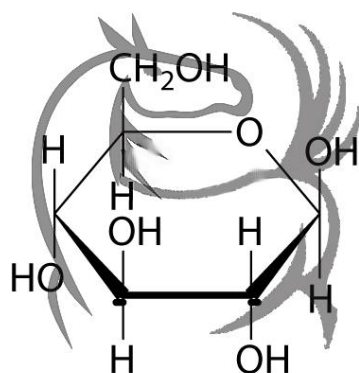


VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie

**Výuková opora pro studenty ke studiu předmětu
Biochemie I a II**



**Lenka Večerková
Martin Hostovský**

BRNO 2016

*Tato výuková opora byla financována
Interní vzdělávací agenturou VFU Brno - IVA
2016FVHE/2390/67*

OBSAH

OBSAH	1
I. SEMESTR	3
1. ÚVODNÍ CVIČENÍ	4
1.1 ŠKOLENÍ BEZPEČNOSTI A OCHRANY ZDRAVÍ	4
1.2 REFERENČNÍ HODNOTY BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ VYBRANÝCH DRUHŮ ZVÍŘAT ...	7
1.3 POUŽITÍ SPEKTROFOTOMETRU WPA S800 SPECTRAWAVE.....	8
2. MINERÁLNÍ LÁTKY I.	10
2.1 STANOVENÍ KONCENTRACE HOŘČÍKU V KREVNÍM SÉRU	10
2.2 STANOVENÍ KONCENTRACE ANORGANICKÉHO FOSFORU V KREVNÍM SÉRU	15
3. MINERÁLNÍ LÁTKY II.	21
3.1 STANOVENÍ KONCENTRACE SÉROVÉHO ŽELEZA V KREVNÍM SÉRU	21
3.2 STANOVENÍ VÁPENATÝCH IONTŮ VE VZORKU KREVNÍHO SÉRA.....	25
4. VITAMINY	28
4.1 JODOMETRICKÉ STANOVENÍ VITAMINU C V MOČI	28
4.2 SEPARACE SMĚSI VITAMINŮ SKUPINY B GELOVOU CHROMATOGRafiÍ	32
5. AMINOKYSELINY	38
5.1 CHROMATOGRafICKÉ DĚLENÍ SMĚSI AMINOKYSELIN NA TENKÉ VRSTVĚ ALUFOLU.....	38
6. SEMINÁRNÍ CVIČENÍ	43
6.1 BIOLOGICKÉ MATERIÁLY	43
6.2 LYONORM – KONTROLNÍ SÉRUM	44
7. GLYCIDY	45
7.1 ENZYMovÉ STANOVENÍ GLUKOSY V KREVNÍM SÉRU	45
7.2 SESTROJENÍ GLYKEMICKÉ KŘIVKY MODELOVÝCH VZORKŮ KREVNÍHO SÉRA	48
8. LIPIDY, STEROLY	51
8.1 KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CELKOVÉHO CHOLESTEROLU V KREVNÍM SÉRU.	51
8.2 KVALITATIVNÍ PRŮKAZ LIPOPEROXIDACE V OLEJÍCH	54
9. ENZYMY I.	56
9.1 SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA ENZYMŮ	61
9.2 STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE ALP V KREVNÍM SÉRU	64
10. ENZYMY II.....	67
10.1 STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE ALT V KREVNÍM SÉRU	67
10.2 STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE GGT V KREVNÍM SÉRU	69
11. CVIČENÍ PROJEKTU OPVK	71
11.1 SPRÁVNÁ LABORATORNÍ PRAXE OPVK KA 2110/1-10	71
11.2 STANOVENÍ BÍLKOVIN BIURETOVOU REAKCÍ V KREVNÍM SÉRU A LYONORMU	75
II. SEMESTR	80
2. PROTEINY I.	81
2.1 STANOVENÍ SÉROVÉHO ALBUMINU METODOU BCP.....	81
3. PROTEINY II.....	84

3.1	VYSOLOVÁNÍ A DIALÝZA BÍLKOVIN KREVNIHO SÉRA.....	84
4	PROTEINY III.....	87
4.1	IZOLACE PROTEINŮ MLÉKA A DŮKAZ JEHO JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK	87
5	NEBÍLKOVINNÉ DUSÍKATÉ LÁTKY I.....	90
5.1	STANOVENÍ KONCENTRACE MOČOVINY V KREVNIÉM SÉRU A LYONORMU	90
6	DIAGNOSTICKY VÝZNAMNÉ PROTEINY	92
7	NEBÍLKOVINNÉ DUSÍKATÉ LÁTKY II.....	98
7.1	STANOVENÍ KONCENTRACE KYSELINY MOČOVÉ VE VLASTNÍ MOČI	98
7.2	MUREXIDOVÁ ZKOUŠKA	101
8	TETRAPYROLY.....	102
8.1	CHEMICKÝ PRŮKAZ KRVE TVORBOU TEICHMANOVÝCH KRYSTALŮ	102
8.2	STANOVENÍ CELKOVÉHO BILIRUBINU V KREVNIÉM SÉRU.....	103
9	MED	105
9.1	STANOVENÍ KYSELOSTI MEDU, KA 2110/1-6	105
10	NUKLEOPROTEINY	107
10.1	IZOLACE NUKLEOPROTEINŮ Z KVASNIC A PRŮKAZ JEJICH SLOŽEK	107
10.2	DŮKAZ GLUTATHIONU.....	109
11	INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA V BIOCHEMII	111
12	MOČOVÁ ANALÝZA	119
12.1	KVALITATIVNÍ ANALÝZA MOČE, HODNOCENÍ MOČOVÉHO SEDIMENTU, MOČOVÁ ANALÝZA SYSTÉMEM POCKET CHEM PU 4010, KA 2110/1-9	119
13	POUŽITÉ ZDROJE	128
	<i>PODĚKOVÁNÍ</i>	129

**Výuková opora pro studenty ke studiu předmětu
Biochemie I a II**

I. SEMESTR

1. ÚVODNÍ CVIČENÍ

1.1 ŠKOLENÍ BEZPEČNOSTI A OCHRANY ZDRAVÍ

Školení bezpečnosti a ochrany zdraví při práci, organizace práce v praktických cvičeních, zásady správné laboratorní praxe, požadavky na studijní přípravu v rámci jednotlivých cvičení:

- 1) Každý student je seznámen v úvodním cvičení semestru s laboratorním řádem, s bezpečnostními předpisy, s protipožární ochranou a zásadami poskytování první pomoci. Tuto skutečnost potvrzuje podpisem na úřední listinu se všemi náležitostmi, která se archivuje.
- 2) Při práci v laboratoři musí mít každý student bílý ochranný plášť, popř. laboratorní obuv či přezůvky jsou rovněž vhodné.
- 3) Ve všech prostorách ústavu platí pro studenty přísný zákaz kouření. Z hygienických důvodů není dovoleno v laboratoři jíst, pít a používat laboratorní sklo k pití nebo přechovávání potravin.
- 4) Studenti jsou povinni prostudovat předem úkoly, které budou ve cvičení provádět. Na praktická cvičení musí být studenti teoreticky připraveni. V úvodním cvičení jsou studenti seznámeni s požadovanou teoretickou přípravou pro každé laboratorní cvičení, jakož i s podmínkami pro udělení zápočtů a pro úspěšné zvládnutí zkoušky.
- 5) Při laboratorní práci studenti postupují přesně podle návodů pro laboratorní cvičení. Provádějí jen úkoly stanovené sylabem cvičení nebo práce asistentem schválené.
- 6) Studenti pracují ve skupinách na označeném pracovním místě.
- 7) Při užívání laboratorních přístrojů jsou studenti seznámeni s jejich obsluhou.
- 8) Vyžaduje-li to charakter práce, musí studenti používat ochranné pomůcky (pracovní rukavice jednorázové, ochranné brýle).
- 9) Čištění a proplachování laboratorního skla provádějí studenti v průběhu cvičení sami. Pevné odpady studenti třídí do označených nádob (pro rozbité sklo, pro papír apod.).
- 10) V průběhu laboratorní práce si naměřené hodnoty zaznamenává každý student do protokolu.
- 11) Praktikum končí předložením zpracovaného protokolu vyučujícímu a jeho podepsáním, současně student uklidí i pracovní místo.

Bezpečnost práce a ochrana zdraví při práci v laboratoři

Pro bezpečnou práci s chemikáliemi je nutno v laboratoři dodržovat tyto zásady:

- 1) Manipulace s hořlavinami a látkami dráždivými, jakož i se silnými koncentrovanými kyselinami a zásadami je nutno provádět v digestoři se zapnutým odtahem.
- 2) Žíraviny se odměřují automatickou či skleněnou pipetou nebodávkačem.
- 3) Při provádění reakcí držíme ústí zkumavek a jiných skleněných nádob (baňky) odvrácená od sebe i od nejbližších spolupracovníků, zvláště při zahřívání.
- 4) Zapálené hořáky kahanů pečlivě sledujeme a nenecháváme je hořet bez dozoru (zvláště při destilacích).
- 5) Dodržujeme přesně pracovní návody. Svévolně neměníme pracovní postupy a koncentrace používaných roztoků. Po spalování ponecháme nádoby, baňky, zkumavky před další manipulací s nimi důkladně zchladnout.
- 6) Na pracovišti udržujeme pořádek a čistotu. Dbáme, abychom pracovní plochu nepotřísnili chemikáliemi.
- 7) Při práci s biologickým materiálem (krev, sérum, plazma, moč) je nutno dodržovat všechny předpisy jako při práci s infekčním materiálem, k jejich odměřování používáme automatické pipety, dávkovače.
- 8) Před každým odchodem z laboratoře si umyjeme ruce.
- 9) Každý (sebemenší) úraz, vzniklé závady v provozu laboratoře musí být ihned ohlášeny vyučujícímu asistentovi.

VZOR POTVRZENÍ O ŠKOLENÍ BEZPEČNOSTI A OCHRANY ZDRAVÍ

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie

Praktická cvičení z předmětu

..... studijní program

..... ročník, skupina:

PROHLÁŠENÍ

Potvrzuji svým podpisem, že jsem byl/a dnešního dne poučen/a o nejdůležitějších zásadách bezpečné práce v laboratoři, jakož i o všeobecných povinnostech studenta VFU Brno na úseku požární bezpečnosti (seznámení s požárním řádem, s umístěním a používáním přenosných hasicích přístrojů a hydrantů. Byl/a/ jsem instruován/a/ o umístění hlavních uzávěru vody, plynu a elektřiny na svém pracovišti a o způsobu jejich ovládní.).

