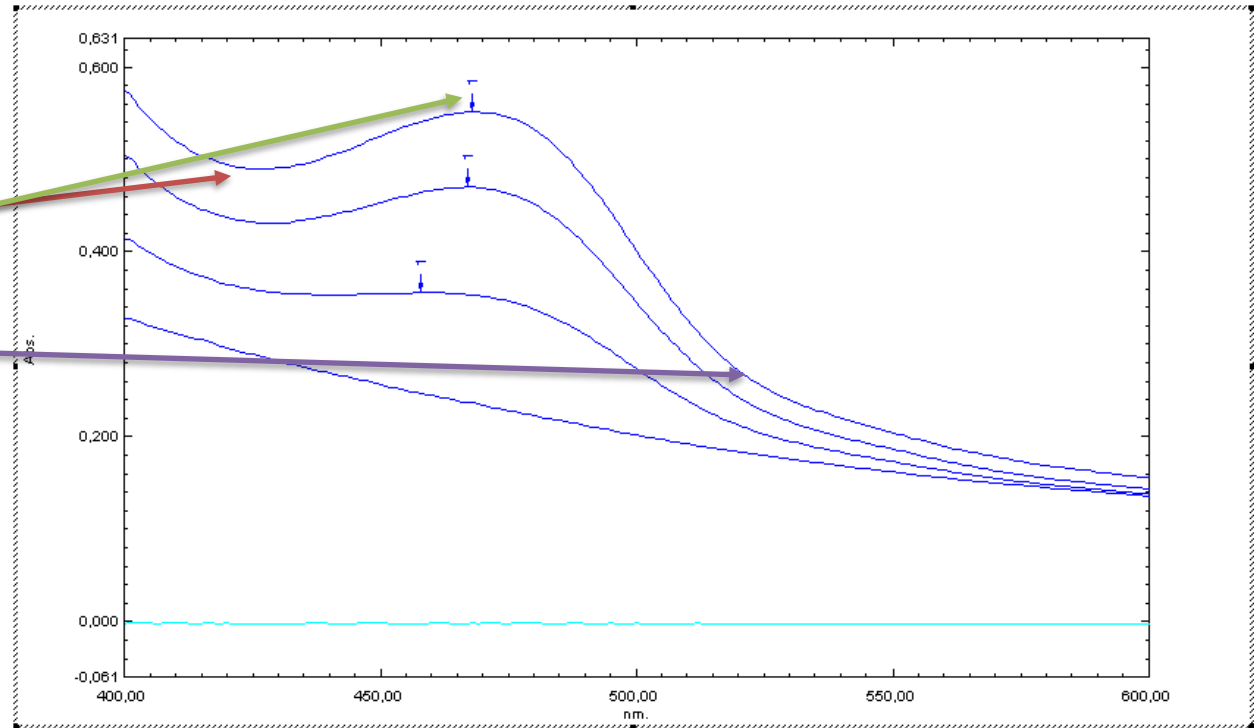
→ 470 nm (absorpční max)

→ 520 nm (místo baseline)

