

Laboratorní cvičení z lékařské chemie a biochemie II.

2. ročník, všeobecné lékařství

ZIMNÍ SEMESTR

2021/2022



Ústav lékařské chemie a biochemie

Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Pravidla bezpečnosti a ochrany zdraví při práci

1. Do laboratoře mají přístup pouze studenti, kteří jsou rozvrhem hodin vypsáni na příslušná praktika. Jakékoliv návštěvy jsou zakázány.
2. Studenti jsou povinni před nástupem do praktik teoreticky ovládat úlohy, které budou prakticky provádět. Přinesou si laboratorní plášť a pracovní návod. Praktikování bez pláště je nepřípustné. Vlasy musí být upraveny tak, aby nemohlo dojít k úrazu při práci s kahanem. Svrchní oděvy, tašky, batohy a ostatní zavazadla studenti odloží na místě k tomu určeném.
3. Veškeré odchody z praktik jsou povoleny pouze s výslovným svolením asistenta vedoucího praktika.
4. V laboratoři je povoleno provádět pouze ty práce, které jsou náplní praktického cvičení. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit, dále přechovávat potraviny a používat laboratorní nádobí a zařízení k jiným účelům, než jsou určeny.
5. Pro práce, při nichž může dojít k úniku škodlivých chemických látek do ovzduší, se musí zabezpečit odsávání. Práce s látkami dýmovými, dráždivými, zapáchajícími, jedovatými plyny a parami, stejně jako žíhání a spalování je dovoleno provádět jen v digestořích.
6. Při nasazování balónku na skleněnou pipetu je nutné dbát zvýšené opatrnosti. Střepy a jiné odpadky s ostrými hranami musí být odkládány do zvláštní nádoby s označením „SKLO“.
7. Do výlevek lze vylévat jen rozpouštědla s vodou dokonale mísitelná, dostatečně zředěná (nejméně 1:10), v množství nejvýše 0,5 litru a vodné roztoky kyselin a zásad zředěné nejméně 1:30. S vodou nemísitelná rozpouštědla, jedy, kyseliny a louhy nad uvedenou koncentraci a látky, které uvolňují jedovaté a dráždivé plyny, do výlevek vylévat nelze. Tyto látky se likvidují do zvláštní odpadní nádoby.
8. Při ředění se kyseliny zásadně vlévají do vody, nikoliv naopak.
9. Je zakázáno nasávat roztoky do pipet ústy. Musí být použito příslušných pomůcek (balónek).
10. Rozlité kyseliny je nutno ihned spláchnout vodou, případně neutralizovat práškovou sodou. Rozlité zásady stačí jen důkladně spláchnout vodou.
11. Při rozlití hořlavých kapalin se musí okamžitě zhasnout všechny kahany, vypnout elektrický proud a zajistit účinné větrání. Rozlitá kapalina se nechá vsáknout do vhodného porézního materiálu, který se odklidí na bezpečné místo.
12. Při zahřívání kapalin v baňkách se musí zabránit utajenému varu alespoň tak, že se do baňky vloží varný kamínek.
13. Před zahájením práce je nutno zkontrolovat stav všech přístrojů a zařízení, případné závady a nedostatky nahlásit asistentovi nebo laborantce.
14. Posluchačům je zásadně zakázána jakákoliv svévolná manipulace s elektrickou instalací, s přístrojovým vybavením a materiálem. Zapnutí přístroje a zapálení plynových kahanů se děje až po souhlasu asistenta nebo laborantky.
15. Obsluha laboratorní centrifugy musí být prováděna jen v přítomnosti asistenta nebo laborantky. Centrifugační nádoby musí být dokonale vyváženy, víko centrifugy při chodu bezpečně uzavřeno.
16. Při úniku plyných paliv (zemní plyn) musí být uzavřen přívod plynu, vypnut elektrický proud a účinně větráno.
17. Zapálené kahany nelze nechat hořet bez dozoru. Prošlehne-li plamen dovnitř, musí se okamžitě uzavřít přívod plynu a kahan seřídít.
18. Jakékoliv nehody, úrazy, požití chemikálií apod. je nutno ihned nahlásit vedoucímu asistentovi.
19. Hrubé porušení uvedených pravidel, vyplývající z nekázně či neznalosti, má za následek vykázání posluchače z praktických cvičení se sankcí neomluvené absence.
20. Studenti musí být seznámeni s klasifikací látek toxických, kancerogenních, mutagenních a toxických pro reprodukci. Bezpečnostní listy jednotlivých látek jsou k dispozici v praktikárnách.
21. Studenti musí být seznámeni s pravidly bezpečnosti práce s látkami vysoce toxickými (označeny T+) používanými ve studentské laboratoři (např. rtuť, kyanid draselný, ethidium bromid, dusičnan rtuťnatý).

ROZPIS ÚLOH

<u>Vyšetřování krve I (proteiny)</u>	<i>strana 4</i>
a) Stanovení celkové bílkoviny biuretovou reakcí	
b) Stanovení albuminu	
c) Stanovení C-reaktivního proteinu (CRP) v séru	
<u>Vyšetřování krve II (glukóza, lipidy)</u>	<i>strana 8</i>
a) Stanovení glukózy v séru	
b) Stanovení glukózy v kapilární krvi glukometrem	
c) Stanovení celkového cholesterolu	
d) Stanovení triacylglycerolů	
<u>Vyšetřování krve III (dusíkaté látky)</u>	<i>strana 15</i>
a) Stanovení močoviny	
b) Stanovení kyseliny močové	
c) Stanovení přímého a celkového bilirubinu	
<u>Vyšetřování moči I</u>	<i>strana 21</i>
a) Fyzikální vyšetření moči	
b) Základní chemické vyšetření moči	
c) Mikroskopické vyšetření močového sedimentu	
<u>Vyšetřování moči II</u>	<i>strana 30</i>
a) Stanovení glomerulární filtrace jako clearance kreatininu	
b) Aminokyseliny a jejich metabolity v moči	
<u>Klinická enzymologie</u>	<i>strana 35</i>
a) Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v séru	
b) Stanovení aktivity alkalické fosfatázy v séru	
c) Sledování aktivity aminotransferáz ALT a AST v jaterním extraktu	
d) Stanovení α -amylázy v moči	
<u>Vybrané klinicko-biochemické hodnoty</u>	<i>strana 42</i>

Vyšetřování krve I (proteiny)

a) Stanovení celkové bílkoviny biuretovou reakcí

Peptidy (nejméně tříčlenné) poskytují podobně jako biuret a karbamylderiváty s ionty Cu^{2+} v alkalickém prostředí modrý komplex vhodný k fotometrickému stanovení.

Provedení

Připravte si tři zkumavky a označte je **vz**, **st** a **0**. Do zkumavek odpipetujte podle tabulky sérum, standard, fyziologický roztok a biuretové činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek séra (ml)	0,1	-	-
standard (ml)	-	0,1	-
fyziol. roztok (ml)	-	-	0,1
biuretové činidlo (ml)	5,0	5,0	5,0

Nechte stát **30 minut** při laboratorní teplotě. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **546 nm**.

A_{vzorku}	
$A_{\text{standardu}}$	

Vypočítejte koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku podle následujícího vztahu:

$$\text{Koncentrace celkové bílkoviny ve vzorku: } c \text{ (g/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$$

Koncentrace standardu: $c_{\text{st}} = 70 \text{ g/l}$

Výsledek porovnejte s normální hodnotou celkové bílkoviny v séru.

Závěr:

b) Stanovení albuminu

Bromkrezolový purpur (5,5'-dibrom-o-kresolsulfonftalein) tvoří s albuminem ve slabě kyselém prostředí za přítomnosti povrchově aktivních látek zelenomodrý komplex vhodný k fotometrickému stanovení.

Provedení

Připravte si tři zkumavky a označte je **vz**, **st** a **0**. Do zkumavek odpipetujte podle tabulky sérum, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek séra (ml)	0,02	-	-
standard (ml)	-	0,02	-
dest.voda (ml)	-	-	0,02
činidlo (ml)	2,0	2,0	2,0

Roztoky zamíchejte a nechte stát **10 minut** při laboratorní teplotě. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **600 nm**.

A_{vzorku}	
$A_{\text{standardu}}$	

Vypočítejte koncentraci albuminu ve vzorku podle vztahu:

$$\text{Koncentrace albuminu ve vzorku: } c \text{ (g/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$$

$$\text{Koncentrace standardu: } c_{\text{st}} = 40 \text{ g/l}$$

Výsledek porovnejte s normální hodnotou albuminu v séru.
Vypočítejte **albumino-globulinový kvocient**.

$$A/G = \frac{c_{\text{alb.}}}{c_{\text{celk.b.}} - c_{\text{alb.}}}$$

Orientační rozmezí A/G je 1,3 – 2,0

Závěr:

c) Stanovení C-reaktivního proteinu (CRP) v séru

CRP je klasická bílkovina akutní fáze, jedna z prvních, které byly objeveny. Její nárůst v plazmě nebo séru téměř vždy poukazuje na přítomnost zánětu, především zánětu vyvolaného bakteriální infekcí. Vzestup koncentrace CRP doprovází také nekrózu tkání a malignity, přičemž výše hladiny odráží závažnost nemoci a rozsah tkáňového poškození. Koncentrace CRP v séru začíná růst 6 hodin po začátku poruchy, maxima dosahuje za 48 hodin a klesá s poločasem okolo 48 hodin.

CRP je složen z pěti polypeptidových podjednotek, z nichž každá obsahuje 206 aminokyselinových zbytků. Tato struktura řadí CRP mezi pentraxiny, proteiny s funkcí v imunitní obraně organismu, které se vyskytují u všech obratlovců i u většiny bezobratlých, jedná se tedy o fylogeneticky velmi starou bílkovinu. CRP se vytváří v játrech velmi rychle po indukci prostřednictvím cytokinů a na vrcholu reakce akutní fáze může dosáhnout jeho tvorba až 20 % celkové jaterní proteosyntézy.

Biologickou funkcí CRP je vázat se na řadu endogenních i exogenních látek a urychlovat jejich odstranění z krve a tkání opsonizací (tj. např. u urychlení fagocytózy). Na buňky vlastního organismu se CRP váže jen v případě, že mají poškozenou normální strukturu membrány. Naopak, k vazbě CRP na buňky bakterií nebo parazitů dochází i v případě, že se jedná o živé nepoškozené mikroorganismy. Vazba na CRP může dokonce propojit některé ligandy a vést k jejich precipitaci v tkáních.