Zavazuji se, že:

1. Do cvičebny budu vstupovat v laboratorním plášti a s sebou si budu brát pouze věci nezbytné pro práci v laboratoři, jako psací potřeby, skripta, sešit. Oblečení a věci, které nejsou potřebné pro práci v laboratoři, zůstanou po dobu cvičení uschované v uzamykatelné skříni.
2. Do cvičení budu přicházet včas a připraven/a.
3. Mimo cvičení či bez souhlasu vedoucího cvičení nebudu manipulovat s chemickými látkami, laboratorními přístroji či dalším vybavením laboratoře.
4. Ve cvičeních si budu počínat vždy tak, abych neohrožoval/a zdraví a život svůj, svých spolužáků či zaměstnanců univerzity.
5. Zásadně budu používat ochranné oděvy a pomůcky ve všech případech, kde je předepsáno a vyžaduje to bezpečný způsob práce.
6. Práci budu vykonávat vždy pouze podle předložených pracovních postupů a podle pokynů vedoucího cvičení, za dodržení všech bezpečnostních a hygienických postupů a pravidel.
7. Nebudu samovolně či z nepozornosti měnit předepsaný postup práce ani provádět úkony, které nesouvisí s plněním zadané úlohy.
8. Zjistím-li před zahájením nebo kdykoliv v průběhu praktických cvičení závady, které mohou ohrozit bezpečnost studentů a pracovníků nebo požární bezpečnost, oznámím je neprodleně vedoucímu cvičení.
9. Při práci budu důsledně dodržovat pořádek na svém pracovním stole či přiděleném úseku pracoviště. Všechny nádoby s chemikáliemi či biologickým materiálem budu po použití okamžitě zavírat.
10. Po každé manipulaci s biologickým materiálem či nebezpečnou látkou a před odchodem ze cvičebny si pečlivě umyji ruce mýdlem.
11. K bezpečné likvidaci hořlavin, žiravin, toxických látek, olejů a pevných odpadů budu využívat pouze k tomu určené nádoby, nebudu je vylévat do kanalizace.
12. Po ukončení práce uvedu pracovní místo do původního stavu a předám je vedoucímu cvičení.
13. Ve svém vlastním zájmu okamžitě oznámím vedoucímu cvičení každé, i sebemenší poranění, poleptání nebo požití látky, které jsem utrpěl během výuky. Okamžitě vedoucímu cvičení nahlásím i bolesti hlavy, závrať, nevolnost apod.
14. Budu dodržovat zákaz kouření, konzumace potravin a pití nápojů ve všech prostorách oddělení biochemie.



Dále potvrzuji, že jsem byla seznámena s tím, že práce v této laboratoři je z důvodu nepříznivého působení používaných chemikálií na vývoj plodu zakázána ženám těhotným. V případě gravidity jsem povinna tyto informace neprodleně oznámit vedoucímu cvičení, který stanoví náhradní způsob absolvování předmětu, protože na praktická cvičení již dále nesmím docházet.

1.2 REFERENČNÍ HODNOTY BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ VYBRANÝCH DRUHŮ ZVÍŘAT

PARAMETRY:	JEDNOTKY	PRASE	PES	KOČKA	SKOT	KŮŇ
Celk. bílkovina (TP)	g/l	65-85	54-71	54-94	60-80	52-79
Albumin (Alb)	g/l	35-45	23-44	21-56	30-42	25-45
Glukóza (Glu)	mmol/l	4-8,3	3,1-6,7	3,1-8,3	3,0-3,9	4,2-6,4
Kreatinin (Creat)	μmol/l	88-239	35-110	50-170	88-177	106-168
Močovina (UR)	mmol/l	3,0-6,0	3,3-8,3	5,0-11,3	3,0-5,0	3,6-8,6
Celkový bilirubin (TB)	μmol/l	0-5,0 (až 17,1)	0-8,55	0-8,55	0,2-5,1	7,0-35
Triacylglyceroly (TG)	mmol/l	0-0,5	0,3-3,9	0,5-2,6	0,17-0,51	0,1-0,6
Cholesterol (Chol)	mmol/l	2,0-3,3	3,5-7,0	2,0-3,4	2,6-5,2	1,9-3,9
Ketolátky (Ket)	mmol/l	-	-	-	0,1-1,0	-
<i>Enzymy:</i>						
Alkalická fosfatáza (ALP)	μkat/l	0,3-0,5	0,1-4,0	0,1-4,0	0-1,37	2,4-6,6
Alaninaminotransferáza (ALT)	μkat/l	0,1-0,4	0,1-1,0	0,1-1,0	0,15-0,95	-
Aspartátaminotransferáza (AST)	μkat/l	0,5-1,0	0,1-1,0	0,1-1,0	0,7-1,40	3,7-6,0
γ-glutamyl transferáza (GGT, GMT)	μkat/l	0,3-0,5	0-0,16	0-0,16	0,1-0,55	0-0,2
Sorbit-dehydrogenáza (SDH)	μkat/l	0,02-0,09	0,05-0,14	0,07-0,13	0,07-0,26	0,03-0,10
Laktátdehydrogenáza (LD, LDH)	μkat/l	do 10	0,8 – 1,5	0,5 – 2,5	16,3-29,0	3,7-9,6
Kreatinkináza (CK)	μkat/l	0-33	0,1-4,0	0,1-4,0	1,3-3,0	0,1-0,5
<i>Minerální profil:</i>						
Vápník (Ca)	mmol/l	2,4-3,0	2,3-3,0	1,5-2,6	2,2-3,0	2,8-3,4
Fosfor (P)	mmol/l	1,8-3,3	0,8-2,1	1,5-2,6	1,6-2,3	1,0-1,8
Sodík (Na)	mmol/l	133-150	140-155	150-160	136-150	132-146
Draslík (K)	mmol/l	4,5-6,5	4,4-5,5	3,5-5,0	4,0-5,8	2,4-4,7
Chloridy (Cl)	mmol/l	94-106	105-115	117-123	90-111	99-109
Hořčík (Mg)	mmol/l	0,9-1,2	0,7-1,0	0,6-1,3	0,8-1,1	0,9-1,2
Měď (Cu)	μmol/l	20,9-39,0	15,7-31,5	-	12,6-18,0	-
Zinek (Zn)	μmol/l	10,7-22,9	9 – 18	-	12,2-18,0	-
Železo (Fe)	μmol/l	18-35	5,4-32,2	12,2-38,5	21,0-35,0	5-12

1.3 POUŽITÍ SPEKTROFOTOMETRU WPA S800 SPECTRAWAVE

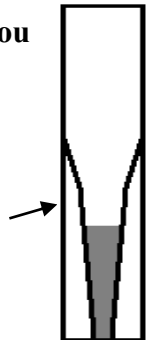
Měření absorbance:

- 1) Není-li přístroj zapnutý - **zapněte** přístroj tlačítkem 
- 2) **Nastavte vlnovou délku:** šipkami ◀ ▶ nastavte měření vlnové délky, symbol nm
šipkami ▲ ▼ nastavte vlnovou délku (rozsah 330-800 nm)
tlačítkem  potvrďte nastavení vlnové délky

- 3) **Nastavte měření absorbance:** šipkami ▲ ▼ nastavte symbol **Abs** (display: x.xxx^{Abs})

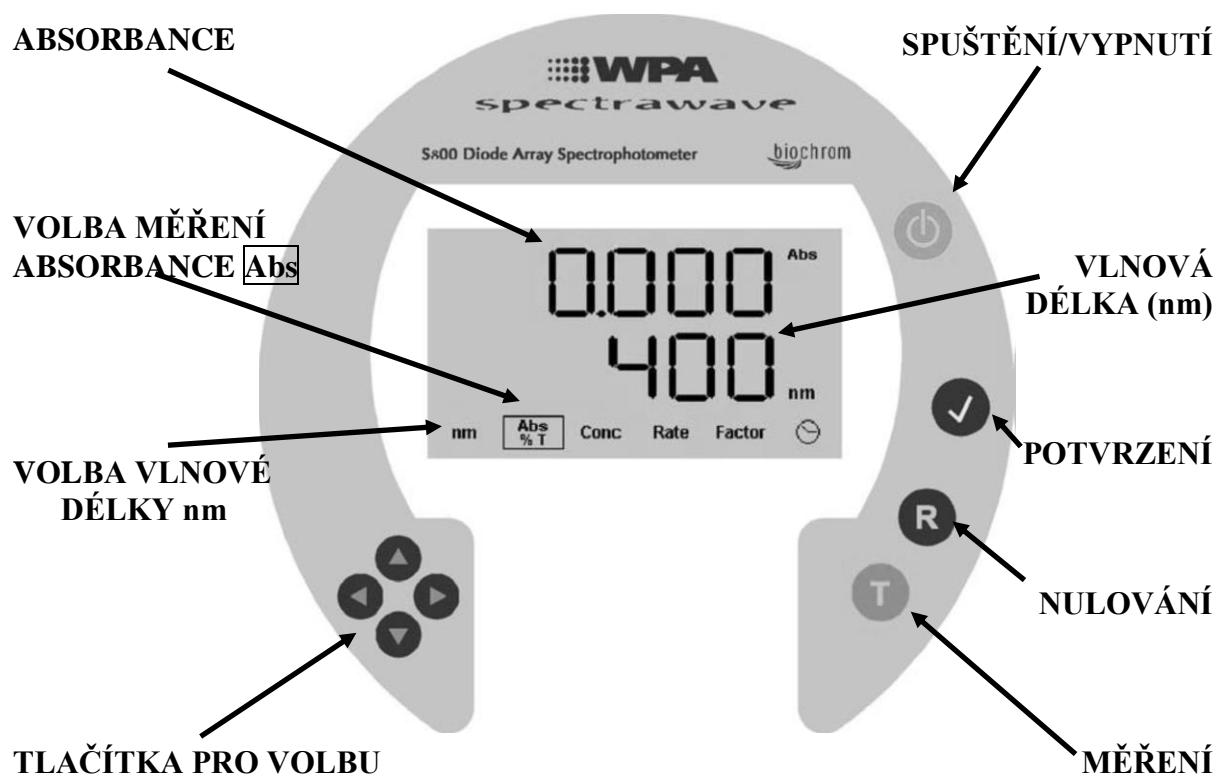
- 4) Uchopte příslušnou **semimikrokyvetu** (pro objem **500-1500μl**) a **nalijte stříčkou destilovanou vodu**, buničitou vatou pečlivě očistěte kyvetu

semimikrokyveta
min. výška roztoku je 15 mm



- 5) kyvetu s destilovanou vodou jemným tlakem **umístěte do** kyvetového prostoru
- 6) **zmáčkněte tlačítko** R (display: bliká rrrr^{Abs} poté svítí **0.000^{Abs}**)
- 7) kyvetu s destilovanou vodou vyjměte, destilovanou vodu vylijte
- 8) kyvetu **řádně opláchněte** destilovanou vodou, osušte ji buničitou vatou
- 9) **do kyvety nalijte postupně v následujícím pořadí: slepý vzorek, standard nebo analyzovaný vzorek** (min. výška roztoku je 15 mm) kyvetu buničitou vatou pečlivě očistěte
- 10) kyvetu přiměřeným tlakem **umístěte do** kyvetového prostoru
- 11) **zmáčkněte tlačítko** T pro **měření absorbance** (světelný paprsek svítí zepředu dozadu přes stěny kyvety)
- 12) změřená absorbance svítí na display, **absorbanci zaznamenejte**
- 13) kyvetu vyjměte, **analyzovaný slepý vzorek, standard nebo vzorek nalijte zpět do zkumavky**
- 14) kyvetu **řádně opláchněte** destilovanou vodou, osušte ji buničitou vatou,
- 15) opakujte kroky 9-14 pro měření dalších vzorků
- 16) přístroj nevyplínejte

Spektrofotometr WPA S800 SPECTRAWAVE



2 MINERÁLNÍ LÁTKY I.

2.1 STANOVENÍ KONCENTRACE HOŘČÍKU V KREVNÍM SÉRU

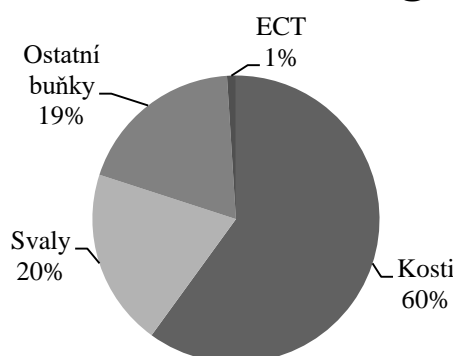
Úvod:

Hořčík (přesněji hořečnatý kationt Mg^{2+}) je jedním z hlavních intracelulárních kationtů v těle a je kofaktorem mnoha enzymatických reakcí, včetně všech reakcí zahrnující tvorbu a využití ATP. Hořčík je rovněž nezbytný pro syntézu bílkovin, nukleových kyselin a má rovněž význam při hydroxylaci vitamínu D v játrech (aktivace).