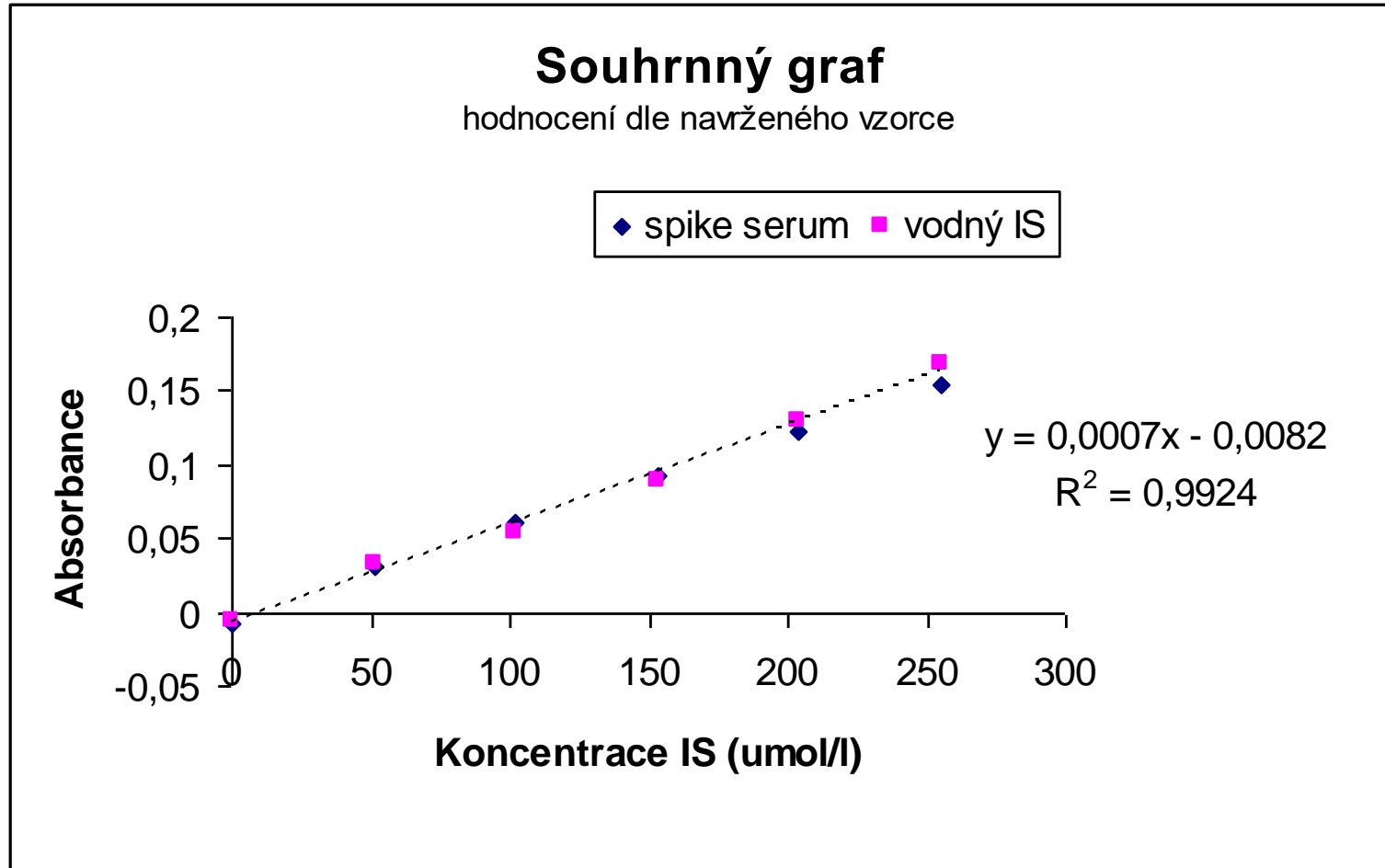
### Výpočet z vlnových délek

Výpočtový vzorec

$$470 - ((420 - 520)/2 + 520))$$



# FNHK – Spektrofotometrická metoda



# Koncentrační rozsah

	Zdravý člověk Fyziologická koncentrace	Pacient docházející na dialýzu
<b>MOČ</b>	Fyziologická koncentrace kreatininu: 5,7 - 14,7 mmol/L Fyziologická koncentrace močového indikantu: 40 - 130 $\mu\text{mol/L}$	většinou nemočí
<b>KREVNÍ SÉRUM</b>	Fyziologická koncentrace kreatininu: ženy 44 – 100 $\mu\text{mol/L}$ muži 60 - 110 $\mu\text{mol/L}$ Fyziologická koncentrace indikantu: 2 – 10 $\mu\text{mol/L}$	10 – 80x vyšší indikan
<b>DIALYZÁT (peritoneální dialýza)</b>	----	průměrně 250 $\mu\text{mol/L}$ indikantu optimum 100 $\mu\text{mol/L}$ indikantu