Ke stanovení CRP se používá imunoturbidimetrická metoda. Vzorek (sérum nebo plazma) se inkubuje v přítomnosti specifické protilátky proti lidskému CRP (antisérum, monoklonální protilátky) a míra imunoprecipitace se kvantifikuje turbidimetricky při vlnové délce 700 nm.

Provedení

K **0,05 ml** séra ve zkumavce přidejte **2,0 ml** roztoku protilátek.

Promíchejte a inkubujte **10 minut při 37° C**.

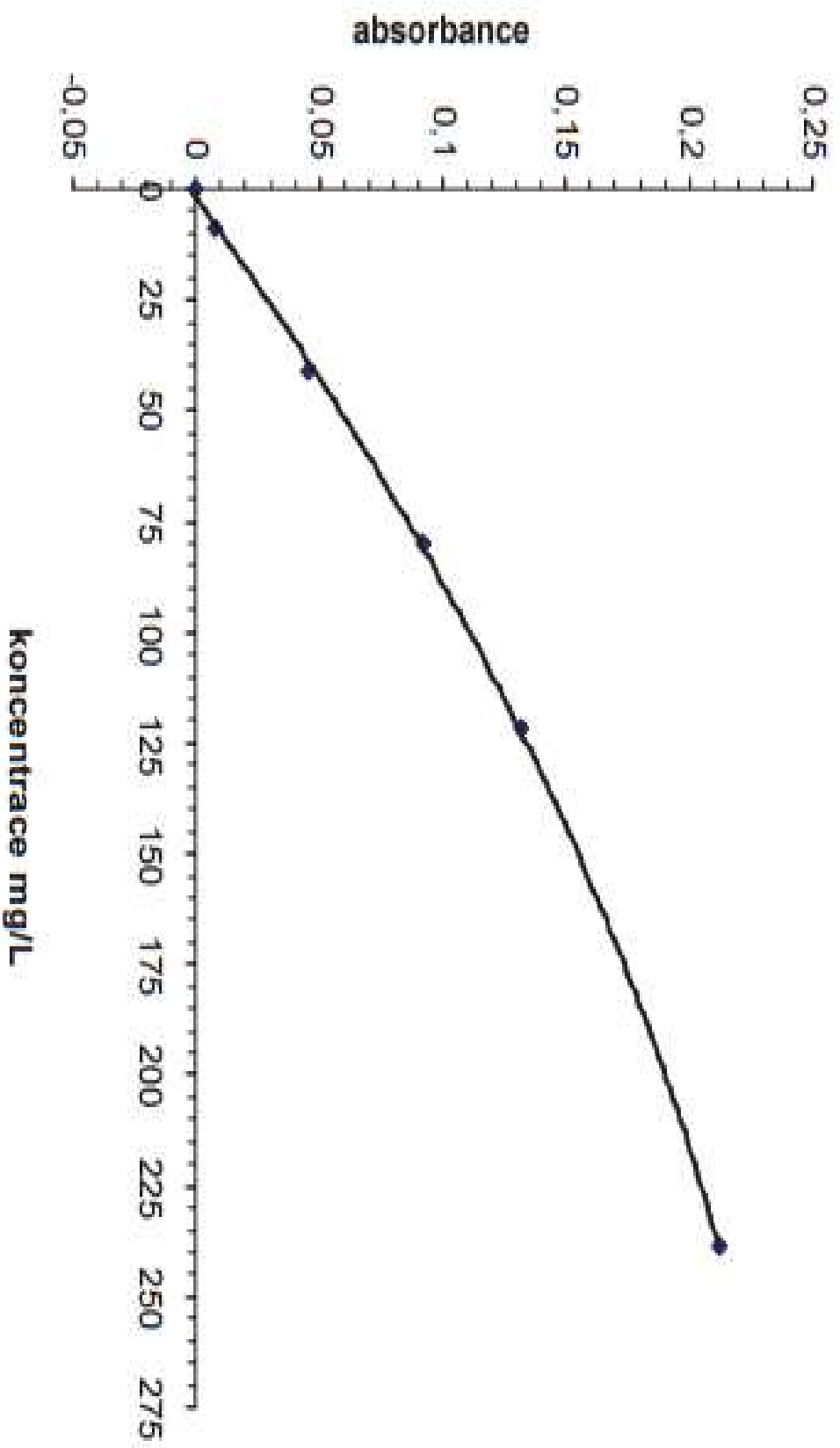
Změřte absorbanci zakaleného roztoku proti vodě při **700 nm**.

A vzorku	
----------	--

Podle přiložené kalibrační křivky odečtěte koncentraci CRP v mg/l a výsledek interpretujte.

Závěr:

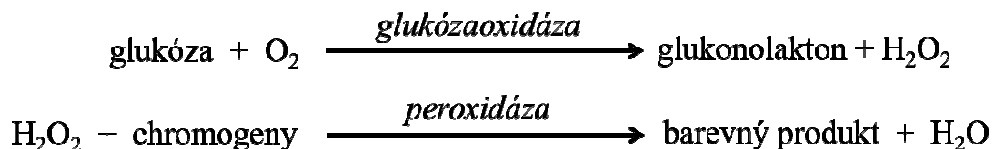
CRP - turbidimetry



Vyšetřování krve II (glukóza, lipidy)

a) Stanovení glukózy v séru

Glukóza se oxiduje vzdušným kyslíkem za katalýzy glukózaoxidázou na glukonolakton a peroxid vodíku, který se stanoví oxidační kopulací se substituovaným fenolem a 4-aminofenazonem. Tato druhá reakce je katalyzovaná peroxidázou.



Provedení

Připravte si tři zkumavky a označte je **vz**, **st** a **0**. Do zkumavek odpipetujte podle tabulky sérum, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
Vzorek séra (ml)	0,02	-	-
standard (ml)	-	0,02	-
destilovaná voda (ml)	-	-	0,02
činidlo (ml)	2,0	2,0	2,0

Inkubujte **15 minut** při **37°C**. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **498 nm**.

A vzorku	
A standardu	

Vypočítejte koncentraci vzorku podle následujícího vztahu:

$$\text{Koncentrace glukózy ve vzorku: } c \text{ (mmol/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$$

$$\text{Koncentrace standardu: } c_{\text{st}} = 10 \text{ mmol/l}$$

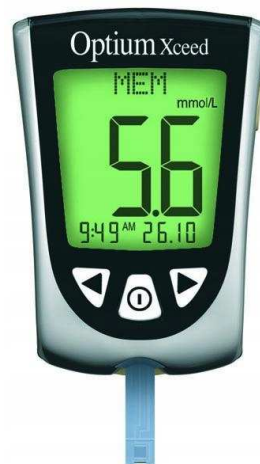
Výsledek porovnejte s normální hodnotou glukózy v séru.

Závěr:

b) Stanovení glukózy v kapilární krvi glukometrem

Glukometr Optimum xceed využívá pro měření glukózy elektrochemický princip. Jedná se o kombinaci glukózooxidázové reakce a ampérometrie. Na testacím proužku je úzká kapilára, kterou je krev nasávána dovnitř. Zde proběhne oxidace glukózy za vzniku peroxidu vodíku. Čím více je glukózy v krvi, tím více vznikne molekul peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je v glukometru elektrolyticky rozkládán na kladné kationty vodíku a záporné anionty kyslíku. Anionty kyslíku putují k registrační elektrodě. Takto vzniká proud záporně nabitých částic, jenž může být změřen glukometrem jako elektrický proud. Velikost proudu odpovídá výsledné glykemii.

Před vlastním odběrem vzorku vyjměte testovací proužek z fóliového obalu. Vložte konec testovacího proužku se třemi černými pruhy do portu. Testovací proužek zasuňte až na doraz. Glukometr se automaticky zapne. Na displeji se zobrazí symbol kapky. Dezinfikujte a osušte špičku prstu. Proveďte vpich lancetou. Kápněte kapku krve na bílou plošku na konci testovacího proužku. Kapka krve se nasaje do testovacího proužku. Po pár vteřinách se na displeji zobrazí hodnota glykémie. Vyjmutím testovacího proužku z portu vypnete glukometr.



Zaznamenejte změřenou hodnotu glukózy v mmol/l a výsledek interpretujte.

Závěr:

d) Stanovení celkového cholesterolu



Intenzita vzniklého růžovočerveného zabarvení je úměrná koncentraci cholesterolu.

Provedení

Připravte si tři zkumavky a označte je **vz**, **st** a **0**. Do zkumavek odpipetujte podle tabulky sérum, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek séra (ml)	0,02	-	-
standard (ml)	-	0,02	-
destilovaná voda (ml)	-	-	0,02
činidlo (ml)	2,0	2,0	2,0

Promíchejte a inkubujte **20 minut** při **37°C**.

Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **498 nm**.

A vzorku	
A standardu	

Vypočítejte koncentraci vzorku podle následujícího vztahu:

$$\text{Koncentrace celkového cholesterolu ve vzorku: } c \text{ (mmol/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$$

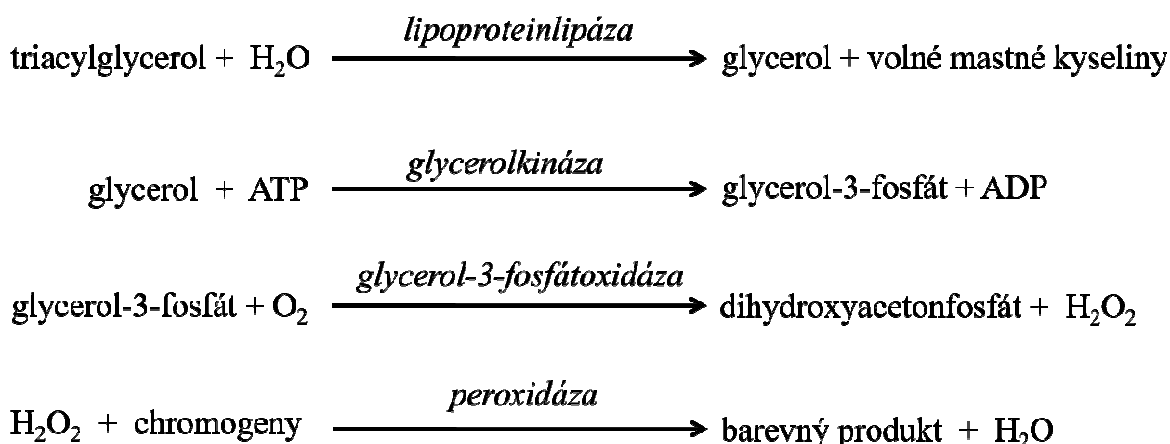
$$\text{Koncentrace standardu: } c_{\text{st}} = 5,17 \text{ mmol/l}$$

Výsledek porovnejte s normální hodnotou celkového cholesterolu v séru.