V buňce je významné množství hořčíku v jádře, mitochondriích či endoplasmatickém retikulu, ale většina je navázána na proteiny a záporně nabitě molekuly, přičemž v cytosolu je hořčík navázán z 80% na ATP. V séru se nachází přibližně jen asi 1% celkového hořčíku organismu, z něhož je 55% volných, 30% je navázáno na proteiny (především na albumin) a cca 15% je v komplexech s fosfáty, citráty a jinými anionty. Zásoby v ECT poskytují zdroj hořčíku pro ICT.

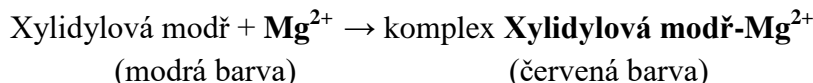
Homeostáza hořčíku je především rovnováže mezi střevní absorpcí a renální exkrecí, přičemž na regulaci koncentrace hořčíku se nepřímo podílí vitamin D a PTH. Metabolismus hořčíku je tedy úzce souvislý s vápníkem, ale při nedostatku hořčíku nemá organismus žádný aktivní regulační mechanismus pro zabránění poklesu hořčíku v krvi. Hořčík je vstřebáván především v tenkém střevě, mohou se však vyskytovat druhové odlišnosti. Při resorpci hořčíku z trávicí soustavy se je vápník antagonistou hořčíku a velké dávky vápníku snižují využití hořčíku. Vylučován je především trusem, v menší míře močí či mlékem během laktace, během níž se může ztratit značné množství hořčíku.

Rozdělení hořčíku v organismu



Úkol: Stanovte koncentraci hořčíku v krevním séru spektrofotometrickou metodou. Proveďte kontrolu pracovního postupu stanovením koncentrace hořčíku v kontrolním séru Lyonorm P.

Princip: Spektrofotometrické stanovení Mg^{2+} touto metodou je založeno na vzniku červeně zbarveného komplexu Mg^{2+} s Magonem Xylidylová modř v alkalickém prostředí. Reakce není specifická, je zatížena systematickou kladnou chybou, na které se podílí sérový vápník, jehož vliv ještě zvyšují ionty sodíku a draslíku. Stanovení narušují citronany.



Činidla:

- Magon = Xylidylová modř ($3,5 \text{ mmol.l}^{-1}$) (1-(2-hydroxyazo)-2-naftol-3-(2,4-dimethyl)-karboxyanilid)
- Standardní roztok hořčíku (koncentrace $c_{st}=0,823 \text{ mmol.l}^{-1}$)

K analýze použijte připravená činidla, krevní sérum a kontrolní sérum (Lyonorm).

Pracovní postup:

Do **krátkých zkumavek** pipetujte dle tabulky:

Činidla, vzorek	Zkumavky:			
	Vzorek 2x	Standard 1x	Lyonorm 1x	Slepý vzorek 1x
Pracovní roztok Magonu (ml)	1,00	1,00	1,00	1,0
Standardní roztok hořčíku (ml)	-	0,01	-	-
Sérum (ml)	0,01	-	-	-
Lyonorm (ml)	-	-	0,01	-
Deionizovaná voda (ml)	-	-	-	0,01

Vzorky ponechte 15 minut stát, poté nejpozději do 60 minut změřte absorbanci vzorku (A_{Vz}), slepého vzorku (A_{Sv}), standardu (A_{St}) a Lyonormu (A_{Ly}) při vlnové délce 505 nm (490 - 520 nm) v kyvetě proti deionizované vodě.

Výpočet pro vzorek:

$$\text{Koncentrace hořčíku (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{Vz} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

Výpočet pro kontrolní sérum (Lyonorm):

$$\text{Koncentrace hořčíku (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{Ly} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

c_{st} – tj. koncentrace standardu (uvedena na lahvičce roztoku standardu)

Vypočtenou hodnotu koncentrace hořčíku kontrolního séra Lyonorm srovnajte s atestem. Do protokolu si vypište charakteristiku Lyonormu (Kontrolní sérum – Lyonorm).

Poznámky:

- 1) *Je-li koncentrace hořčíku ve vzorku vyšší než 3,5 mmol.l⁻¹, ředí se vzorek fyziologickým roztokem a postup se celý opakuje. Výpočet = výsledek x ředění.*
- 2) *Stanovení hořčíku Magonem není specifické a je zatíženo systematickou kladnou chybou, na které se hlavním dílem podílí sérový vápník, jehož vliv ještě zvyšují ionty sodíku a draslíku. Proto ke kalibraci užívejte výhradně standardní roztok ze soupravy, který obsahuje interferující látky (vápník, draslík a sodík) ve fyziologických množstvích.*
- 3) *Sklo pro analýzu musí být dokonale čisté a vyčleněné pouze pro tyto účely.*
- 4) *Červené zbarvení komplexu Mg²⁺ s Magonem nemusí být vizuálně postřehnutelné, neboť je překryto modrým zbarvením nezreagovaného Magonu.*

Hodnocení vyšetření sérového hořčíku:

Hemolýza je příčinou interference ve výsledcích, neboť v erythrocytech je asi 3x větší množství hořčíku než v séru. Jelikož sérum představuje jen asi 1% celkového množství hořčíku, interpretace výsledků nemusí být proto zcela přesná. Hypomagnezémie bývá častějším nálezem při poruchách metabolismu než hypermagnezémie.

➤ **Hypomagnezémie = snížená hladina hořčíku v krvi**

Hypomagnezémie je obvykle spojována se zvýšenou ztrátou nebo sníženým příjmem hořčíku. Ztráty ledvinami či gastrointestinálním traktem bývají nejčastější příčinou hypomagnezémie u malých zvířat. Ztráty ledvinami jsou během zvýšené diurézy, renálního onemocnění či inhibice reabsorpce (hyperkalcémie). Malabsorpce a průjem jsou příčinami ztrát hořčíku trávicím ústrojím. Obecně pak prolongovaná anorexie či špatné stravovací návyky zvířat mohou vést rovněž k hypomagnezémii, a to zejména v případě, že je zvíře v období laktace. Subklinická hypomagnezémie je běžná u kriticky nemocných koní a malých zvířat a může zvýšit závažnost syndromu systémové zánětlivé odpovědi.

U přežvýkavců je častou příčinou hypomagnezémie snížený příjem. *Pastevní tetanie* přežvýkavců je onemocnění, které je spojeno s pastvou a příjmem mladé zelené píce nebo při zkrmování mladé zelené či konzervované píce (*stájová tetanie*), která má vysoký obsah draslíku a dusíkatých látek a nízký obsah hořčíku. Zvýšený příjem draslíku a dusíkatých látek v bachoru pak vytváří s hořčíkem nerozpustný komplex a následně se tak snižuje vstřebávání hořčíku. Dalším onemocněním přežvýkavců je *mléčná tetanie*, která bývá spojena se staršími telaty na mléčné výživě chudé na obsah hořčíku.

Při hypomagnezémii může dojít k vyvolání tetanického záchvatu různého stupně i v důsledku působení malého stresu. K neuromuskulárním příznakům hypomagnezémie patří hyperexcitabilita, svalový třes, křeče a ataxie. Další komplikace spojené s hypomagnezemií jsou rozvoj hypokalémie nebo hypokalcémie.

Hypermagnezémie = zvýšená hladina hořčíku v krvi

Hypermagnezémie je vzácnější stav, kterým trpí zejména monogastrická zvířata. U koní se projevuje pocením a svalovou slabostí, zejména do 4 hodin od obdržení nadměrné perorální dávky síranu hořečnatého, který je podáván při léčbě střevních obtíží. Nejčastějším důvodem hypermagnezémie u malých zvířat je iatrogenní podání roztoků infúzí nebo z důvodu snížení renální vylučování, především spojené s akutním selháním ledvin nebo obstrukcí močové trubice. Symptomatická hypermagnezémie je téměř vždy způsobena excesivním příjmem či aplikací magnesiových solí. Hypermagnezémie byla pozorována rovněž u koček se selháním ledvin, kterým byly podávány chybné infuzní roztoky. Hypermagnezémie je klinicky méně významným problémem, ovšem může mít za následek srdeční nebo neurologické problémy a způsobit nevolnost a zvracení. Hypermagnezémie může vést k poklesu sérové koncentrace kalcia, neboť vysoké sérové koncentrace hořčíku snižují sekreci PTH.

SOUHRN

↓ Hypomagnezémie

- ✓ *snížený příjem hořčíku*: nedostatečný příjem organické výživy, pouze mléčná výživa nebo ochuzená způsobem přípravy, léčba deficitní na Mg (diuretika, antibiotika, digitalis), proteino-energetická malnutrice,
- ✓ *snížená resorpce hořčíku*: vazba hořčíku na volné mastné kyseliny, fytáty, oxaláty, fosfáty, zásadité pH, přebytek vápníku a fosforu a nižší množství Na/K, zvracení, průjemy, laxativa, malabsorpční syndrom, resekce střeva, pankreatitida (zánět slinivky břišní),
- ✓ zvýšené vylučování (případně přesun do buněk):
- ✓ renální příčiny - tubulární onemocnění, glomerulonefritida, intersticiální nefritida,
- ✓ endokrinní příčiny - hyperparathyreóza, hyperaldosteronismus, hyperthyreóza, hyperkalcemie, diabetes mellitus,
- ✓ poruchy fyziologické funkce kůže - popáleniny,
- ✓ léky farmakologické skupiny- diuretika, antibiotika, aminoglykosidy,
- ✓ různé - nadměrná laktace, březost, závažné patofyziologické stavy (pooperační),
- ✓ kardiovaskulární, lékové toxikózy

↑ Hypermagnezémie

- ✓ zvýšený příjem hořčíku: cílený přívod solí hořčíku, léky obsahující Mg (projeďadla, antacida)
- ✓ snížené vylučování hořčíku: akutní a chronické selhání ledvin, hypothyreóza, hypoparathyreóza, Cushingův syndrom, nedostatek STH
- ✓ různé další: dehydratace, metastázy tumorů, myelom, acidóza

2.2 STANOVENÍ KONCENTRACE ANORGANICKÉHO FOSFORU V KREVNÍM SÉRU

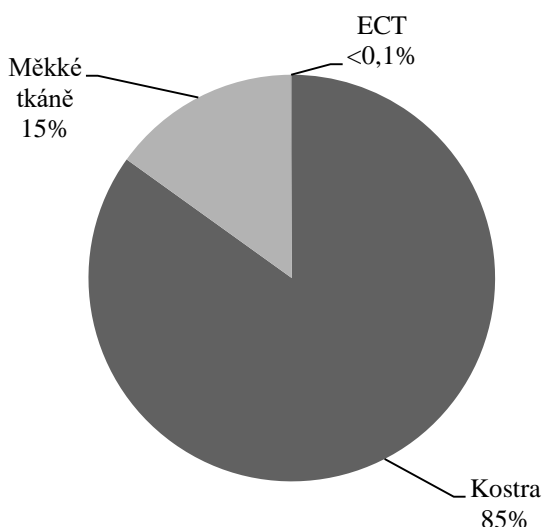
Úvod:

Zhruba 85% celkového množství fosforu je v kostře a zbytek je v měkkých tkáních, malé množství (<0,1%) je v ECT. Většina fosforu v měkkých tkáních se nachází uvnitř buněk (hlavní intracelulární anion). Z drtivé většiny se jedná o organické fosfáty přítomné v nukleových kyselinách, fosfolipidech, fosfoproteinech a makroergických sloučeninách (ATP, GTP). Tyto sloučeniny hrají klíčovou roli v regulaci intermediárního metabolismu, proteinů, lipidů a sacharidů. Fosfor je důležitý pro energetický metabolismus buněk, syntézu nukleových kyselin a buněčnou signalizaci.