# VUOS - Předúprava vzorků

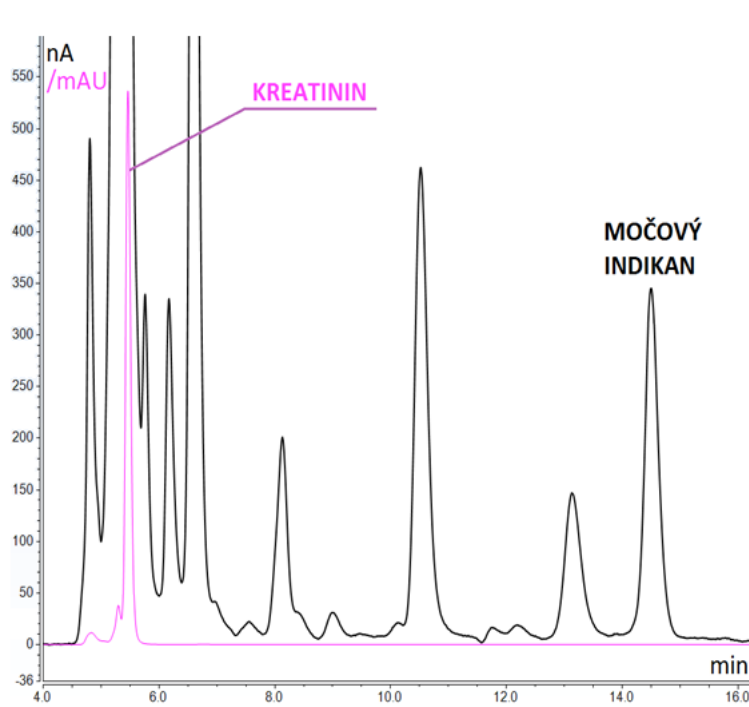
MOČ	KREVNÍ SÉRUM	DIALYZÁT
<p>jednorázový odběr moči → výsledky vztahovány ke koncentraci kreatininu</p>	<p>Vzorky získané stočením plné krve                      1.čerstvé vzorky                      2.Vzorky ihned po odběru zamraženy</p>	<p>1. čerstvé vzorky                      2. Vzorky ihned po odběru zamraženy</p>
<p>JAFFÉ REAKCE                      kreatininu + kyselina pikrová                      v alkalickém prostředí</p>	<p><b>1. srážení bílkovin :</b>                      sérum + kyselina chloristé                      sérum + kyselina methafosforečná                      sérum + vysolení + ACN</p> <p><b><u>2. Centrifugace (teplota, čas, otáčky):</u></b>                      10 000 g – 14 000g                      4 - 20 °C, 5 - 10 min</p>	<p><b>1. srážení bílkovin :</b>                      dialyzát + UPW                      dialyzát + kyselina chloristé                      dialyzát+ kyselina methafosforečná</p> <p><b><u>2. Centrifugace (teplota, čas, otáčky):</u></b>                      10 000 g – 14 000g                      4 - 20 °C, 5 - 10 min</p>