Závěr:

e) Stanovení triacylglycerolů

Koncentrace triacylglycerolů (TAG) se stanoví enzymaticky. Činidlo obsahuje celkem čtyři enzymy. Reakce probíhající během stanovení ukazuje následující schéma:



Provedení

Připravte si tři **eppendorfky** a označte je **vz**, **st** a **0**. Do nich odpipetujte podle tabulky sérum, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek séra (ml)	0,01	-	-
standard (ml)	-	0,01	-
destilovaná voda (ml)	-	-	0,01
činidlo (ml)	1,0	1,0	1,0

Eppendorfky vložte do thermobloku. Inkubujte **10 minut při 37°C**.

Na spektrofotometru nastavte (podle příloženého postupu) vlnovou délku **546 nm**.

Po uplynutí inkubační doby vyjměte eppendorfku a opatrně přelijte obsah do tří spektrofotometrických kyvet. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku.

A vzorku	
A standardu	

Vypočítejte koncentraci vzorku podle následujícího vztahu:

$$\text{Koncentrace TAG ve vzorku: } c \text{ (mmol/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$$

$$\text{Koncentrace standardu: } c_{\text{st}} = 2,26 \text{ mmol/l}$$

Výsledek porovnejte s normální hodnotou TAG v séru.

Závěr:

Výpočet LDL cholesterolu

Výpočet koncentrace LDL cholesterolu se provádí podle Friedewalda na základě látkové koncentrace cholesterolu celkového, HDL cholesterolu a triacylglycerolů. Výpočet je založen na předpokladu, že cholesterol je obsažen v částicích VLDL, LDL a HDL. Koncentrace VLDL je v rovnici odhadována z hladiny triacylglycerolů.

$$\text{LDL cholesterol (LDL-C)} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL cholesterol} - \frac{\text{TAG}}{2,2}$$

Pro výpočet LDL cholesterolu potřebujete stanovit ještě HDL cholesterol, počítejte s **0,9 mmol/l**.

Výpočet, závěr:

Vyhodnocení rizika aterosklerózy

Z naměřených hodnot týkajících se lipidového metabolismu lze počítat různé ukazatele. Doporučovány jsou indexy, které berou v úvahu vliv koncentrace nejen celkového cholesterolu, ale i HDL cholesterolu.

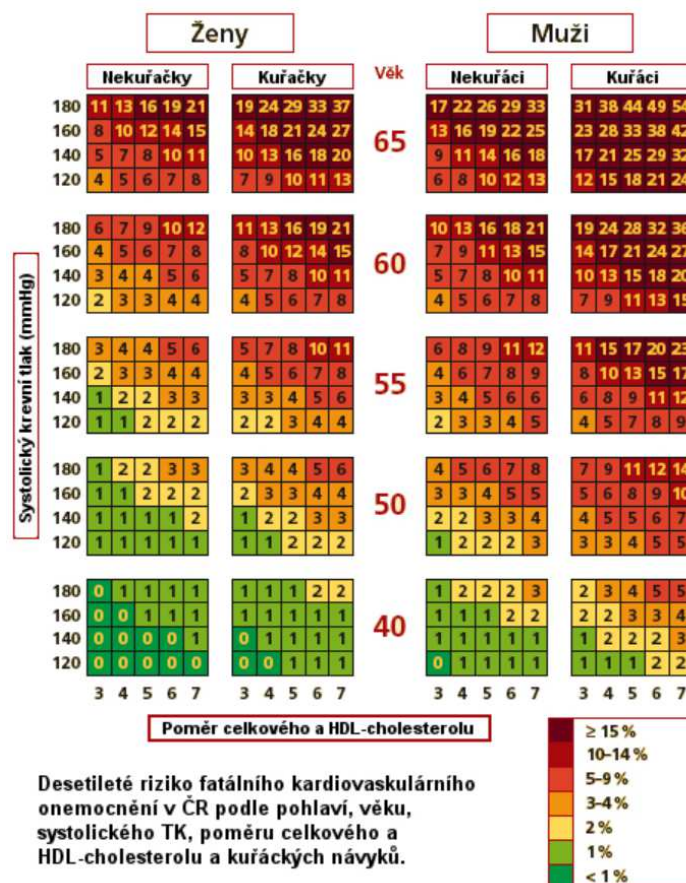
$$\text{Aterogenní index (AI)} = \frac{\text{celkový cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

Riziko aterosklerózy se zvyšuje se stoupající hodnotou aterogenního indexu. Tento výpočet zohledňuje, že zvýšená hladina celkového cholesterolu může být zapříčiněna zvýšenou hladinou HDL cholesterolu, který není rizikový.

Existují i ukazatele počítající s hladinou triacylglycerolů jako je např. aterogenní index plazmy.

$$\text{Aterogenní index plazmy (AIP)} = \log \frac{\text{TAG}}{\text{HDL cholesterol}}$$

Rizikových faktorů aterosklerózy je ale více (věk, pohlaví, hypertenze, kouření). V klinické praxi se pro vyhodnocení celkového kardiovaskulárního rizika používá tabulka vycházející z projektu SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation), pomocí které se provádí odhad rizika fatálních kardiovaskulárních příhod v následujících 10 letech.



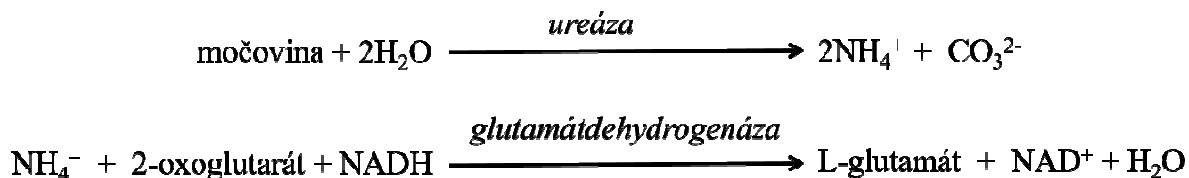
Tabulka rizika podle projektu SCORE

Vyhodnoťte riziko aterosklerózy pro muže, nekuřáka, 60 let, s krevním tlakem 140/90. Použijte během praktik naměřené hodnoty cholesterolu.

Hodnocení, závěr:

Vyšetřování krve III (dusíkaté látky)

a) Stanovení močoviny



Provedení

Fotometr zapněte hlavním vypínačem a nechte temperovat při **37°C 10 minut**.

Navolte vlnovou délku **340 nm**.

Všechno měřte proti destilované vodě.

1) Měření reagenčního blanku

Do fotometrické kyvety připravte reagenční blank: **0,02 ml destilované vody** a **2 ml pracovního roztoku**. Obsah kyvety promíchejte nasátím do pipety a následným vypuštěním zpět do kyvety. Spustíte stopky a kyvetu vložte do fotometru. Po **30 s** odečtete počáteční absorpenci (A_1), další absorpenci odečtete přesně po **1 minutě** od předešlého měření (A_2).

A ₁ blanku	
A ₂ blanku	

2) Měření standardu

Do fotometrické kyvety napipetujte **0,02 ml standardu** a **2 ml pracovního roztoku**. Promíchejte, stiskněte stopky a vložte do fotometru. Po **30 s** odečtete absorpenci (A_1), další absorpenci odečtete přesně po **1 minutě** od předešlého měření (A_2).

A ₁ standardu	
A ₂ standardu	

3) Měření vzorku

Stejný postup použijte při měření vzorku (**0,02 ml vzorku + 2 ml pracovního roztoku**).

A ₁ vzorku	
A ₂ vzorku	

Výpočet

Vypočítejte změnu absorbance za 1 minutu pro reagenční blank, standard i vzorek:

$\Delta A_{bl} = A_1 \text{ blanku} - A_2 \text{ blanku}$	
$\Delta A_{st} = A_1 \text{ standardu} - A_2 \text{ standardu}$	
$\Delta A_{vz} = A_1 \text{ vzorku} - A_2 \text{ vzorku}$	

Vypočítejte koncentraci močoviny v séru:

Koncentrace močoviny ve vzorku: $c \text{ (mmol/l)} = \frac{\Delta A_{vz} - \Delta A_{bl}}{\Delta A_{st} - \Delta A_{bl}} \times c_{st}$

Koncentrace standardu: $c_{st} = 15 \text{ mmol/l}$

Výsledek porovnejte s normální hodnotou močoviny v séru.

Výpočet, závěr:

b) Stanovení kyseliny močové

Koncentrace kyseliny močové se stanoví dvěma po sobě jdoucími enzymovými reakcemi. Nejprve **oxidací** a fotometricky měřitelný barevný produkt vzniká **oxidační kopulací** dvou původně nebarevných sloučenin.



Provedení

Označte 3 eppendorf zkumavky symboly **vz**, **st** a **0**. Do nich odpipetujte podle tabulky vzorek, standard, destilovanou vodu a činidlo.

	vz (vzorek)	st (standard)	0 (porovnávací roztok)
vzorek (ml)	0,02	-	-
standard (ml)	-	0,02	-
voda (ml)	-	-	0,02
činidlo (ml)	1,00	1,00	1,00

Eppendorfky vložte do thermobloku. Inkubujte **2 minuty při 37°C**.

Na spektrofotometru nastavte vlnovou délku **550 nm**.

Po uplynutí inkubační doby vyjměte eppendorfku a opatrně přelijte obsah do tří spektrofotometrických kyvet. Změřte absorbanci vzorku a standardu proti porovnávacímu roztoku.

A_{vzorku}	
$A_{\text{standardu}}$	

Vypočítejte koncentraci vzorku podle následujícího vztahu:

$$\text{Koncentrace kyseliny močové ve vzorku: } c \text{ (}\mu\text{mol/l)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times c_{\text{st}}$$

$$\text{Koncentrace standardu: } c_{\text{st}} = 357 \mu\text{mol/l}$$

Výsledek porovnejte s normální hodnotou kyseliny močové v séru.

Závěr:

c) Stanovení přímého a celkového bilirubinu v séru

Bilirubin poskytuje s diazotovanou kyselinou sulfanilovou intenzivně zbarvený roztok azobarviva, vhodný k fotometrickému stanovení. Stanovení přímého (konjugovaného) bilirubinu provádíme bez akcelérátoru, celkový bilirubin (konjugovaný + nekonjugovaný) stanovujeme v přítomnosti akcelérátoru (kofein + benzoan).