Fosfor v ECT udržuje hladinu fosforu v ICT a poskytuje substrát pro mineralizaci kostí, neboť je hlavní součástí hydroxylapatitu v kostech. Kosterní fosfor je rovněž zásobárnou fosforu pro celkový organismus.

Plasma/sérum obsahuje zejména anorganické fosfáty (fosforečnany H_2PO_4^- a HPO_4^{2-}), které se stanovují při biochemických analýzách jako tzv. anorganický fosfor P_i . Tyto fosfáty představují asi 55% celkového plasmatického/sérového fosforu. Dalších zhruba 35% je vázáno v komplexech s Na, Ca a Mg a zbylých 10% je vázáno na bílkoviny.

Rozdělení fosforu v organismu



Úkol: Stanovte anorganický fosfor v krevním séru spektrofotometrickou metodou.

Princip: V krvi se vyskytuje anorganický fosfor jako směs hydrogen- a dihydrogenfosforečnanu. Po přidavku kyseliny askorbové a trichloroctové (A-TCA) se kyselina fosforečná převede reakcí s molybdenanem amonným na žlutý fosfomolybdenan amonný. V kyselém prostředí (kyseliny askorbové, octové / arsenitanu sodného) se šestimocný molybden redukuje a vzniká molybdenová modř. Intenzita vzniklého modrého zbarvení je přímo úměrná množství fosforu v krevním séru.

fosforečnany + molybdenan amonný → fosfomolybdenan amonný

fosfomolybdenan amonný → redukce → molybdenová modř

Činidla:

- A -TCA = kyselina askorbová 0,114 mol v jednom litru kyseliny trichloroctové koncentrace 0,612 mol/l,
 - AM = roztok molybdenanu amonného 4,30 mmol.l⁻¹,
 - A - C = citronan sodný 0,077 mol.l⁻¹, arsenitan sodný 0,015 mol.l⁻¹, kyselina octová 0,035 mol.l⁻¹,
 - standardní roztok dihydrogenfosforečnanu draselného = 1,614 mmol fosforu.l⁻¹.
-

K analýze použijte připravená činidla a krevní sérum.

Pracovní postup:

Do centrifugačních zkumavek (krátkých!) pipetujte dle tabulky:

Činidla, vzorek	Zkumavky:		
	Slepý vzorek 1x	Standard 2x	Vzorek 2x
A - TCA (ml)	2,00	4,00	4,00
Sérum (ml)	-	-	0,20
Standard (ml)	-	0,20	-

Dobře promíchat, **odstředit pouze vzorek** po dobu 10 minut při 3000 ot./min.

Ze zkumavek se slepým vzorkem, standardem a vzorky odeberte a přepipetujte **do nových vysokých zkumavek** tyto objemy:

Slepý vzorek (ml)	2,00	-	-
Standard (ml)	-	2,00	-
Supernatant odebraný ze vzorku (ml)	-	-	2,00

Dále pipetujte dle tabulky:

AM	1,00	1,00	1,00
A – C	2,00	2,00	2,00

Po přidání činidla AM musí ihned následovat **do 15 sekund** přidání činidla A-C.

Po každém přidání činidla obsah dobře promíchat, poté nechat stát 15 min. Změřte absorbanci vzorku (A_{Vz}), slepého vzorku (A_{Sv}) a standardu (A_{St}) v kyvetě při vlnové délce 700 nm proti deionizované vodě. Modré zbarvení je stálé několik hodin.

Výpočet:

$$\text{Koncentrace anorganického fosforu (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{Vz} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

c_{St} – tj. koncentrace standardu (uvedena na lahvičce roztoku standardu)

Hodnocení vyšetření sérového fosforu:

Hladinu fosforu v organismu hodnotíme nejlépe spolu s vyšetřením vápníku, neboť jejich regulace a metabolismus spolu souvisí. Změny koncentrací fosforu v séru mohou být v důsledku abnormalit v hormonální regulaci absorpce střevem či zpětné resorpce ledvinami. Sérová koncentrace fosforu však nemusí odrážet celkový stav v organismu. V erythrocytech se nachází také velké množství fosforu. Během delšího stání vzorku krve, nebo při špatně provedeném odběru či uskladnění, fosfor z erythrocytů se může dostat do séra.

Hypofosfatémie = snížená hladina fosforu v krvi

Důvody pro hypofosfatémii jsou hormonální nerovnováha, snížení renální reabsorpce, snížená střevní absorpce nebo redistribuce fosforu z ECF na ICF. Hormonální nerovnováha obvykle zahrnuje souběžné abnormality vápníku. Nízká hladina fosforu se zvýšenou koncentrací vápníku souvisí s primární nebo pseudo-hyperparatyreózou. Pokles fosforu a vápníku současně je spojeno zejména s hypovitaminózou D. Hypofosfatémie může nastat také v důsledku zvýšené hladiny PTH v reakci na hypokalcemii v době kolem porodu (fyziologická hyperparatyreóza). Snížení renální reabsorpce fosforu vede k hypofosfatémii, což může nastat v důsledku vrozených nebo získaných vad v proximálních tubulech (Fanconiho syndrom). Diabetická ketoacidóza může vést rovněž k hypofosfatémii (osmotická diuréza). Anorexie nebo dlouhodobě nízký obsah fosfátů ve stravě může vést k hypofosfatémii. Dalšími důvody mohou být porucha absorpce z důvodu zvracení, průjmů nebo střevních onemocnění. Snížená střevní absorpce s následující hypofosfatémii je mechanismus spojený s hypovitaminózou D. Rovněž respirační alkalóza bývá spojena s hypofosfatémii z důvodu přesunutí fosfátů do intracelulárního prostoru jako následek pohybu CO_2 ven z buňky.

Hyperfosfatémie = zvýšená hladina fosforu v krvi

K hyperfosfatémii obvykle dochází při zatížení fosforem (zvýšená absorpce GI, uvolňování z kostí nebo iatrogenním podáním), které není kompenzováno zvýšeným vyloučením močí nebo utilizací tkáněmi. U většiny druhů jsou primární cestou vylučování fosforu ledviny, přežvýkavci mohou vylučovat fosfor navíc prostřednictvím gastrointestinálního traktu. Nejčastější příčinou hyperfosfatémie je snížení renálního vylučování, které bývá spojeno s poklesem rychlosti glomerulární filtrace. Chronické selhání ledvin je nejčastější příčinou hyperfosfatémie u dospělých psů a koček. U přežvýkavců je možnou příčinou obstrukce gastrointestinálního traktu, neboť se takto snižuje vylučování fosforu. Nadbytek fosforu prostřednictvím zvýšení střevní absorpce může nastat v případě vysokého příjmu na fosfáty bohaté potraviny. Dalším důvodem může být hypervitaminóza D, během níž se zvyšuje střevní absorpce fosforu, což vede k hyperkalcémii a hyperfosfatémii. Rovněž nesprávná aplikace fosfátového klystýru může vést k závažné hyperfosfatémii. Rovněž uvolňování fosforu z kostí, které může nastat při osteolytických lézích, mít za následek hyperfosfatémii. K uvolňování fosforu z buněk dochází také při rozsáhlých poraněních (nebo nádorech či akutních myopatiích). Acidóza může mít za následek snížení

buněčné absorpce fosforu a může přispět k hyperfosfatémii. Nesprávná manipulace vzorek může způsobit falešně zvýšené koncentrace sérového fosforu. Mladá a rostoucí zvířata mají vyšší koncentrace sérového fosforu a k mírnému přechodnému zvýšení může také dojít postprandiálně.

SOUHRN

↓ **Hypofosfatémie**

- ✓ hypovitaminóza D
- ✓ primární hyperparathyreóza,
- ✓ pseudohyperparathyreóza
- ✓ osteomalacie, rachitis (měknutí kostí),
- ✓ zvýšená exkrece fosfátů ledvinami,
- ✓ diabetes mellitus – ketoacidóza
- ✓ resorpční poruchy střeva, snížené vstřebávání, např. vlivem vysokých hodnot pH, Ca Mg a fytátů
- ✓ některé formy ulehnutí u skotu
- ✓ terapie diuretiky

↑ **Hyperfosfatémie**

- ✓ předávkování vitaminem D
- ✓ acidóza
- ✓ sekundární hyperparathyreóza (renální nebo alimentární)
- ✓ primární hypoparathyreóza
- ✓ akromegalie
- ✓ stavy po zlomeninách kostí, nádory kostí, osteolýza
- ✓ insuficience ledvin
- ✓ u mladých zvířat jsou fyziologické hodnoty slabě zvýšeny

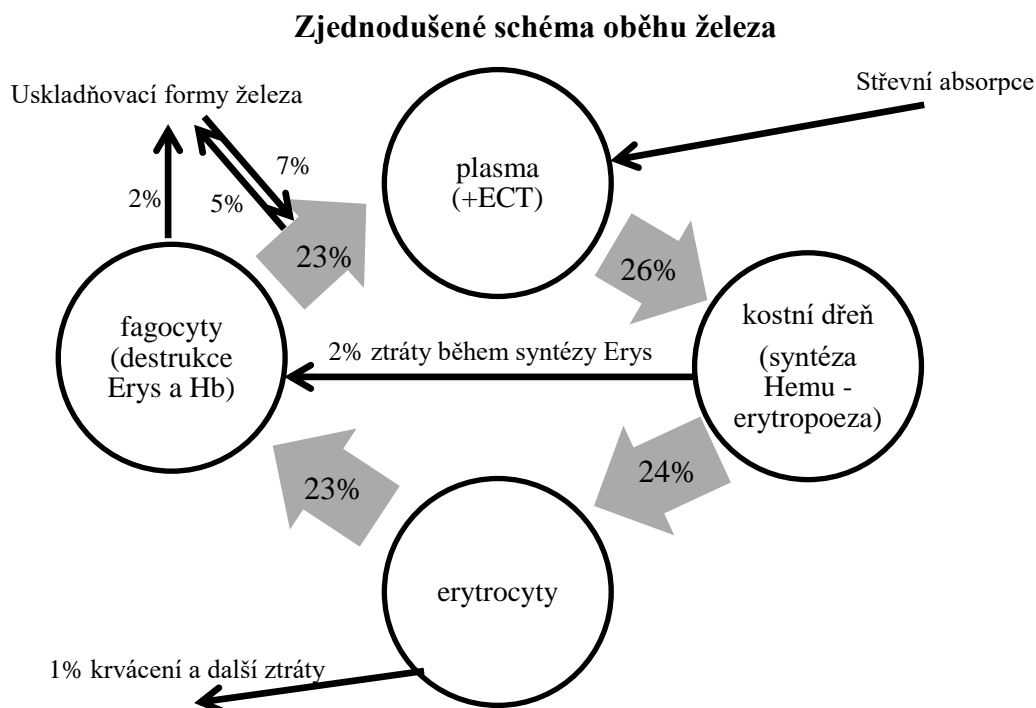
3 MINERÁLNÍ LÁTKY II.