# VUOS - Chromatografická metoda

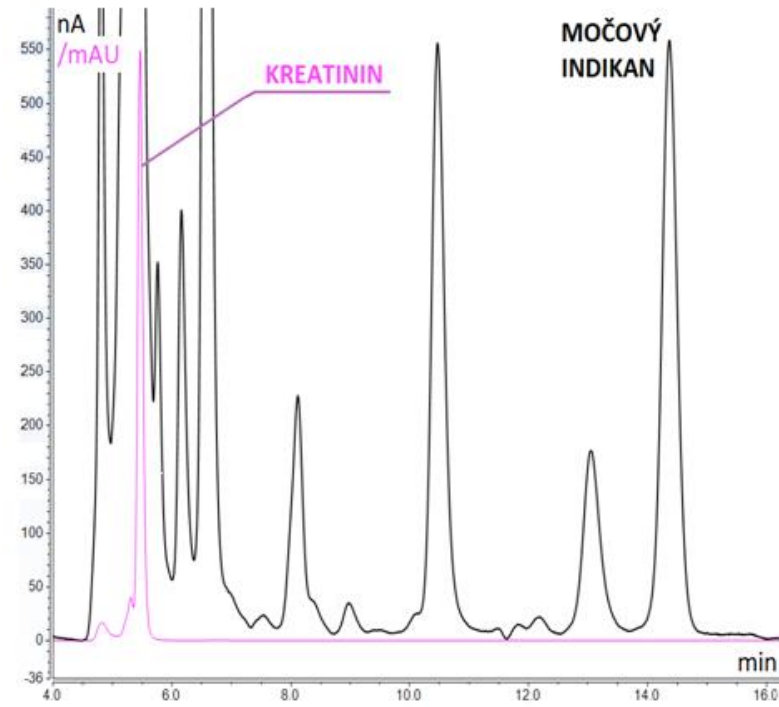
	MOČ	KREVNÍ SÉRUM	DIALYZÁT
<b>SYSTÉM:</b>	UHPLC UltiMate 3000 s ED-DAD	UHPLC UltiMate 3000 s ED-DAD	Agilent 12060 infinity s FLD
<b>KOLONA:</b>	Agilent Zorbax SB-C18 250 x 4,6 mm; 5 µm + předkolona	Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm; 5 µm + předkolona	Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm; 5 µm + předkolona
<b>TEPLOTA NA KOLONĚ:</b>	20 °C	20 °C	25 °C
<b>DÁVKOVANÉ MNOŽSTVÍ:</b>	1 µl	1 µl	10 µl
<b>TEPLOTA V DÁVKOVAČI:</b>	6 °C	6 °C	4 °C
<b>PRŮTOK MOBILNÍ FÁZE:</b>	0,4 ml/min	0,3 ml/min	0,5 ml/min
<b>MOBILNÍ FÁZE:</b>	A (95 %) = Fosfátový pufr pH B (5 %) = Methanol	A (85 %) = Fosfátový pufr pH 4,2 B (15 %) = Methanol	A (82 %) = 0,2 % TFA v UPW B (18 %) = 0,2 % TFA v ACN
<b>NASTAVENÍ DETEKTORU:</b>	E1_+400 mV; E2_0 mV DAD: 500 nm	E1_+400 mV; E2_0 mV	Em 375 nm; Ex_280 nm
<b>DÉLKA ANALÝZY:</b>	20 min	20 min	20 min