Stanovení přímého bilirubinu

Připravte si dvě zkumavky a označte je symboly **vz** a **0**. Do zkumavek napipetujte podle tabulky činidlo, dusitan sodný, fyziologický roztok a sérum.

	vz (vzorek)	0 (porovnávací roztok)
činidlo – kys. sulfanilová (ml)	0,2	0,2
dusitan sodný	1 kapka	1 kapka
fyziologický roztok (ml)	1,0	1,2
sérum (ml)	0,2	-

Promíchejte a přesně po **5 minutách** změřte absorbanci vzorku proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **510 nm**.

A vzorku	
----------	--

Koncentraci přímého bilirubinu odečtete z kalibračního grafu.

Stanovení celkového bilirubinu

Do dvou zkumavek označených symboly **vz** a **0** napipetujte podle tabulky:

	vz (vzorek)	0 (porovnávací roztok)
činidlo – kys. sulfanilová (ml)	0,2	0,2
dusitan sodný	1 kapka	1 kapka
akcelerátor (ml)	1,0	1,0
fyzilogický roztok (ml)	-	0,2
sérum (ml)	0,2	-

Promíchejte a po **10 minutách** přidejte:

tlumivý roztok (ml)	1,0	1,0
---------------------	-----	-----

Promíchejte a po **5 minutách** změřte absorbanci vzorku proti porovnávacímu roztoku při vlnové délce **580 nm**.

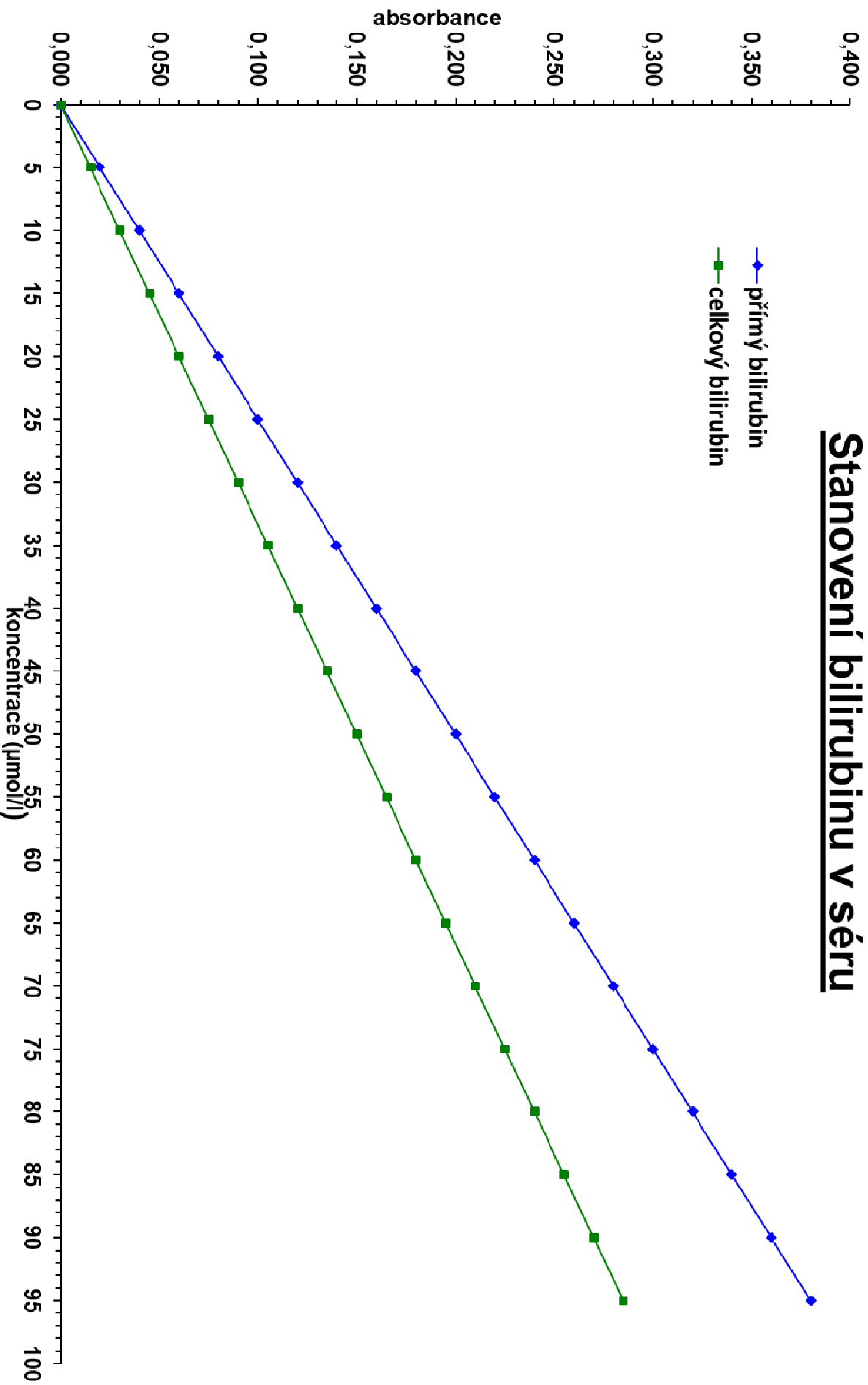
A_{vzorku}	
---------------------	--

Koncentraci celkového bilirubinu odečtete z kalibračního grafu.

Výsledky obou metod interpretujte. O jaký typ hyperbilirubinémie se jedná?

Závěr:

Stanovení bilirubinu v séru



Vyšetřování moči I

a) Fyzikální vyšetření moči

Termínem fyzikální vyšetření moči se myslí to, co jde zjistit lidskými smysly, případně pomocí jednoduchých pomůcek:

- objem moči vytvořený za určitý čas (diuréza)
- barva
- zákal
- pěna
- zápach
- specifická hmotnost (hustota)
- osmolalita

Do čisté nádoby odeberte vlastní moč. Vyhodnoťte **barvu, zákal, pěnu a zápach**.

Popis vzorku moči:

Hustotu moči stanovte urometrem ve skleněném válci přiměřené velikosti. Moč nalijte do válce a opatrně do ní ponořte urometr tak, aby se nerozbil o dno válce. Urometr se nesmí dotýkat dna, ani stěn válce. Hustotu odečtěte na stupnici ve výšce hladiny moči.

Hustota moči:

b) Základní chemické vyšetření moči

I. Klasické chemické zkoušky

Během praktik budeme klasickými "zkumavkovými" zkouškami prokazovat bílkovinu, glukózu, aceton, krevní barvivo a žlučová barviva (bilirubin, urobilinogen). Dá se říct, že tyto látky nejsou normální součástí moči, fyziologicky obsahuje moč pouze velmi malé množství, které není běžnými zkouškami prokazatelné. Výsledky by proto měly být u zdravých jedinců negativní.

Abyste viděli pozitivní výsledek zkoušek, je připravený modelový vzorek moči obsahující danou látku (lahvička označená názvem dané látky). Doporučujeme provést danou zkoušku paralelně vždy jednak s modelovým vzorkem a se vzorkem vlastní moči, kde můžeme očekávat, že výsledek bude negativní. Naše "modelové vzorky" mají daleko ke skutečné moči, skutečná moč není bezbarvá :-).

Pro odměřování vzorků a činidel použijte přiložená kapátka, předepsané objemy jsou přibližné. Nezaměňujte kapátka, ať nedojde ke kontaminaci roztoků!

1. Průkaz bílkovin

přítomnost bílkoviny v moči = PROTEINURIE

klasifikace proteinurií: - prerenální
- renální - glomerulární - selektivní
- neselektivní
- tubulární
- postrenální

další související termíny: Bence-Jonesova bílkovina
mikroalbuminurie

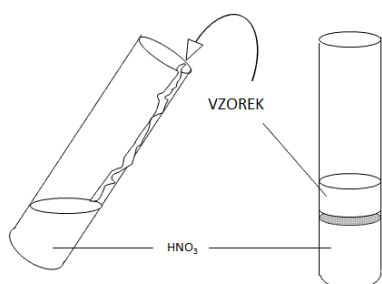
a) Průkaz kyselinou sulfosalicylovou

Do zkumavky přeneste asi 2 ml vzorku. Přidejte 5-10 kapek 20% kyseliny sulfosalicylové. Bílý zákal znamená přítomnost bílkoviny. Tato zkouška je nejcitlivější.

modelový vzorek	vlastní moč

b) Hellerova zkouška

Johann Florian Heller (1813-1871)



Do zkumavky dejte trochu koncentrované kyseliny dusičné (POZOR ŽÍRAVINA).

Zkumavku nakloňte a velmi opatrně navrstvěte vyšetřovaný vzorek (po stěně zkumavky).

V přítomnosti bílkoviny vznikne na rozhraní bílý prstenec sražené bílkoviny.

modelový vzorek	vlastní moč

c) Průkaz bílkoviny varem

Do zkumavky přeneste asi 2 ml vzorku moči. Přidejte asi 0,2 ml acetátového pufru (pH 4,6) a krátce povařte. Bílkovina dává bílý zákal.

modelový vzorek	vlastní moč

2. Průkaz glukózy

a) Fehlingova zkouška

Hermann von Fehling (1812-1885)

Nejprve do zkumavky připravte Fehlingovo činidlo - smícháním stejných dílů Fehlingova roztoku I a II, nejlépe hned tolik, abyste měli dost pro vyšetření modelového vzorku, vzorku vlastní moči a neznámého vzorku k analýze. Připravené činidlo je tmavě modré, čiré.

Vlastní zkouška:

Do zkumavky odlijte asi 1 ml připraveného Fehlingova činidla a přidejte stejný objem vzorku. Obsah zkumavky nad kahanem povařte. Pozitivita zkoušky se projeví vznikem sraženiny.

modelový vzorek	vlastní moč

b) Benediktova zkouška

Stanley Rossiter Benedict (1884-1936)

Do zkumavky přeneste asi 2 ml Benediktova činidla. Přidejte 4-5 kapek vzorku a obsah zkumavky povařte. Pozitivita zkoušky se projeví změnou barvy a vznikem sraženiny.

modelový vzorek	vlastní moč

c) Nylanderova zkouška

Claus Wilhelm Gabriel Nylander (1835-1907)

Do zkumavky přeneste asi 2 ml vzorku. Přidejte asi 1 ml činidla a obsah zkumavky povařte. V pozitivním případě vznikne špinavě žluté, žlutohnědé až černé zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

3. Průkaz ketolátek

a) Lestradetova zkouška

Henri Lestradet (1921-1997)

Na filtrační papír dejte malé množství práškového Lestradetova činidla a pouze je zvlhčete kapkou vzorku. Pozitivní výsledek se projeví postupným vývojem fialového zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

b) Legalova zkouška

Emmo Legal (1859-1922)

V jedné zkumavce si připravte čerstvý roztok nitroprusidu sodného ve vodě (několik zrnek do asi 2 ml vody).