3.1 STANOVENÍ KONCENTRACE SÉROVÉHO ŽELEZA V KREVNÍM SÉRU

Úvod:

Železo má v organismu mnoho důležitých funkcí, neboť hraje velmi důležitou roli v řadě redoxních reakcí probíhajících v organismu a je tak jedním z fyziologicky nejvýznamnějších prvků. Ve formě iontu Fe^{2+} je v hemových barvivech (hemoglobin, myoglobin), ale také jako kofaktor v cytochromech, cytochromoxidáze, peroxidáze, kataláze atd.

V ECT (plasma/sérum) i ICT (buňkách) se nachází velmi málo volného železa, neboť se organismus na jedné straně chrání před jeho toxickými účinky, ale na druhé straně obsah železa chrání před denními ztrátami. V organismu je hlavním regulátorem metabolismu železa hepcidin.

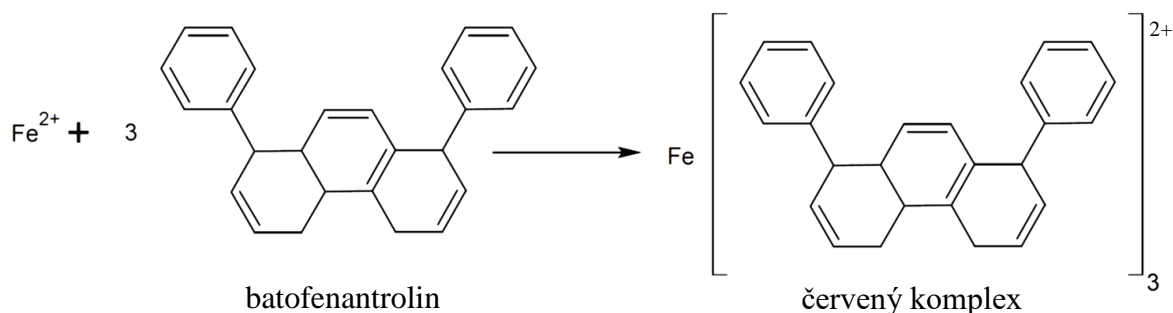


Přehled významu železa

- ✓ železo je nejhojnějším stopovým prvkem v organismu savců
- ✓ hlavní funkcí železa v těle je transport kyslíku.
- ✓ pouze 3-6% z přítomného železa ve stravě je normálně absorbována ve střevě.
- ✓ absorpce železa je aktivní proces, k největší absorpci dochází v přední části tenkého střeva.
- ✓ kobalt, zinek, měď a mangan „soutěží“ že se železem během střevní absorpce
- ✓ železo není obvykle snadno vylučováno z těla (neplatí pro krvácení)
- ✓ železo může způsobit tvorbu volných radikálů, neustálá přeměna mezi $\text{Fe}^{\text{II}+}$ a $\text{Fe}^{\text{III}+}$
- ✓ mladá a rychle rostoucí zvířata jsou náchylná k nedostatku železa
- ✓ většina metalloproteinů obsahuje železo

Úkol: Stanovte koncentraci sérového železa jako součást vyšetření látkové přeměny železa.

Princip: V séru se železo nachází jako Fe^{3+} vázané na transportní bílkovinu transferin. Při deproteinaci kyselinami trichloroctovou a chlorovodíkovou se Fe^{3+} uvolní z transferinu a je redukováno kyselinou thioglykolovou na Fe^{2+} . S batofenantrolinem, který obsahuje reaktivní skupinu $[\text{=N-C-C-N=}]$ se Fe^{2+} pak naváže do červeně zbarveného komplexu, který je vhodný k fotometrickému stanovení.



Činidla:

- Standardní roztok síranu železnato-amonného (koncentrace $17,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$),
- Batofenantrolinové činidlo: batofenantrolin $0,46 \text{ mmol/l}$, octan sodný 2 mol.l^{-1}
- deproteinačně-redukční roztok kyselin **-je připraven** (z činidel 3 a 4)
- Činidlo 3: kyselina thioglykolová $92,1 \text{ mol.l}^{-1}$; Činidlo 4: kyselina trichloroctová $0,6 \text{ mol.l}^{-1}$, kyselina chlorovodíková 2 mol.l^{-1}

K analýze použijte připravená činidla a krevní sérum.

Pracovní postup:

Připravte si **dvě centrifugační zkumavky**. Do každé centrifugační zkumavky odpipetujte 1 ml deproteinačně-redukčního roztoku kyselin a 1 ml séra. Obsah dokonale promíchejte a po 5 minutách stání při teplotě laboratoře odstřed'ujte po 10 minut při 3000 ot/min. K dalšímu stanovení opatrně odeberte po 1 ml supernatantu pomocí 1 ml pipety. Pokud by byl částečně odebrán i bílý sediment je zapotřebí sraženinu znovu odstředit nebo opakovat deproteinačně-redukční krok. Dále postupujte dle tabulky:

Činidla, vzorky:	Zkumavky:		
	Vzorek 2x	Standard 2x	Slepý vzorek 2x
Supernatant (ml)	1,00	-	-
Standardní roztok síranu železnato-amonného (ml)	-	0,5	-
Deproteinačně-redukční roztok (ml)	-	0,5	0,5
Deionizovaná voda (ml)	-	-	0,5
Batofenantrolinové činidlo (ml)	1,00	1,00	1,00

Obsahy zkumavek dobře promíchejte a 5 minut nechejte stát, poté nejpozději do 60 minut změřte absorbanci vzorku (A_{Vz}), slepého vzorku (A_{Sv}) a standardu (A_{St}) v kyvetě při vlnové délce 530 nm proti deionizované vodě.

Výpočet:

$$\text{Koncentrace železa } (\mu\text{mol. l}^{-1}) = \frac{(A_{Vz} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

c_{St} – tj. koncentrace standardu (uvedena na lahvičce roztoku standardu)

Hodnocení vyšetření sérového železa:

Sérové/plazmatické železo představuje zejména $\text{Fe}^{\text{III}+}$ vázané na transferin, neobsahuje železo ve volném hemoglobinu v séru.

➤ **Hyposiderémie = snížená hladina železa v krvi**

Anémie z nedostatku železa je důležitý syndrom u mnoha zvířat, který vede k oslabení a letargii kvůli sníženému transportu kyslíku do tkání. Nedostatek může vyplývat z dietního deficitu vstřebatelného železa nebo chronických ztrát krve (parazitismus, vnější krvácení). Mladá rychle rostoucí zvířata jsou zvláště citlivá na nedostatek železa, neboť mají vysokou poptávku po sloučeninách s obsahem železa v jejich stravě. Významným faktorem je nízká hladina železa v mléce, naproti tomu má kolostrum obvykle vysoký obsah železa. Selata obvykle vyžadují doplněk železa v případě anémie, je třeba se ovšem vyhnout předávkování, neboť to může mít za následek intoxikaci železem, zejména v případě nedostatku vitamínu E. Četné gastrointestinální poruchy (průjmu a malabsorpce) jsou také spojeny s nedostatkem železa. Pokles sérového železa může být u chronických zánětlivých procesů nebo i jako následek akutních infekcí, kdy pokles koncentrace sérového železa je vyvolán hepcidinem, který reaguje na zánět jako pozitivní reaktant akutní fáze. Železo je nezbytné i pro bakterie, pokles sérového železa zabraňuje bakteriím v množení, je to tedy jeden z obranných mechanismů

➤ **Hypersiderémie = zvýšená hladina železa v krvi**

V případě většího vstřebávání železa a nízké utilizace či vylučování může být organismus železem přetížen až intoxikován. Velká ložiska feritinu a hemosiderinu jsou spojena s hemochromatózou - syndromem charakterizovaným jako pigmentace kůže, poškození slinivky břišní (spojené s diabetem), cirhózou jater a atrofií gonád. Hemochromatóza se může projevit jako následek dlouhodobého nadměrného příjmu železa,

nebo také jako vrozená porucha zvýšené absorpce železa s vysokou rychlostí (idiopatická hemochromatózy). Hereditární hemochromatóza je běžná genetická porucha zejména u lidí. Cheláty železa v koncentraci 0,1 až 15%, lze nalézt v některých komerčních rostlinných potravinách a preparátech, či vybraných doplňcích krmiv. *Hemochromatóza* je pojem označující původně nadbytek železa s poškozením příslušných orgánů, což se projevuje buněčnou degenerací a fibrózou. Dnes se tímto pojmem označuje stav s nadbytkem železa bez ohledu na to, zda existují či neexistují důkazy o tkáňovém poškození. *Hemosideróza* je pojem označující nadbytek železa bez poškození tkání.

SOUHRN

↓Hyposiderémie

- ✓ snížený příjem železa: výlučně mléčná strava u selat a telat, zvýšená erytropoéza, (železo nárokuje hemoglobin)
- ✓ snížená resorpce železa: vliv fosforu, zinku, kadmia, mědi a manganu v krmné dávce
- ✓ nedostatek kyseliny chlorovodíkové (achlorhydrie, atrofická gastritida)
- ✓ chronické ztráty krve
- ✓ různé: infekce, parazitární onemocnění, zhoubné nádory, nefrózy, avitaminóza C
- ✓ průjem, krvácení, záněty GIT

↑Hypersiderémie

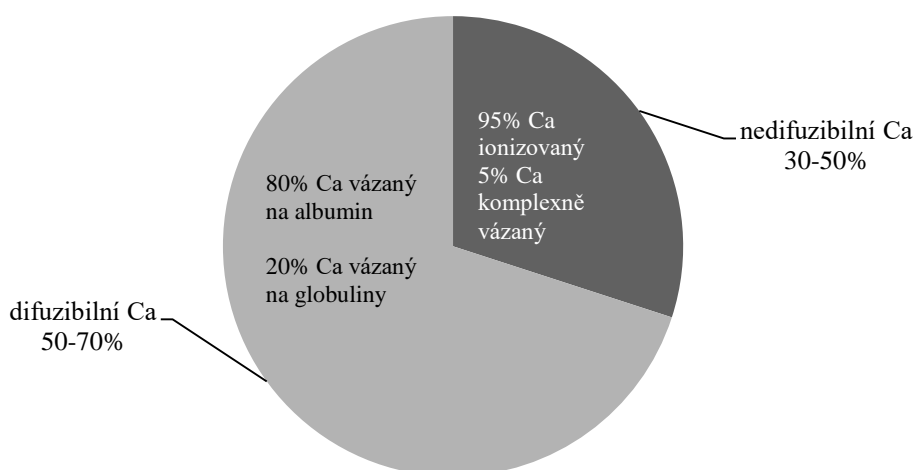
- ✓ při poškození parenchymových buněk jater (akutní hepatitis, cirhóza jater)
- ✓ aplastická, hemolytická, hyperchromní anémie
- ✓ porfyrie
- ✓ hemachromatóza