# VUOS - Chromatografická metoda

Stanovení IS ve vzorcích moči, HPLC - ED



Fyziologická hladina močového indikantu

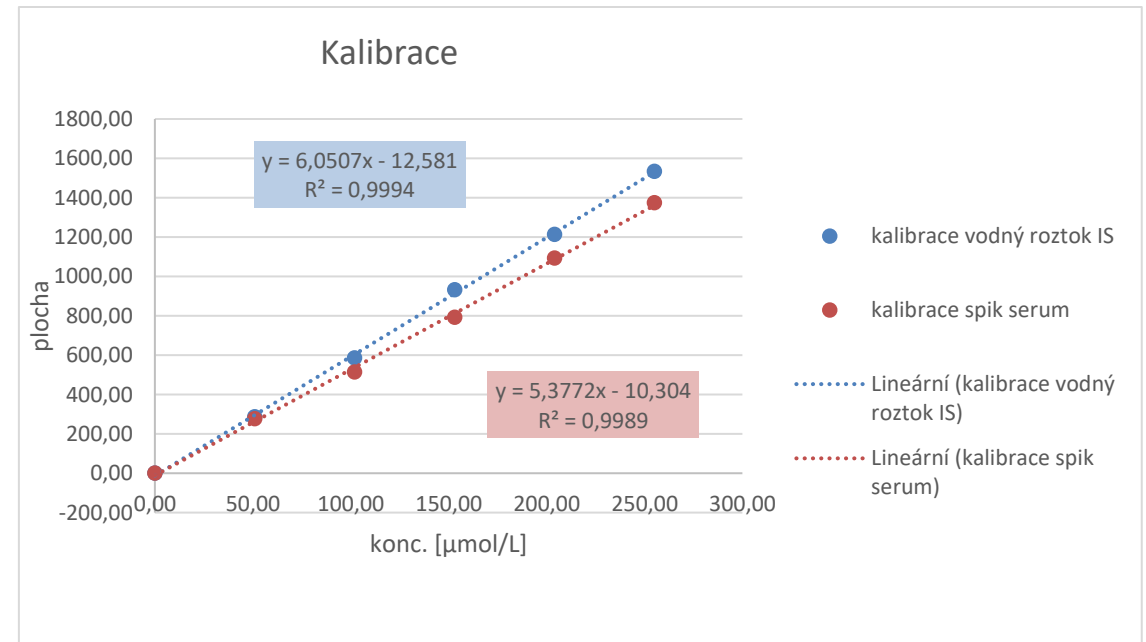
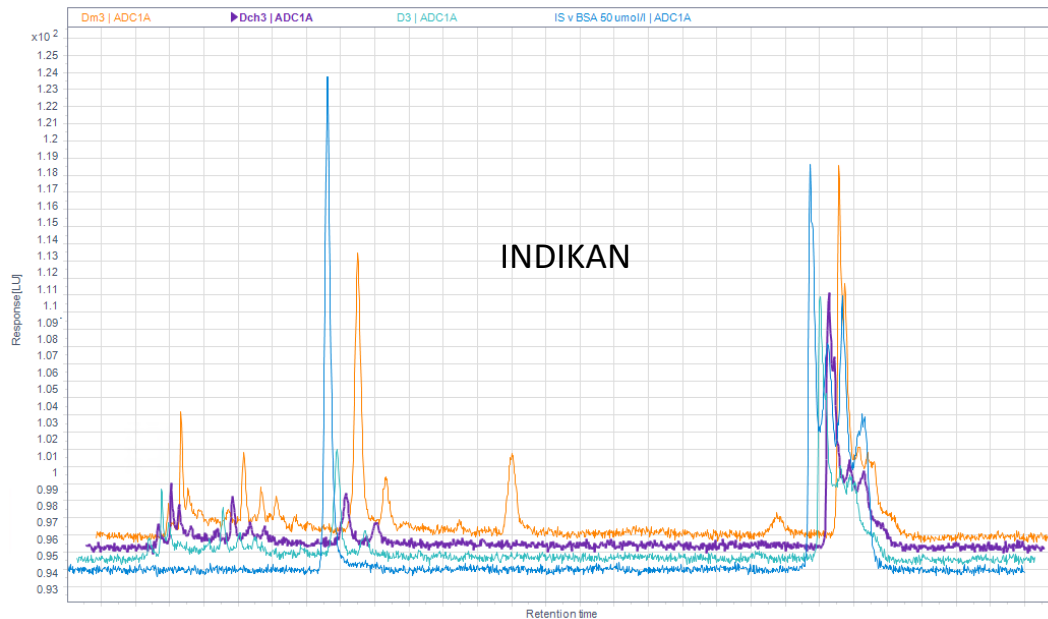