Do další zkumavky dejte asi 5 ml vzorku, přidejte 5 kapek připraveného roztoku nitroprusidu a 5 kapek 10% NaOH. Objeví se červené zbarvení způsobené kreatininem.

Přidejte několik kapek koncentrované kyseliny octové a v přítomnosti ketolátek se zbarvení prohloubí (ztmavne), v negativním případě barva zežloutne.

modelový vzorek	vlastní moč

4. Průkaz krevního barviva

Heitz-Boyerova zkouška

Ve zkumavce smíchejte stejné díly vzorku a Heitz-Boyerova činidla.

Opatrně převrstvěte obsah zkumavky 3% peroxidem vodíku. Pozitivní reakce se projeví červenofialovým zbarvením (fenoltalein) na rozhraní kapalin.

modelový vzorek	vlastní moč

5. Průkaz bilirubinu

a) Naumannova reakce

Hans Norbert Naumann (1901-1985)

Ve zkumavce si protřepete asi 5 ml vzorku s talkem (na špičku nože).

Připravte si malou nálevku, filtrační papír a směs moči s talkem zfiltrujte.

Do středu filtračního papíru (na zachycený talek) kápněte Fouchéovo činidlo (FeCl_3 a kyselina trichloroctová). Pozitivní výsledek se projeví modrou skvrnou (bilicyanin).

modelový vzorek	vlastní moč

6. Průkaz Ehrlich pozitivních látek (urobilinogenů)

Ehrlichova zkouška

Paul Ehrlich (1884-1915)

Do zkumavky přeneste asi 2 ml vzorku. Přidejte několik kapek Ehrlichova aldehydového činidla. Pozitivním výsledkem je různě intenzivní červené zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

Analyza neznámého vzorku

Dostanete imitaci vzorku moči. Budete vzorek testovat na přítomnost:

proteiny (precipitace kyselinou sulfosalicylovou)

glukóza (Fehlingova reakce)

ketony (Lestradetova zkouška)

krev (Heitz-Boyerova zkouška)

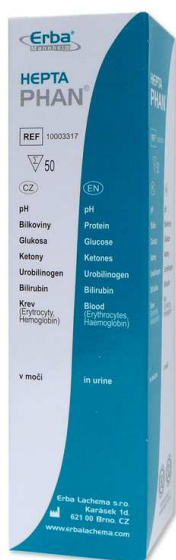
urobilinogen (Ehrlichova zkouška)

Vzorek číslo:

Závěr – co všechno je přítomno ve vzorku?

II. Diagnostické proužky

V dnešní době se základní chemické vyšetření moči provádí pomocí diagnostických proužků. Jsou vyrobeny z plastu, na který jsou nalepené plošky s fixovanými chemickými činidly. Počet detekčních zón je na různý dle výrobce a typu diagnostického proužku. Výhodou je snadnost provedení a rychlost získání výsledku. V České republice jsou nejčastěji používané proužky „PHAN“ (výrobce: Erba Lachema).



HeptaPHAN

pH
bílkoviny
glukóza
ketolátky (ketony)
urobilinogen
bilirubin
krev (erytrocyty a hemoglobin)

Výsledek je možné odečíst vizuálním srovnáním s barevnou stupnicí na krabičce nebo provést objektivní vyhodnocení pomocí analyzátoru. Pro odečítání proužků „PHAN“ je dostupný systém LAURA[®] Smart. Vyhodnocování analýzy moče pomocí LAURA[®] Smart eliminuje subjektivní interpretaci barevné odezvy diagnostických zón.



Pracovní postup:



1 Vyjměte proužek z tuby.



2 Tubu se zbývajících diagnostickými proužky ihned pečlivě uzavřete.



3 Namočte diagnostický proužek do vzorku moči tak, aby všechny diagnostické zóny byly ponořené (namočení 2 - 3 s).



4 Proužek vyjměte a přebytečnou moč odstraňte otřením hrany o okraj nádoby.



5 Zbývající přebytečnou moč odstraňte otřením hrany proužku o papírový ubrousek (neotírejte testovací zóny).



6 Objektivní hodnocení - po namočení a odstranění přebytku moči vložte diagnostický proužek ihned do močového readeru.

Vizuální hodnocení – po uplynutí předepsané reakční doby uvedené v návodu srovnajte výsledné zbarvení s barevnou srovnávací stupnicí na štítku.

*Vyšetřete svoji vlastní moč pomocí diagnostického proužku HeptaPHAN.
(K odečtení výsledku je možné využít systém Laura® Smart.)*

c) Mikroskopické vyšetření močového sedimentu

Teorie je velmi pěkně zpracovaná zde:

<https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js15/mikroskop/web/index.html>

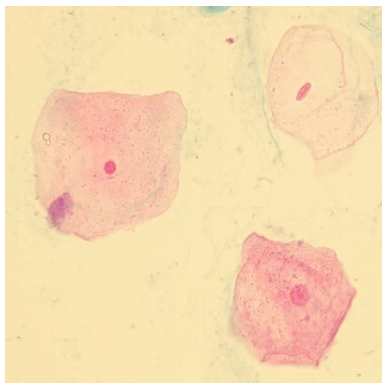
Atlas močového sedimentu:

<http://sekk.cz/atlas/index.htm>

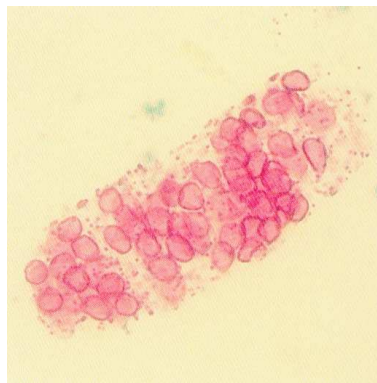
Velmi stručně:

Centrifugací moči se získá sediment ("dense and insoluble deposits"), který se následně hodnotí pod mikroskopem. Elementy, po kterých se pátrá, jde stručně shrnout jako:

buňky (cells)



válce (casts)



krystaly (crystals)



Preparát zhotovíte z vlastní moči, kterou odeberete do čisté nádoby.

Moč dobře promíchejte a napipetujte 5 ml moči do centrifugační zkumavky. Zkumavku předejte laborantce. Následuje centrifugace 5 min při 2000 ot/min.

Bezprostředně po odstředění slijte supernatant tak, aby ve zkumavce zůstalo jen přibližně 0,5 ml supernatantu. K sedimentu přidejte 1 kapku pracovního roztoku ze soupravy na barvení močového sedimentu a důkladně promíchejte pomocí kapátka. Nechte 5 minut barvit.

1 kapku obarveného sedimentu naneste do jamky speciálního sklíčka pro vyšetření močového sedimentu a prohlížejte pod mikroskopem.

Popište nález, vypracujte závěr:

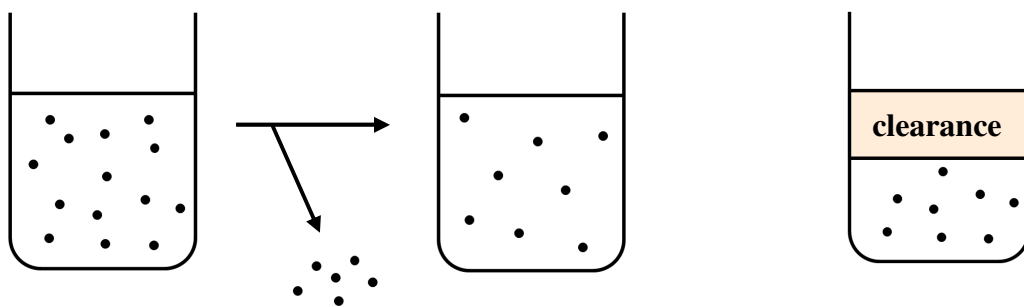
Vyšetřování moči II

d) Stanovení glomerulární filtrace jako clearance kreatininu

Funkční vyšetření ledvin umožňují posoudit, zda je funkce ledvin fyziologická či snižená. K základním metodám patří stanovení glomerulární filtrace (GF). Glomerulární filtrace je jedním ze základních procesů probíhajících v nefronu. Lze ji měřit na podkladě vylučování látky, která volně prochází do glomerulárního filtrátu (tj. ve stejné koncentraci jakou má v krevní plazmě) a v tubulech není ani resorbována ani secernována.

Clearance

Je to taková virtuální, ne úplně snadno pochopitelná veličina. Clearance udává objem krevní plazmy, který byl úplně očištěn od dané látky za jednotku času.



Ve skutečnosti nebude od dané látky **úplně** očištěno pravděpodobně vůbec nic, dojde *jen* ke snížení koncentrace dané látky. Obrázek vpravo ukazuje, jak se na to dívat. Uvažujme, že v části zůstane původní koncentrace a část bude úplně očištěna. Právě tato úplně očištěná část reprezentuje clearance.

Rozumět termínu clearance je nutné hlavně ve farmakologii, "očisťovat" krevní plazmu je možné činnostmi více orgánů:

ledviny - vylučování látky do moči

játra - odstranění látky jejím metabolismem

plíce - vydýchání

kůže - eliminace látky v potu

My se dále budeme zabývat pouze a jenom **renální clearance**. *Renální clearance* udává objem krevní plazmy, který byl úplně očištěn od dané látky za jednotku času *činností ledvin*.

glomerulární filtrace = clearance látky, která volně prochází do glomerulárního filtrátu a v tubulech není ani resorbována ani secernována.

Takovou teoretickou ideální látkou je inulin.

Co to je inulin?

Inulin se normálně v lidském těle nevyskytuje, vyšetření využívající inulin by bylo velmi komplikované. V praxi je možné měřit glomerulární filtraci pomocí clearance endogenního markeru filtrace - kreatininu. I tak je to metoda dosti složitá, hlavním limitujícím faktorem je správný sběr moči.

Provedení

Do čisté nádoby odeberte vlastní moč.

Vzorek moči 100x zřed'te.

Do odměrné baňky (o objemu 100 ml) napipetujte **1 ml moči**.

Destilovanou vodou doplňte odměrnou baňku po rysku (tj. na objem 100 ml).

Odměrnou baňku uzavřete zátkou a obsah **důkladně promíchejte**.

Proč moč ředíme?

Látky, které se v glomerulu volně filtrují a následně nepodléhají ani tubulární resorpci ani tubulární sekreci (o kreatininu předpokládáme, že se právě tak chová), mají v definitivní moči zhruba 100x větší koncentraci než v glomerulárním filtrátu (koncentrace v glomerulárním filtrátu je blízká koncentraci v krevní plazmě).