3.2 STANOVENÍ VÁPENATÝCH IONTŮ VE VZORKU KREVNÍHO SÉRA

Úvod:

Vápník se nachází ve třech hlavních tělesných kompartmentech: v kostech (asi 99%), měkkých tkáních (1%) a extracelulární tekutině (prakticky všechen v plazmě). Vápník, který se obvykle stanovuje jako celkový vápník, se v séru nachází z 55 % jako ionizovaný vápník (Ca^{2+}), ze 40 % vázaný na protein a z 5 % na organické kyseliny. Podíl ionizovaného vápníku závisí na hodnotě pH krve (klesající pH = množství vápníku roste). Hladina celkového vápníku při acidóze klesá, neboť koncentrace ionizovaného vápníku je regulátorem homeostázy. Biologicky účinnou formou je ionizovaný vápník, který je nejvíce determinován acidobazickým stavem. Intracelulárně se vápník vyskytuje nepatrně a plní tam četné fyziologické funkce, jako jsou podpora aktivity enzymů, regulace aktivity enzymů (prostřednictvím kalcium-dependentního proteinu calmodulinu), membránový přenos, iniciace svalové kontrakce, neuromuskulární dráždivost, sekrece hormonů, metabolismus glykogenu a buněčné dělení. Celkem 90 – 99% intracelulárního kalcia se nachází v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu. Nízká koncentrace kalcia v cytozolu je udržována transportními mechanismy v plazmatické, mitochondriální a mikrosomální membráně. Tyto procesy hrají důležitou roli v biologické aktivitě ionizovaného kalcia. Do extracelulárního prostoru vytlačuje kalcium kalciová pumpa. Vápník je extracelulární ion. Má důležitou roli ve výstavbě kostí, při srážení krve, udržování normální

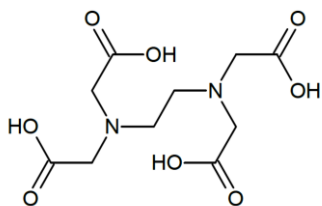
Rozdělení vápníku v séru



Úkol: Stanovte koncentraci vápenatých iontů ve vzorku krevního séra

Princip: Přídavkem hydroxidu sodného a murexidu se zbarví roztok vápenatých solí červeně, jelikož část vápenatých iontů se sloučila na červený komplex. V roztoku však zůstávají volné ionty vápníku. Přidáme-li komplexon III, vyváží se nejdříve tyto volné ionty, a jelikož vazba vápníku s murexidem je slabší, rozruší komplexon III i tuto vazbu, vyváže všechny ionty vápníku a dochází ke změně zabarvení z červené do modrofialové barvy. Změna této barvy znamená konec titrace. Titraci komplexonem III musíme provádět ihned po přidání murexidu, jinak se může barvivo rozložit.

kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA)



murexid



Činidla:

- Komplexon III (0,002 mol/l) = Chelaton III, dvojmocná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové
 - murexid (ve směsi s NaCl v poměru 1:100) = amonná sůl kyseliny purpurové, metalochromní indikátor
 - hydroxid sodný (9 mol/l)
 - standard Ca, kde 1ml odpovídá 0,1 mg Ca
-

K analýze použijte připravená činidla a krevní sérum.

Pracovní postup:

Do čtyř titračních baněk napipetujte:

- 25 ml deionizované vody
- 0,2 ml NaOH (9 mol/l)
- Přidáme indikátor murexid (0,02 g)

Do tří baněk se přidá 1 ml séra (roztok zčervená). Čtvrtá baňka zůstane kontrolní. Titruje se odměrným roztokem komplexonu III do barvy kontrolní baňky.

Výpočet:

Při titraci odpovídá 1ml 0,002 M komplexonu III 0,080 mg Ca.

$$c(\text{Ca}) = a \times 0,08 \times 100 \times 0,2495 \text{ [mmol/l]}$$

a.... spotřeba komplexonu III při titraci

Hodnocení vyšetření vápníku v séru:

Pro diferenciální diagnostiku metabolismu vápníku je nutné stanovení ionizovaného vápníku. Jeho koncentrace, stejně jako podíl ionizovaného vápníku v celkovém vápníku, přináší ty nejlepší diagnostické výpovědi. Pro praxi však obvykle stačí stanovit celkový vápník.

Hypokalcémie = snížená hladina vápníku v krvi

Nejčastějším důvodem pro hypokalcémii je pokles ve frakci vápníku vázaného na bílkoviny, zejména pokud je současně přítomná hypoalbuminémie. Primární hypoparatyreóza je neobvyklá příčina hypokalcémie, avšak běžnější při iatrogení hypoparatyreóze, pokud jsou omylem odstraněna příštítná tělíska během operace štítné žlázy. Poruchy trávení a onemocnění GIT mohou mít za následek hypokalcémii. Snížená absorpce spojená s nedostatkem vitamínu D může mít za následek hypokalcémie, stejně jako hypofosfatémii. Hypomagnesémie snižuje sekreci a činnost PTH, což má za následek hypokalcémii (viz pastevní tetanie). Hyperfosfatémie může také vést k hypokalcémii, neboť vysoké hladiny fosforu snižují aktivaci vitamínu D a snižují účinek PTH na kosti. Tento případ je nejčastěji spojována s onemocněním ledvin nebo nutriční nerovnováhou (nadbytek fosforu, nebo nízký poměr vápníku a fosforu) a je označován jako sekundární hyperparatyreóza. Poptávka po vápníku v pozdní fázi gravidity nebo laktace může mít za následek hypokalcémii. Poporodní paréza se nejčastěji vyskytuje v průběhu 3 dnů po porodu u skotu, ale může se objevit i několik týdnů před nebo po porodu u ovcí a koz. Ke srážení vápníku s oxaláty dochází během intoxikace ethylenglykolem.

Hyperkalcémie = zvýšená hladina vápníku v krvi

Pokud není hyperkalcémie řešena, může vést k vážným následkům, jako je akutní poškození a selhání ledvin. Hyperkalcémie může dojít v důsledku zvýšení PTH nebo podobných látek jako PTH. Jednou z nejčastějších příčin hyperkalcémie jsou neoplazie. Běžnější nádory spojené s humorální hyperkalcémií jsou lymfoidní nádory a adenokarcinom apokrinní anální žlázy. Předávkování vitamínem D může mít vliv na zvýšené vstřebávání vápníku z gastrointestinálního traktu, stejně jako požití rodenticidních přípravků na bázi dojit s cholecalciferolu či požití rostlin obsahujících glykosidy vitamínu D (trojštět). Onemocnění ledvin může být spojeno s hyperkalcémií, ale mělo protože hyperkalcémie může být rovněž důvodem poškození ledvin, musí se vyšetřit všechny možné důvody. Hypoadrenokorticismus (Addisonova nemoc) je častou příčinou hyperkalcémie u psů a přibližně jedna třetina psů s hypoadrenokorticismem mají hyperkalcémii. Osteolytické léze mohou vést k hyperkalcémii, neboť kosti obsahují vysoké množství vápníku. Mírné, přechodné zvýšení koncentrace vápníku může dojít postprandiálně. Dehydratace může mít za následek mírné zvýšení v celkové koncentraci vápníku. Mladá rostoucí zvířata mají obvykle vyšší koncentrace vápníku. Lipémie nebo výrazná hemolýza mohou interferovat s kolorimetrickým měřením celkového vápníku v závislosti na metodě analýzy.

4 VITAMINY

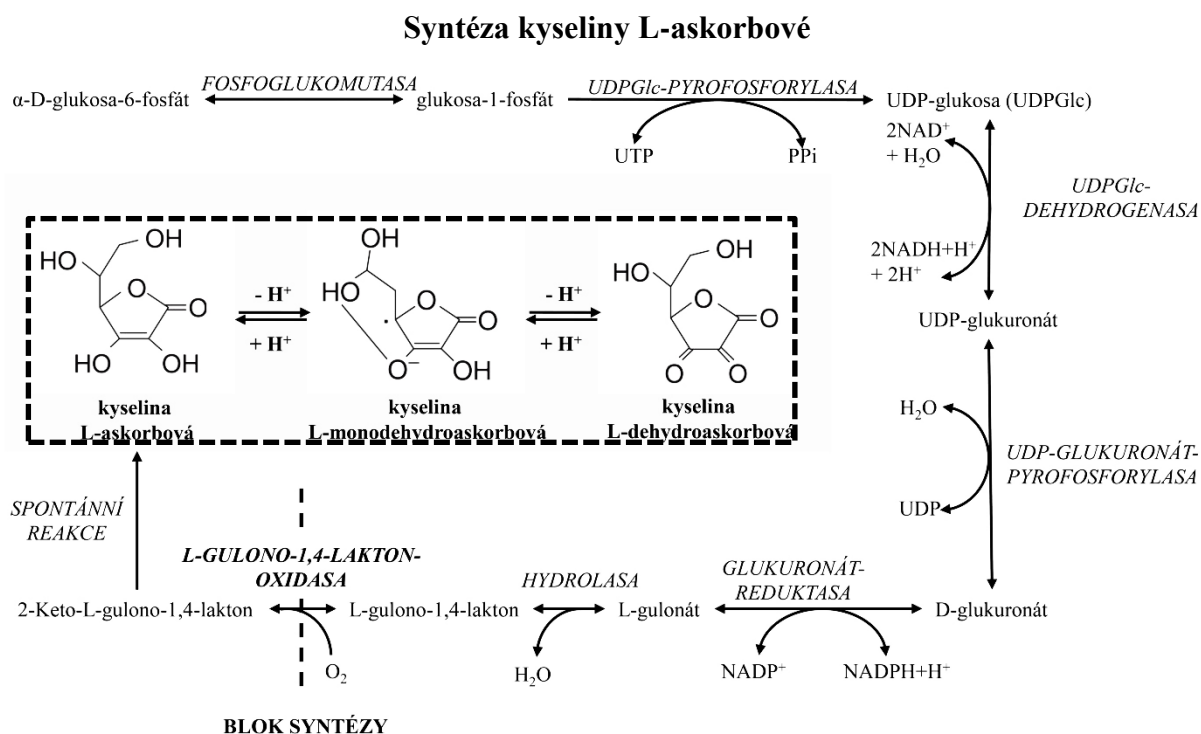
4.1 JODOMETRICKÉ STANOVENÍ VITAMINU C V MOČI

Úvod:

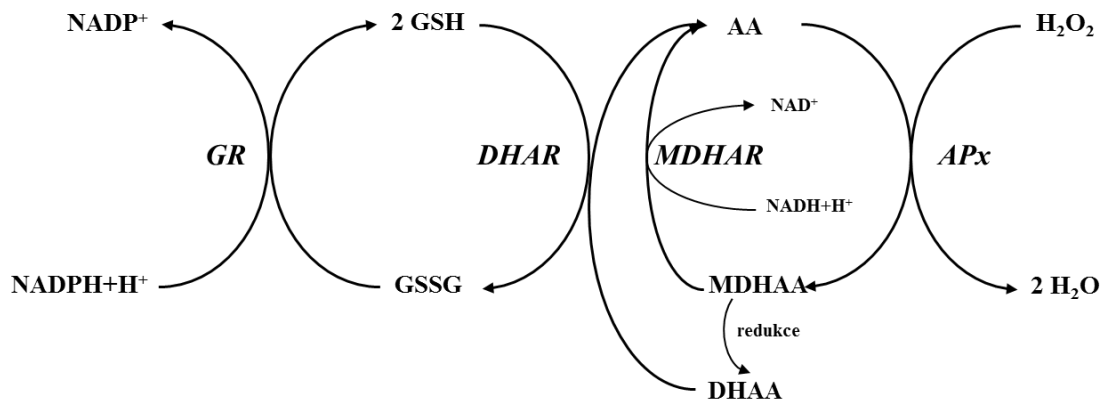
Vitamin C (kyselina L-askorbová) je významnou biomolekulou se svými typickými účinky v biochemických dějích a ve vztahu ke zdraví organismu. Chemicky je derivátem glukózy a vykazuje redukující účinky, kdy redukuje např. molekulární kyslík, cytochrom a, cytochrom c, což jí rovněž umožňuje antioxidační účinky. Její dehydrogenací vzniká kyselina L-dehydroaskorbová.