Patologická hladina močového indikantu



# VUOS - Chromatografická metoda

## Stanovení IS ve vzorcích krevního séra



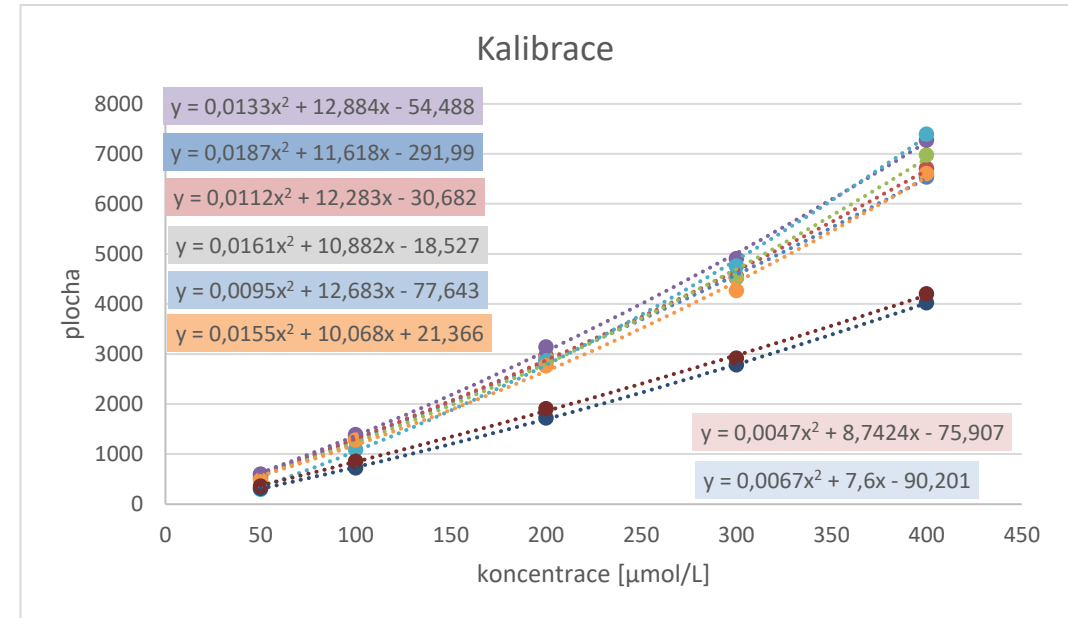
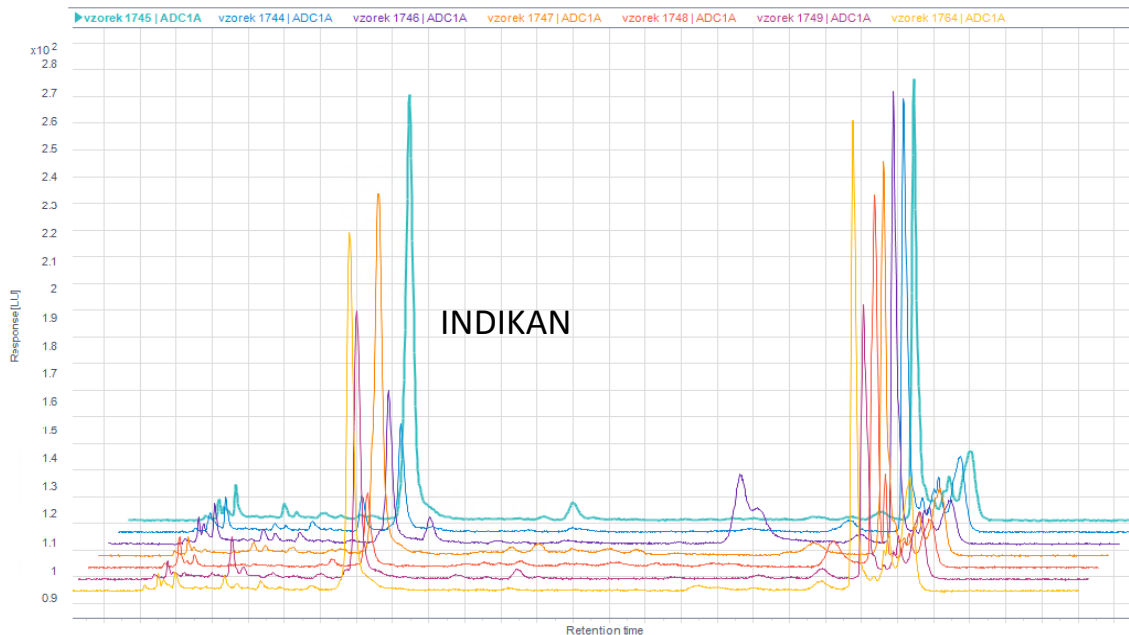
měřené vzorky: zdravé sérum, zachovalá diuréza, anuriční pacienti