Při fotometrickém stanovení, kdy paralelně zpracováváme vzorek a standard, je nutné, aby koncentrace vzorku nebyla příliš vzdálená od koncentrace standardu. V praxi se postupuje tak, že se používá standard o koncentraci srovnatelné s očekávanou koncentrací vzorku. Další možností je ředění vzorku tak, abychom se dostali po naředění řádově ke koncentraci standardu. Ze změřené koncentrace naředěného vzorku a známého ředění můžeme snadno spočítat koncentraci původního (neředěného) vzorku, která nás zajímá.

V našem případě jako standard použijeme krevní sérum o známé koncentraci kreatininu (**177 $\mu\text{mol/l}$**), pro zjištění clearance kreatininu musíme změřit jeho koncentraci jednak ve vzorku krevní plazmy (séra) vyšetřovaného pacienta, jednak v průměrném vzorku po dobu 24 hodin sbírané moči. Očekávaná koncentrace kreatininu v séru je řádově srovnatelná s koncentrací standardu, ale pro moč tohle neplatí, očekávaná koncentrace v moči je řádově 100x vyšší, proto musíme před měřením vzorek moči ředit.

Podle následujícího schématu napipetujte:

- vzorek **séra** a **standardu** do **centrifugačních zkumavek**
- vzorek moči a slepý vzorek (porovnávací roztok) do tenkostěnných zkumavek

Krevní sérum a moč jsou úplně jiné biologické matrice, zkumavky 1 (sérum) a 2 (standard) budou zpracovávány odlišným způsobem – je nutné odstranit proteiny, které by rušily stanovení, precipitací kyselinou trichloroctovou.

Objemy jsou uvedeny v ml	centrifugační zkumavky		tenkostěnné zkumavky	
	1	2	3	4
	Sérum	Standard	Zředěná moč	Porovnávací roztok
sérum	0,50	–	–	–
standard	–	0,50	–	–
zředěná moč	–	–	0,50	–
destilovaná voda	1,00	1,00	0,25	0,75
kys. trichloroctová	0,50	0,50	0,25	0,25

Lihovým fixem zkumavky očislujte a centrifugační zkumavky označte tak, abyste si je poznali.

Obsah zkumavek promíchejte a nechte **5 minut stát**.

Centrifugační zkumavky (1 a 2) odevzdejte laborantce k provedení centrifugace (10 min, 3000 ot/min). Tenkostěnné zkumavky (3 a 4) ponechte zatím stát ve stojánku na stole.

Čekání můžete využít k vyzkoušení webových kalkulačků GF.

Po dokončení centrifugace přeneste opatrně do paralelních tenkostěnných zkumavek (1 a 2) po **1,00 ml** supernatantu.

V tomto kroku máte připravené 4 zkumavky, každá obsahuje 1 ml roztoku (zkumavka 1 a 2 supernatant odebraný po centrifugaci, zkumavky 3 a 4 máte už připraveny).

Vlastní stanovení kreatininu (Jaffého reakce)

Ke stanovení kreatininu se používá reakce s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí. Reakce není specifická, podobně reaguje řada dalších látek (tzv. Jaffé-pozitivní chromogeny).

Do všech zkumavek napipetujte roztok kyseliny pikrové a NaOH (viz tabulka):

	1	2	3	4
kys. pikrová	0,50	0,50	0,50	0,50
hydroxid sodný	0,50	0,50	0,50	0,50

Obsah zkumavek promíchejte a nechte **20 minut** stát.

Čekání můžete využít k provedení další úlohy - Aminokyseliny a jejich metabolity v moči.

Změřte absorbanci všech tří vzorků ($A_{\text{sérum}}$ = zkumavka č. 1 – sérum, A_{st} = zkumavka č. 2 – standard, $A_{\text{zř. moč}}$ = zkumavka č. 3 – zředěná moč) proti porovnávacímu roztoku (zkumavka č. 4) při vlnové délce **505 nm**.

Proveďte **výpočet koncentrace kreatininu v séru** (S_{kr}):

$$S_{\text{kr}} = c_{\text{st}} \times \frac{A_{\text{sérum}}}{A_{\text{st}}}$$

pozn. Referenční rozmezí fyziologických hodnot je závislé na věku a pohlaví, zhruba 50 -120 $\mu\text{mol/l}$.

Proveďte **výpočet koncentrace kreatininu ve zředěné moči** ($U_{\text{zř. moč}}$):

$$U_{\text{zř. moč}} = c_{\text{st}} \times \frac{A_{\text{zř. moč}}}{A_{\text{st}}}$$

Proveďte **výpočet koncentrace kreatininu v původní neředěné moči** (U_{kr}):

$$U_{\text{kr}} = 50 \times U_{\text{zř. moč}}$$

pozn. Moč jste před stanovením kreatininu ředili 100x, ale zkumavky 1 a 2 (kde je bylo matricí sérum), byly zpracovávány odlišným způsobem než zkumavka se zředěnou močí, po centrifugaci byla dále zpracovávána jen polovina výchozího množství...).

Proveďte **výpočet odhadu glomerulární filtrace jako clearance kreatininu**:

$$GF \approx C_{\text{kr}} = \frac{U_{\text{kr}}}{S_{\text{kr}}} \times V$$

kde V je diuréza/24 hodin, počítejte s údajem $V = 1,78 \text{ l/den}$

pozn. Referenční rozmezí fyziologických hodnot je závislé na věku a pohlaví, zhruba platí: $C_{\text{kreat}} = 1,3 - 3,3 \text{ ml/s}$

Provedení v praktických cvičeních neodpovídá vyšetření jednoho daného pacienta, i když pracujete s vlastní močí, spočítaná glomerulární filtrace nic neříká o funkci vašich ledvin !!!

Zamyslete se, jak jste postupovali:

U_{kr}	vlastní moč – jednorázový odběr
S_{kr}	fetální bovinní sérum
V	24-hodinový sběr moče nebyl prováděn, diuréza/24 hodin je už pro výpočet dopředu udána

Jak se vyšetření skutečně provádí:

Pokyny k provedení vyšetření (citováno dle: Ústav klinické biochemie a hematologie FN Plzeň)

Clearance endogenního kreatininu (C_{kr})

3 dny před a během testu vynechat maso, výrobky z masa, léky – pokud je to z klinického hlediska možné. Vyhnout se fyzické námaze. V den testu přijímat průměrné množství tekutin; pacient nesmí pít příliš, ale též nesmí žíznit. Nepodávat látky s močopudným účinkem (diuretika, káva, čaj). Dodržovat tělesný klid; vyšetřovaný leží nebo mírně přechází. Provádíme **24-hodinový sběr moče**. Moč není třeba konzervovat, případná konzervace nevádí. Do laboratoře zaslat 5 ml průměrného vzorku moče na stanovení hladiny kreatininu (U_{kr}). Na žádance vyznačit diurézu/24 h s přesností na 10 ml. Současně ráno nalačno, stačí na konci sběrného období, odebrat srážlivou krev na stanovení hladiny sérového kreatininu (S_{kr}). Výpočet se vztahuje na ideální tělesný povrch $1,73 \text{ m}^2$; k výpočtu skutečného tělesného povrchu je třeba udat hmotnost a výšku pacienta.

Největší zdroj chyb představuje sběr moči!

Proto se dnes glomerulární filtrace raději odhaduje z parametrů, jejichž zjištění nevyžaduje sběr moči. Existuje spousta vzorců pro odhadování glomerulární filtrace:

Cockcroft a Gault (1973)

MDRD (2005)

CKD-EPI kreatinin (2009)

CKD-EPI cystatin C (2012)

CKD-EPI kreatinin - cystatin C (2012)

b) Aminokyseliny a jejich metabolity v moči

Aminokyseliny jsou nízkomolekulární látky (rozuměj: mají malou relativní molekulovou hmotnost), v glomerulech jsou tedy volně filtrovány, ale podobně jako glukóza jsou v proximálním tubulu aktivně resorbovány. V moči proto nejsou normálně téměř vůbec přítomny, fyziologické vylučování je minimální. Vylučování aminokyselin do moči se nazývá **aminoacidurie**.

Renální aminoacidurie je důsledkem postižení renálních tubulů, které nejsou schopny z glomerulárního filtrátu resorbovat všechny aminokyseliny ani při jejich normální hladině v krvi. Existují i geneticky podmíněné defekty specifických reabsorpčních systémů.

Při **overflow** aminoacidurii nabídka jedné nebo více aminokyselin převyšuje resorpční kapacitu ledvinných tubulů, tj. ledviny jsou v pořádku, problém je ve zvýšené hladině nějaké aminokyseliny v krvi (stejný princip jako v případě glukózy v moči u diabetika).

Pro stanovení aminokyselin v moči použijte modelový vzorek moči. Obsahuje danou aminokyselinu, proto bude výsledek pozitivní. Jako negativní kontrolu použijte vlastní moč.

1. Průkaz cystinu

nemoc: cystinurie

<https://en.wikipedia.org/wiki/Cystinuria>

Na filtrační papír dejte malé množství práškového činidla (nitroprusid sodný + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Na_2CO_3 + NaCN) a zvlhčete kapkou vyšetřovaného vzorku. V pozitivním případě vznikne ihned červenofialové zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

2. Průkaz fenylpyruvátu

nemoc: fenylketonurie

<https://en.wikipedia.org/wiki/Phenylketonuria>

K několika ml vyšetřovaného vzorku ve zkumavce přidejte 2 kapky 10% HCl a 3 kapky FeCl_3 . V pozitivním případě vznikne tmavozelené zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

3. Průkaz tyrosinu

nemoc: tyrosinémie (je jich více typů)

<https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosinemia>

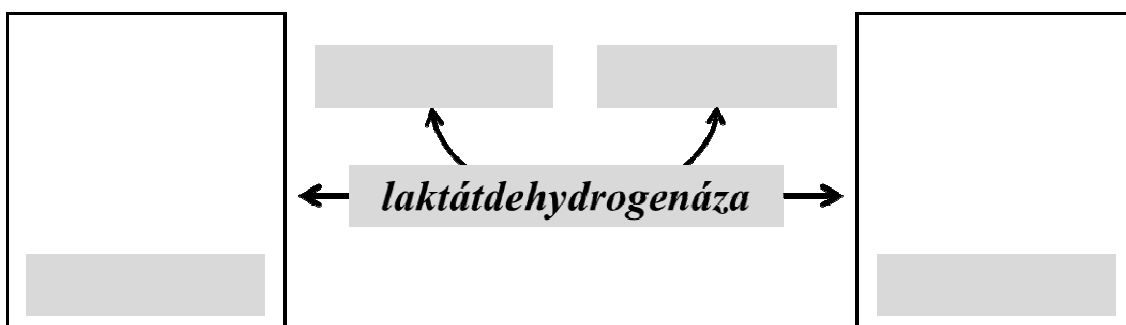
Ve zkumavce smíchejte stejný díl vyšetřovaného vzorku (max. 0,5 ml) a Millonova činidla ($\text{Hg} + \text{HNO}_3$). V pozitivním případě se do 10 minut vyvine červené zbarvení.

modelový vzorek	vlastní moč

Klinická enzymologie

a) Stanovení laktátdehydrogenázy v séru

Laktátdehydrogenáza katalyzuje přeměnu *pyruvátu* na *laktát* za současné oxidace NADH na NAD⁺. Redukovaná forma koenzymu (NADH) má charakteristickou absorpci při 340 nm. Oxidovaná forma (NAD⁺) v této oblasti neabsorbuje. Využívání rozdílu v absorpčních spektrech těchto dvou forem koenzymu se říká Warburgův optický test.