Biosyntéza kyseliny askorbové:

Enzymy pro syntézu kyseliny askorbové ve studenokrevných obratlovcích (ryby, obojživelníci a plazi) a některých starších řádů ptáků jsou lokalizovány v ledvinách. Pro ostatní řády ptáků a většinu savců platí, že enzymy pro syntézu jsou lokalizovány v játrech. Přesunutí lokalizace syntézy vitamínu C z ledvin do jater pravděpodobně souvisí s větší potřebou syntézy vitamínu C u teplotokrevných živočichů. Některé skupiny zvířat ztratily během evolučního vývoje schopnost syntetizovat kyselinu askorbovou díky delecí některého z nukleotidů genu pro enzym L-gulonolaktonoxidáza. Druhy živočichů, které jsou schopné vlastní syntézy, absorbují kyselinu askorbovou pouze pasivně. Naopak živočichové, kteří vyžadují přísun kyseliny askorbové potravou, absorbují vitamin C jak pasivním tak aktivním způsobem. Transport plasmou je pak převážně v redukované formě.



Antioxidační spolupráce kyseliny askorbové a glutathionu:



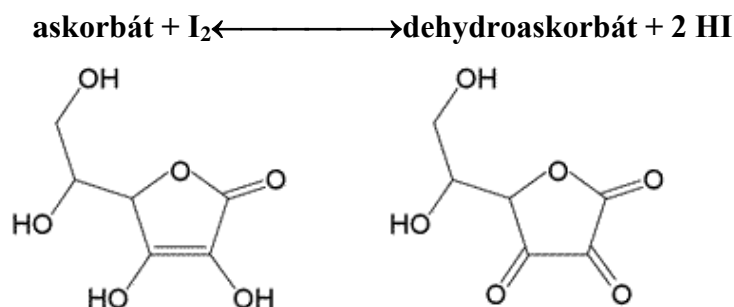
AA – kyselina askorbová; MDHAA – kyselina monodehydroaskorbová; DHAA – kyselina dehydroaskorbová; APx – askorbátperoxidáza, MDHAR – monodehydroaskorbátreduktáza, DHAR – dehydroaskorbátreduktáza, GR – glutathionreduktáza; GSH – redukovaný glutathion; GSSG – oxidovaný glutathion

Účast vitamínu C v biochemických dějích:

- 1) Účastní se syntézy kolagenu, kdy je nutná pro hydroxylaci aminokyseliny prolinu na hydroxyprolin. Při nedostatku kyseliny L-askorbové je syntetizovaný kolagen nedostatečně hydroxylován, což se projeví poruchou krevních cév, dochází ke vzniku krvácivých stavů (onemocnění skorbut)
- 2) Kyselina L-askorbová usnadňuje absorpci železa ze střeva, kdy železnaté ionty jsou lépe resorbovány ze střeva než železité.
- 3) Účastní se syntézy žlučových kyselin, steroidogeneze v kůře nadledvin, syntézy adrenalinu z tyrosinu, udržuje metalo-kofaktory v redukovaném stavu, např. měďnatý iont v monoxygenázách, železnatý iont v dioxygenázách.
- 4) Antioxidační potenciál kyseliny askorbové - hraje spolu s tokoferolem a redukovaným glutathionem důležitou roli v systému antioxidační ochrany organismu, hlavní ve vodě
- 5) rozpustný antioxidant v plasmě a v tkáních savců

Úkol: Proved'te jodometrické stanovení koncentrace kyseliny askorbové ve vlastní moči.

Princip: Kyselina L-askorbová (vitamin C, lakton 2-oxo-L-gulonové kyseliny) obsahuje endiolové seskupení (tj. dva hydroxyly na dvojně vazbě) a působí silně redukčně. Po oxidaci za odštěpení vodíků přechází askorbát na dehydroaskorbát. V kyselém prostředí lze stanovit koncentraci kyseliny askorbové titrací odměrným roztokem jodu dle následující rovnice.



Při indikaci bodu ekvivalence škrobovým indikátorem je výsledné zbarvení roztoku modré. Metoda stanovení je vhodná pro vodné roztoky kyseliny askorbové bez látek redukovatelných kyselinou askorbovou. U ostatních vzorků, pokud nejsou aplikovány postupy eliminující rušící látky, je stanovení pouze orientační. Mezi látky redukované kyselinou askorbovou patří například bílkoviny, redukující cukry, antibiotika a látky s disulfidickými skupinami.

Činidla:

- 5 mmol/l roztok jodu
 - 1% roztok škrobu (indikátor)
 - 0,1 mol/l kyselina sírová
 - standardní roztok kyseliny askorbové (50 mg/100 ml)
-

K analýze použijte připravená činidla a vlastní moč.

Pracovní postup:

Byretu naplníme odměrným roztokem jodu. K 5 ml moči v titrační baňce přidáme 0,5 ml 0,1 mol/l kyseliny sírové a 1 ml škrobového indikátoru. Za krouživého promíchávání titrujeme roztokem jodu. Titrační roztok musí neustále pomalu odkapávat a nepřestáváme krouživým pohybem míchat, dokud se nadbytkem jodu nezbarví titrovaný roztok do stálého modrého zbarvení. Poté přestaneme míchat a nedotitrováváme, i když se později zbarvení změní. Analýzu proved'te minimálně 3×. Další vzorek připravte těsně před titrací, jinak může dojít ke snížení spotřeby odměrného roztoku jodu vlivem vzdušné oxidace kyseliny askorbové. Výsledky obou titrací zprůměrujte a použijte pro výpočet výsledné koncentrace kyseliny askorbové ve vlastní moči. Stejně zpracujte i standardní roztok kyseliny askorbové. K 5 ml standardního roztoku v titrační baňce přidáme 0,5 ml 0,1 mol/l kyseliny sírové a 1 ml škrobového indikátoru a titrujeme. Spotřeby odměrného roztoku jodu zapište.

Výpočet:

K výpočtu koncentrace kyseliny askorbové v moči a ve standardu použijeme trojčlenku a následující teoretický vztah, který byl vypočten pro daná činidla z výše uvedené rovnice chemické reakce:

1 ml roztoku jodu 5 mmol/l odpovídá 0,8807 mg kyseliny askorbové.

(pozor – stanovujete v 5 ml moči/standardu)

Vylučování kyseliny askorbové močí přepočtete na diurézu muže – 2 000 ml moči za 24 h, ženy 1 500 ml moči/24 h.

Vylučování kyseliny askorbové (vitaminu C) močí se pohybuje od 0,02 g až do 0,1 g /l moči.

Poznámka:

Saturační test

Pro posouzení dotace organismu vitaminem C je možné provést „saturační“ test, ve kterém je sledována saturace organismu vitaminem C stanovením množství kyseliny L-askorbové vyloučené močí během 3 hodin po vypití roztoku obsahujícího 1 g této látky. Tři hodiny před analýzou kyseliny askorbové v moči se pacient vymočí. Poté ihned vypije roztok obsahující 1 g vitaminu C (2 tablety šumivého Celaskonu 500 mg). Těsně před analýzou se opět vymočí a objem moči se změří. Pro zvýšení stability kyseliny L-askorbové je nutno moč ihned okyselit, v konečném objemu moči má být 5 % (objemových) kyseliny octové.

Dle uvedeného pracovního postupu se stanoví koncentrace kyseliny askorbové v moči jodometrickou titrací a vypočítá se množství kyseliny askorbové v naměřeném objemu moči ($M_r = 176,12$).

Vyhodnocení výsledku:

Organismus je saturován vitaminem C, vyloučí-li se během tříhodinové periody více než 50 mg kyseliny askorbové.

4.2 SEPARACE SMĚSI VITAMINŮ SKUPINY B GELOVOU CHROMATOGRAFIÍ

Úvod:

Biochemický význam vitaminů skupiny B:

Vitamin B₁ (thiamin), vitamin B₂ (riboflavin), vitamin B₃ (niacin), vitamin B₅ (kyselina pantothenová), vitamin B₆ (pyridoxin), vitamin B₇ (biotin), vitamin B₉ (kyselina listová), vitamin B₁₂ (kobalamin).

- *Vitamin B₁ (thiamin, aneurin)*
Biologicky aktivní formou thiaminu je koenzym thiamindifosfát (TDP). Thiamin je důležitý pro metabolismus glukózy a energetické zásobení nervových a svalových buněk. Je kofaktorem pro multienzymové komplexy (α -ketoglutarátdehydrogenázový, pyruvátdehydrogenázový, dehydrogenázy α -keto kyselin) a transketolázy (pentózový cyklus). Pro správnou činnost vyžadují TDP-dependentní enzymy také Mg²⁺ (nebo jiný divalentní kationt).
- *Vitamin B₂ (riboflavin)*
Metabolicky aktivní fosforylované formy riboflavinu v organismu jsou flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD). Riboflavin je nezbytný pro intermediární metabolismus sacharidů, aminokyselin a lipidů. Je rovněž nezbytným vitamínem pro některé oxidoredukční reakce, jako je např. přenos elektronů v dýchacím řetězci a rovněž podporuje antioxidační ochranu organismu.
- *Vitamin B₃ (niacin)*
Niacin (kyselina nikotinová nebo nikotinamid) má důležitou biologickou úlohu, neboť je prekurzorem oxidoredukčních koenzymů – nikotinamidadenindinukleotidu (NAD⁺) a nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADP⁺), které jsou redukčními ekvivalenty pro mnoho metabolických drah. Udává se, že niacin rovněž snižuje hladinu krevního cholesterolu a současně je používán v humánní medicíně při léčbě vysokého krevního tlaku.
- *Vitamin B₅ (kyselina pantothenová)*
Kyselina pantothenová (pantothenát) je hlavní součástí koenzymu A (CoA), který plní důležité metabolické funkce v metabolismu (acetyl-CoA, malonyl-CoA, sukcinyl-CoA, propionyl-CoA atd.) a rovněž při syntéze různých látek v metabolismu, např. aminokyselin, hemoglobinu, hormonů nebo acetylcholinu. Jako součást proteinu přenášející acyl (ACP) se rovněž účastní reakcí syntézy mastných kyselin.
- *Vitamin B₆ (pyridoxin)*
Vitamin B₆ je obecným názvem pro tři pyridinové deriváty pyridinu (pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin), které vykazují biologickou aktivitu. Účinnou formou je pyridoxalfosfát, jehož aldehydové skupiny jsou schopné reagovat s primárními aminoskupinami (např. aminokyselin), za vzniku Schiffových bází, a tak slouží jako důležitý kofaktor enzymů. Je rovněž nezbytný pro funkci řady enzymů, které katalyzují

metabolismus aminokyselin (transaminázy, dekarboxylázy) a rovněž se účastní glykogenolýzy (fosforylázy).