předúprava vzorků: 350  $\mu\text{L}$  séra + 350  $\mu\text{L}$  UPW + 700  $\mu\text{L}$  kyseliny chloristé, srážení – centrifugace 14 000g/ 4 °C / 10 min

kalibrace: IS ve vodě, IS ve směsném séru (< 10  $\mu\text{mol/L}$  IS, < 100  $\mu\text{mol/L}$  kreatininu)

# VUOS - Chromatografická metoda

## Stanovení IS ve vzorcích dialyzátu



měřené vzorky: zachovalá diuréza, anuriční pacienti

předúprava vzorků: 200  $\mu\text{L}$  dialyzátu + 200  $\mu\text{L}$  UPW + 400  $\mu\text{L}$  kyseliny chloristé, srážení – centrifugace 10 000g/ 4 °C / 5 min

kalibrace: IS ve vodě, IS v BSA , metoda standardního přídávku

# Validace metod - srovnání

	MOČ	KREVNÍ SÉRUM	DIALYZÁT
<b>MĚŘÍCÍ SYSTÉM:</b>	UHPLC UltiMate 3000 s ED-DAD	UHPLC UltiMate 3000 s ED-DAD	Agilent 12060 infinity s FLD
<b>OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ</b>	nižší konc.: RSD = 4,92 % vyšší konc: RSD = 4,86 %	nižší konc.: RSD = 2,36 % vyšší konc: RSD = 0,65 %	pod 2 %
<b>OPAKOVATELNOST METODY</b>	nižší konc.: RSD = 8,0 % vyšší konc: RSD = 4,6 %	nižší konc.: RSD = 1,77 % vyšší konc: RSD = 0,73 %	pod 5 %
<b>SPRÁVNOST METODY VÝTĚŽNOST</b>	nižší konc.: 101 % (RSD = 8,8 %) vyšší konc: 100 % (RSD = 11,7 %)	nižší konc.: 96,3 % (RSD = 8,8 %) vyšší konc: 97,1 % (RSD = 11,7 %)	80 – 90 %
<b>LINEARITA</b>	4 - 333 $\mu\text{mol/l}$ ( $R^2 = 0,9949$ )	12 - 400 $\mu\text{mol/l}$ ( $R^2 = 0,9999$ )	4 - 350 $\mu\text{mol/l}$ ( $R^2 = 0,9989$ ).
<b>MEZ DETEKCE (LOD) MEZ STANOVITELNOSTI (LOQ)</b>	LOD = 0,06 $\mu\text{mol/l}$ LOQ = 0,08 $\mu\text{mol/l}$	LOD = 1,48 $\mu\text{mol/l}$ LOQ = 2,23 $\mu\text{mol/l}$	1-2 $\mu\text{mol/L}$

# Závěr

výsledek pro lékaře a pacienty

monitoring pacientů

zlepšení nutriční péče o pacienty



včasná diagnostika onemocnění

správnost

přesnost

reprodukovatelnost

*... protože lidský život je to nejcennější ...*

# Děkujeme za Vaši pozornost.



**TJ 04000280**

***Metody hodnocení eliminace uremických toxinů peritoneální dialýzou***