My využijeme rychlost změny absorbance NADH při 340 nm ke kinetickému stanovení aktivity laktátdehydrogenázy.

Provedení

Zapněte fotometr (vyhříváný na 37°C). Dle přiloženého návodu nastavte vlnovou délku **340nm**.

Do fotometru vložte skleněnou kyvetu určenou pro měření **LDH**.

Pomocí pipety 1000 μ l napipetujte do kyvety slepý vzorek (destilovaná voda) a proveďte měření slepého vzorku $A = 0,000$.

Skleněnou kyvetu vyprázdněte a vložte zpět do fotometru.

Stanovení aktivity standardu

Do „eppendorfky“ napipetujte **20 μ l standardu** a **1000 μ l pracovního roztoku**, spusťte stopky, promíchejte roztok 2 \times nasátím do pipety na 1000 μ l a neprodleně vpravte do kyvety. Na konci **2., 3., 4. a 5. minuty** stiskněte tlačítko pro měření absorbance a na displeji fotometru odečtěte absorbanci. Po změření standardu obsah odstraňte a kyvetu několikrát propláchněte destilovanou vodou.

Stanovení aktivity vzorku

Stejný postup opakujte s reakční směsí **20 μ l vzorku** a **1000 μ l pracovního roztoku**.

	standard	vzorek
A ₂		
A ₃		
A ₄		
A ₅		

Získané hodnoty zadejte do připraveného souboru v počítači (*LD.xls*).

laktátdehydrogenáza

 $\mu\text{kat/l}$

Závěr:

b) Stanovení alkalické fosfatázy v séru

Alkalická fosfatáza (ALP) je enzym katalyzující hydrolýzu esterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí (pH optimum 9,5–10,5). Alkalická fosfatáza je lokalizována v cytoplazmatických membránách buněk epitelu žlučových cest, v játrech, kostech, střevech, placentě.

Provedení

Do 2 připravených zkumavek napipetujte roztoky dle tabulky:

Sérum najdete v malé plastové zkumavce („eppendorfce“).

Při pipetování malého objemu séra je třeba pracovat velice pečlivě, dbát na to, aby se sérum dostalo na dno zkumavky - sérum nesmí ulpět na stěně zkumavky!

	Zkumavka č. 1 <i>vzorek</i>	Zkumavka č. 2 <i>porovnávací roztok</i>
pufr	1,00 ml	1,00 ml
sérum	20 μl	-

Obsah zkumavek promíchejte a preinkubujte **5 minut při 37°C** ve vodní lázni.

Přidejte do obou zkumavek substrát:

substrát	0,20 ml	0,20 ml
----------	---------	---------

Inkubujte přesně **10 minut při 37°C**, pak enzymovou reakci zastavte přidáním inhibitoru:

inhibitor	0,50 ml	0,50 ml
-----------	---------	---------

Do zkumavky obsahující kontrolní roztok přidejte 20 μl séra:

sérum	-	20 μl
-------	---	------------------------------------

Tím dosáhnete toho, že obě zkumavky obsahují „to samé“. Ale do zkumavky obsahující porovnávací roztok bylo sérum přidáno až po přidání inhibitoru. Enzym obsažený ve vyšetřovaném séru tedy zpracovával substrát pouze ve zkumavce č. 1, čím více enzymu je ve vyšetřovaném séru přítomno, tím více substrátu se ve zkumavce č. 1 přeměnilo na barevný produkt.

Obsah zkumavek promíchejte. Na spektrofotometru při nastavené vlnové délce **420 nm** změřte absorbanci (A) vzorku (zkumavka č. 1) proti porovnávacímu roztoku (zkumavka č. 2).

A	
---	--

Vypočtete katalytickou koncentraci ALP ve vyšetřovaném séru dle vztahu:

$$\text{ALP } (\mu\text{kat/l}) = 10,236 \times A$$

ALP	$\mu\text{kat/l}$
-----	-------------------

Závěr:

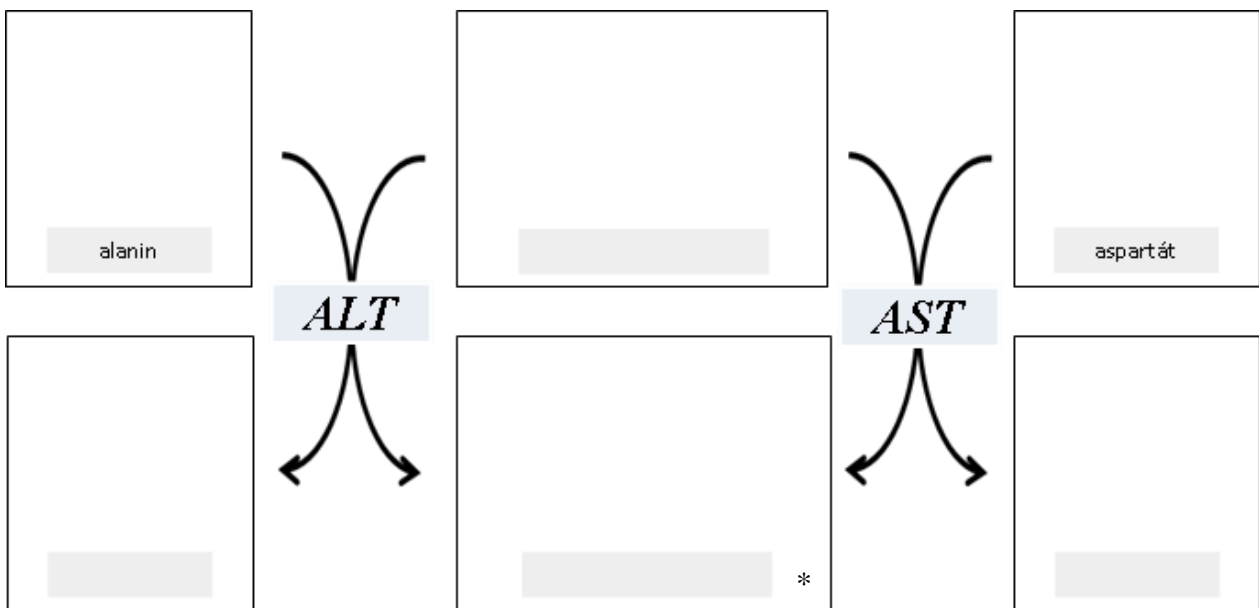
c) Sledování aktivity aminotransferáz ALT a AST v jaterním extraktu

ALT a AST jsou enzymy katalyzující transaminační reakce, patří k nejvíce stanovovaným enzymům v klinické praxi. V našem experimentu nebudeme měřit jejich katalytickou koncentraci v krevním séru, budeme pouze prokazovat jejich přítomnost v jaterní tkáni (hepatocytech).

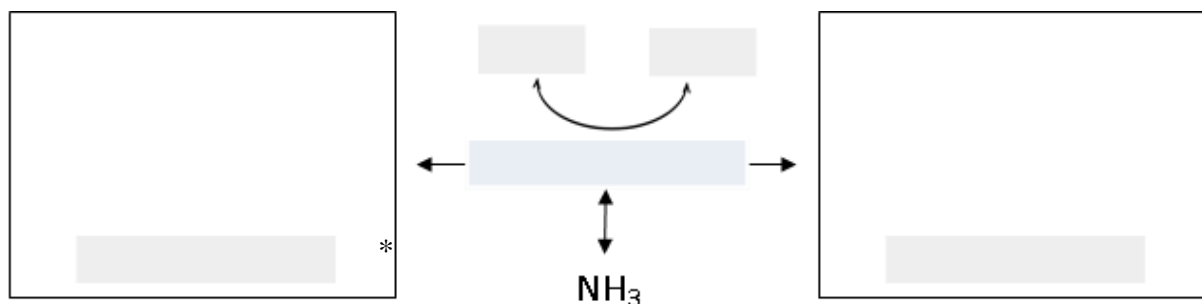
ALT =

AST =

Zapište ve vzorcích rovnice reakcí:



Tímto mechanismem (nepřímou deaminací = transaminací) se při degradaci zbavuje dusíku většina aminokyselin. Pouze jedna jediná aminokyselina se zbavuje dusíku přímo ve formě amoniaku (přímá deaminace = oxidační deaminace). Je to právě ta, která vzniká "odkládáním dusíku" při transaminacích (označená * ve schématech).



ALT je obsažena nejvíce v **játrech**, je lokalizována pouze v cytoplazmě. Stanovení ALT v krevním séru je citlivým a relativně specifickým testem pro poškození jater. Aktivita v séru se zvyšuje již při malém poškození hepatocytů, satčí jen narušení permeability jejich buněčné membrány.

AST se vyskytuje v řadě orgánů – v **játrech, myokardu, kosterním svalstvu**, ale i v erythrocytech. AST je přítomna v mitochondriích (70 %) i v cytoplazmě (30 %). Mitochondriální frakce se dostává do krve až při nekróze (rozpadu) buňky. Výrazné zvýšení aktivity AST v séru je proto známkou těžšího poškození. AST není specifická pouze pro jaterní tkáň, její zvýšení může být způsobeno i poškozením kosterního svalstva nebo myokardu.

Metoda stanovení je založena na rozdílné světelné absorpci 2,4-dinitrofenylhydrazonů kys. 2-oxo-glutarové a pyrohroznové, která vzniká u reakce ALT přímo, u reakce AST po spontánní dekarboxylaci oxalacetátu. Při vyšetření séra se určí aktivita z kalibrační křivky, sestavené podle absorpcí různě koncentrovaných hydrazonů pyrohroznové kyseliny.

Provedení

Do 4 připravených zkumavek napipetujte roztoky dle tabulky:

	1	2	3	4
	ALT		AST	
	<i>pokusná</i>	<i>porovnávací</i>	<i>pokusná</i>	<i>porovnávací</i>
substrát ALT	0,50 ml	0,50 ml	-	-
substrát AST	-	-	0,50 ml	0,50 ml

Zkumavky preinkubujte asi **10 minut při 37°C** ve vodní lázni.

Příprava jaterního extraktu (enzymového preparátu)

Asi 1 cm³ jaterní tkáň (připraveno na pracovním stole) rozdrťte v třecí misce, přidejte **5 ml fosforečnanového pufru** a ještě chvíli pokračujte v homogenizaci. Celý obsah třecí misky („homogenát“) přeneste do centrifugační zkumavky a zkumavku odeberte laborantce. Supernatant použijete jako enzymový preparát.

Do vlastních „pokusných“ zkumavek přidejte získaný enzymový preparát (jaterní extrakt):

jaterní extrakt	0,10 ml	-	0,10 ml	-
-----------------	---------	---	---------	---

Všechny 4 zkumavky inkubujte **30 minut při 37°C**, pak přidejte do všech zkumavek roztok dinitrofenylhydrazinu:

dinitrofenylhydrazin	0,50 ml	0,50 ml	0,50 ml	0,50 ml
----------------------	---------	---------	---------	---------

Obsah zkumavek promíchejte a nechte **stát 15 minut**.

Do všech zkumavek napipetujte roztok NaOH:

NaOH	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml
------	---------	---------	---------	---------

Jaterní extrakt přidejte i do porovnávacích zkumavek:

jaterní extrakt	-	0,10 ml	-	0,10 ml
-----------------	---	---------	---	---------

Obsah zkumavek promíchejte. Na spektrofotometru při nastavené vlnové délce **506 nm** změřte absorbanci zkumavky č. 1 proti zkumavce č. 2 (odpovídá aktivitě ALT) a absorbanci zkumavky č. 3 proti zkumavce č. 4 (odpovídá aktivitě AST).

A_{ALT}	
A_{AST}	

Vyhodnocení, závěr:

d) Stanovení α – amylázy v moči (EPS)

Pro stanovení enzymové aktivity α -amylázy se používá syntetický substrát 4-nitrofenyl-maltoheptaosid-etyliden. α -amyláza jej štěpí na menší oligosacharidy, které jsou hydrolyzovány α -glukosidázou za uvolnění 4-nitrofenolu. Katalytická koncentrace je určena stupněm vzniku 4-nitrofenolu a měří se při 405 nm.

Provedení

Fotometr ECOM E 6125 zapněte hlavním vypínačem na zadní straně a zapněte i tiskárnu. Pomocí tlačítka **ABSORBANCE** zvolte šipkami vlnovou délku **405nm** a potvrďte tlačítkem **ENTER**.

Několikrát propláchněte kyvetu fotometru destilovanou vodou.

Proveďte měření slepého vzorku (destilovaná voda) **BLANK** a potvrďte tlačítkem **ENTER**. Kyvetu opět propláchněte destilovanou vodou.

Příprava vzorku

Do zkumavky Eppendorf automatickou pipetou pipetujte:

20 μ l vzorku moči a 1000 μ l pracovního roztoku, promíchejte a vpravte do kyvety, na stopkách spusťte čas. Ve **2., 3., 4., 5. minutě** stlačte tlačítko **ENTER** (tisk – absorbance **A**), respektive odečtěte absorbanci na displeji fotometru.

A ₂	
A ₃	
A ₄	
A ₅	

Po měření vzorku moči jej odstraňte z kyvety a několikrát kyvetu propláchněte destilovanou vodou.

Zkontrolujte vtištění výsledků, vypněte fotometr.

Výpočet

Ze získaných hodnot absorbancí vypočítejte průměr $\Delta A/\text{min}$ a dosazením do vzorce stanovte aktivitu **α -amylázy** ve vzorku moči (měření při reakční teplotě 37°C).

$$\Delta A_1 = A_3 - A_2$$

$$\Delta A_2 = A_4 - A_3$$

$$\Delta A_3 = A_5 - A_4$$

$$\text{průměr } \Delta A / \text{min} = \frac{\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3}{3}$$

$$\mu\text{kat/l} = \Delta A / \text{min} \times 105,9 \text{ (koeficient přepočtu)}$$

AMS	$\mu\text{kat/l}$
-----	-------------------

Závěr:

Vybrané klinicko-biochemické hodnoty

Obecným výsledkem laboratorního vyšetření je naměřená hodnota, která může být fyziologická, zvýšená či snižená. Abychom zjištěnou hodnotu mohli takto zařadit, je třeba ji porovnat s fyziologickým (referenčním) rozmezím hodnot. Referenční rozmezí získáme měřením referenční (zdravé) populace. Získané hodnoty seřadíme vzestupně a určitý podíl (nejčastěji 2,5 %) krajních nejnižších a nejvyšších hodnot vyřadíme. Nejnižší a nejvyšší hodnotu, která v této řadě zůstane, označujeme jako dolní respektive horní referenční mez. 95 % zdravých lidí v tomto případě spadá do referenčního rozmezí. Existuje tedy ale také 5 % zdravých lidí, jejichž hodnoty nebudou spadat do referenčního rozmezí fyziologických hodnot. Nicméně výrazné odchylky bývají téměř vždy spojené s patologickým stavem. U některých látek jsou patologické stavy spojené s jakýmkoli výraznějším vybočením z fyziologického rozmezí (glukóza). Jiné látky představují riziko pouze tehdy, pokud jejich hladina přesáhne určitou mez nebo pod ni naopak poklesne – u takové látky stačí znát pouze horní respektive spodní referenční hodnotu (cholesterol).

Referenční populace, laboratorní činidla či metodiky měření, se mohou mezi jednotlivými laboratořemi do určité míry lišit. Z tohoto důvodu jsou různými laboratořemi používány poněkud odlišné referenční hodnoty. Následující seznam má za úkol seznámit studenty s nejdůležitějšími referenčními hodnotami, tak jak je v současnosti používá FN Plzeň. Některá referenční rozmezí přihlížejí i například k věku pacienta či k jeho pohlaví. V takových případech jsme se snažili pro potřeby výuky rozmezí zjednodušit, aby poskytovalo alespoň obecnou představu o průměrných hodnotách u zdravých dospělých jedinců.

Stejně metabolity se mohou v různých tělních tekutinách vyskytovat v odlišné koncentraci. Proto je zvykem u metabolitu označit zkratkou i vyšetřovaný materiál. Pro koncentrace některých látek v konkrétní tělní tekutině je zvykem používat speciální název. Například glykémie se týká glukózy v krvi, glykorrhachie v mozkomíšním moku a glykosurie glukózy v moči. Při snížení hladiny glukózy v krvi pod fyziologickou mez pak mluvíme o hypoglykémii, při jejím vzestupu o hyperglykémii.

Např.:

B_{glukóza}: (B= blood) - glukóza v plné krvi

S_{glukóza}: (S= serum) - glukóza v séru

P_{glukóza}: (P= plasma) - glukóza v plazmě

Csf_{glukóza}: (Csf= cerebrospinal fluid) - glukóza v mozkomíšním moku

U_{glukóza}: (U= urine) - glukóza v moči

Referenční hodnoty k zapamatování	
Parametr	Fyziologické rozmezí
ABR (arteriální krev)	
pH	7,36 - 7,44
pCO ₂	4,8 - 5,8 kPa
pO ₂	nad 9,6 kPa
HCO ₃ ⁻	22 - 26 mmol/l
Base Excess (BE)	± 2,5 mmol/l
Anion Gap (AG)	14 - 18 mmol/l
Krev	
Osmolalita	275 - 295 mmol/kg H ₂ O
Na ⁺	136 - 144 mmol/l
K ⁺	3,8 - 5,2 mmol/l
Vápník celkový	2,2 - 2,6 mmol/l
Vápník ionizovaný	1,1 - 1,3 mmol/l
Hořčík	0,7 - 0,9 mmol/l
Chloridy	98 - 109 mmol/l
Fosfor anorganický	0,7 - 1,6 mmol/l
Železo	6 - 35 μmol/l
Laktát	do 2,2 mmol/l
S/P_glukóza	3,6 - 5,6 mmol/l
Glykovaný hemoglobin (HbA1c)	20 - 42 mmol/mol
oGTT interpretace	
Normální glukózová tolerance, vyloučení DM	do 7,8 mmol/l
Porušená glukózová tolerance	7,8 - 11,0 mmol/l
Diabetes mellitus	nad 11,1 mmol/l

Bilirubin celkový	do 25 µmol/l
Bilirubin konjugovaný	do 8 µmol/l
Cholesterol celkový	do 5 mmol/l
Triacylglyceroly	do 1,7 mmol/l
LDL cholesterol	do 3 mmol/l
HDL cholesterol	♂ nad 1 mmol/l ♀ nad 1,2 mmol/l
Močovina	3 - 8 mmol/l
Kyselina močová	♂ 210 - 450 µmol/l ♀ 140 - 360 µmol/l
Kreatinin	♂ 60 - 100 µmol/l ♀ 50 - 90 µmol/l
B_Amoniak	do 50 µmol/l
Alfa-amyláza (AMS)	do 2,0 µkat/l
Aspartátaminotransferáza (AST)	do 0,8 µkat/l
Alaninaminotransferáza (ALT)	do 0,8 µkat/l
Alkalická fosfatáza (ALP)	0,7 - 2,2 µkat/l
Laktátdehydrogenáza (LD)	do 4,0 µkat/l
Gama-glutamyltransferáza (GGT)	♂ do 1,2 µkat/l ♀ do 0,7 µkat/l
C-reaktivní protein (CRP)	do 5 mg/l
Celková bílkovina séra	63 - 80 g/l
Albumin	37 - 52 g/l
Elfo frakce bílkovin séra	
Albumin	0,530 (53%) - 0,650 (65%)
Alfa ₁ globulin	0,020 (2%) - 0,040 (4%)
Alfa ₂ globulin	0,080 (8%) - 0,130 (13%)
Beta globulin	0,090 (9%) - 0,160 (16%)
Gama globulin	0,115 (11,5%) - 0,19 (19%)

Mozkomíšní mok	
Bílkoviny	do 0,5 g/l
Glukóza	2,7 - 4,5 mmol/l
Laktát	1,2 - 2,2 mmol/l
Moč	
Specifická hmotnost	1010 - 1030 g/dm ³
pH	4,5 - 8
Alfa-amyláza (AMS)	do 8,0 μ kat/l
Clearance kreatininu	1,6 - 2,7 ml/s