- *Vitamin B₇ (biotin)*

Z osmi možných stereoisomerů biotinu má biologickou aktivitu pouze D-biotin jako karboxybiotin. Biotin je důležitý pro metabolismus aminokyselin a mastných kyselin, je kofaktorem karboxyláz (pyruvátkarboxyláza, acetyl-CoA-karboxyláza, propionyl-CoA-karboxyláza) přičemž slouží jako přenašeč pro CO₂. Působí rovněž jako regulátor genové exprese.

- *Vitamin B₉ (kyselina listová)*

Kyselina listová (folát, folacin) je obecný název pro sloučeniny, které mají podobnou strukturu (obsahují pterin, kyselinu p-aminobenzoovou a glutamovou) a vykazují biologickou aktivitu kyseliny listové. Velký význam má zejména redukovaná forma – tetrahydrofolát a jeho možné deriváty. Folát, zejména jako tetrahydrofolát, se účastní mnoha reakcí metabolismu aminokyselin a nukleotidů. Je důležitý zejména pro biologické methylace (S-adenosylmethionin). V každé z těchto funkcí slouží jako akceptor nebo dárce jediné jednotky uhlíku a souhrnně se tyto reakce označují jako metabolismus jednou hlíkatých fragmentů. Spolu s vitamínem B₁₂ je kyselina listová nezbytná pro biosyntézu nukleových kyselin (DNA) a je důležitá pro buněčné dělení, zejména pro buňky s vysokou mitotickou aktivitou.

- *Vitamin B₁₂ (kobalamin)*

Vitamin B₁₂ je souhrnný název pro všechny korinoidy (tj. sloučenin obsahujících korinové jádro), které vykazují biologickou aktivitu. Kobalamin je jediná biogenní sloučenina, která obsahuje jinak vzácně se vyskytující kobalt. V metabolismu je kobalamin kofaktorem řady biochemických procesů. Podílí se zejména na krvetvorbě, vývoji centrální nervové soustavy v raném věku, přeměny homocysteinu, přeměny methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA, katabolizmu isoleucinu a valinu a na biosyntéze methioninu.

Chromatografie

Chromatografie je souhrnným označením pro separační metodiky používané k dělení směsi látek na základě jejich rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. Jednotlivé složky směsi rozpuštěné v mobilní (pohyblivé) fázi jsou při průchodu přes stacionární (zakotvenou) fázi v závislosti na svých fyzikálně-chemických vlastnostech v různé míře „zbrzděny“ a dochází tak k jejich rozdělení. Mobilní fáze může být kapalina či plyn, zatímco stacionární fáze je pevná látka (např. papír, Al₂O₃) nebo kapalina na pevném nosiči. Podle druhu mobilní fáze se chromatografické metody dělí na dva základní typy: kapalinovou a plynovou chromatografii.

Kapalinová chromatografie (LC; liquid chromatography):

K proudění mobilní fáze dochází za atmosférického tlaku, nízkého tlaku (FPLC; fast protein liquid chromatography) nebo vysokého tlaku (HPLC; high-performance liquid chromatography či high-pressure liquid chromatography), přičemž se vzrůstajícím tlakem roste rychlost separace směsi látek.

K rozdělení směsi na jednotlivé složky dochází podle charakteru stacionární a mobilní fáze na základě:

- 1) velikosti separovaných částic (kapalinová vylučovací chromatografie, gelová filtrace). Tento typ chromatografie je používán k separaci syntetických nebo biologických polymerů (proteinů, nukleových kyselin, polysacharidů). Stacionární fázi tvoří mikroskopické gelové kuličky (agarosa, polyakrylamid, dextran) o definované porozitě, umístěné v chromatografické koloně. Po nalití směsi látek do kolony pronikají do pórů stacionární fáze pouze molekuly menší než je velikost pórů, čímž se jejich průchod kolonou zdrží. Frakce jímáné po průchodu kolonou tak obsahují látky s postupně klesající velikostí molekuly, tj. kolonou nejrychleji prochází velké částice (srovnej s gelovou elektroforézou proteinů či nukleových kyselin!).
- 2) náboje částic (iontoměničová či iontová chromatografie). Ionty (kationty, anionty) či organické sloučeniny nesoucí elektrický náboj (proteiny, aminokyseliny, krátké oligonukleotidy) jsou děleny na základě interakce s opačně nabitou stacionární fází. Stacionární fáze je tvořena gelovými kuličkami (agarosa, celulóza) s kovalentně navázanými funkčními skupinami nesoucími záporný (katex) či kladný (anex) náboj. Navázané složky směsi mohou být následně ze stacionární fáze uvolněny např. promytím kolony roztokem obsahujícím ionty se shodným nábojem jako izolovaná látka, čímž dojde k jejímu vytěsnění. V klinické praxi je ionexová chromatografie užívána v diagnostice některých vrozených poruch metabolismu např. k identifikaci aminokyselin.
- 3) hydrofobicity (chromatografie na reverzní fázi). Tento typ chromatografie slouží k izolaci hydrofobních látek nesených hydrofilní mobilní fází. Stacionární fázi tvoří organické sloučeniny s alifatickým uhlíkovým řetězcem (C₄-C₁₈, s délkou řetězce narůstá jejich hydrofobní charakter). Navázané hydrofobní součásti dělené směsi látek jsou následně uvolněny promytím kolony organickým rozpouštědlem (methanol, acetonitril).

Úkol: Rozdělte směs vitaminů – riboflavinu ($M_r = 376$) a kyanokobalaminu ($M_r = 1355$) gelovou filtrační chromatografií na koloně Sephadexu G-25.

Teoretická příprava: Vitamin B₂ a vitamin B₁₂. Vitaminy ve funkci koenzymů (zkratky a názvy). Metabolismus kyseliny propionové (účast vit B₁₂), cyklus kyseliny citronové (účast vit B₂). Princip gelové chromatografie.

Činidla:

- směs vitaminů B₂ a B₁₂; před odebráním (nanášením) potřebného množství směs v reagenční lahvičce dobře protřepte!
 - fyziologický roztok – mobilní fáze
-

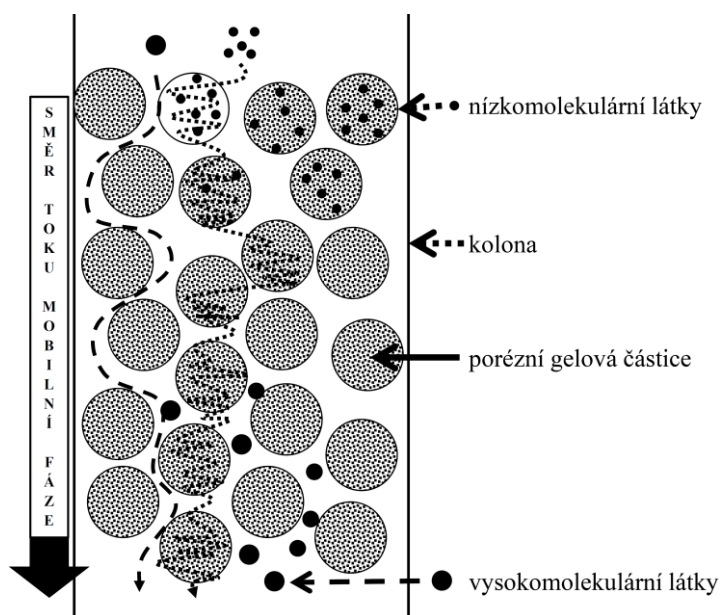
Přístroje a aparatury:

- chromatografická kolona s náplní Sephadexu G - 25
- UV lampa s komorou

Princip:

Směs analyzovaných látek se rozdělí gelovou filtrací při průtoku vrstvou gelu na jednotlivé analyty podle své velikosti a tvaru. Gelová zrna, na nichž dochází k dělení (*stacionární fáze*) jsou pórovitá. Analyty pronikající do pórů gelových zrn jsou v průběhu chromatografie zpožďovány a separovány od analytů, které jsou volně unášeny kapalinou (*mobilní fáze*) a obtékají gelová zrna. Jednotlivé složky směsi opouštějí sloupec gelu v pořadí podle klesající relativní molekulové hmotnosti. Tento princip dělení označujeme jako tzv. „efekt molekulového síta“. Protože je velikost látek přibližně úměrná jejich molekulové hmotnosti, lze gelovou filtrační chromatografií při použití vhodných standardů a vhodných typů Sephadexu přibližně stanovit molekulovou hmotnost neznámé látky.

Gelová chromatografie

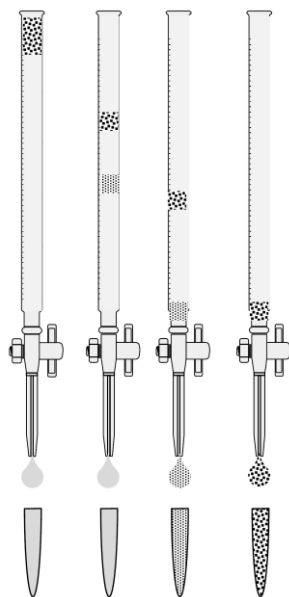


Gely Sephadex (výrobce Pharmacia, Švédsko) jsou tovární označení pro produkty vzniklé polymerací dextranových frakcí epichlorhydrinem. Různé typy jsou označeny písmenem G a číslem, které značí desetinásobek objemu vody, který nasaje 1 g gelu ve formě prášku při bobtnání (při laboratorní teplotě trvá bobtnání podle typu gelu 2 až 72 hodin). Dále se typy Sephadexu označují podle velikosti částic – Superfine (nejmenší částice), Fine, Medium, Coarse (největší částice). Sephadex G-25 je vhodný pro dělení směsí látek s molekulovou hmotností menší než 5 000.

Pracovní postup:

Směs vitaminů naneste na kolonu tak, že při uzavřeném výtoku z kolony vyjměte přívodní hadičku z rezervoáru a vložte ji do zkumavky s 0,5 ml analyzované směsi vitaminů. Po otevření výtoku kolony směs nasajte, přičemž se nesmí nasát do hadičky vzduch. Po uzavření výtoku kolony přendáte konec hadičky do zkumavky s cca 3 ml fyziologického roztoku. Po pomalém vysátí většiny roztoku se opět nesmí nasát vzduch. Uzavřete výtok z kolony a konec hadičky přendejte do rezervoáru a pokračujte v chromatografii. Od okamžiku nátoky směsi na gel jímejte vytékající roztok do kádinky. **Eluát musí odkapávat velmi pomalu tj. průtok kolem 1 ml/min (rozdělování neuspěchejte !!)** a nesmí docházet ke stlačování gelu (požádejte o kontrolu dohlížející personál). Při rychlém postupu mobilní fáze kolonou nedojde k výraznému rozdělení obou vitaminů ze směsi (opticky sledujte zbarvení první vitaminové frakce a tehdy průtok zpomalte). Jakmile frakce kyanokobalaminu téměř dosáhne spodního konce kolony (asi 3 cm) začněte nyní už rychle jímat frakce po cca 4 ml až do výtoku poslední zbarvené frakce z kolony. Pořadí vytékajících frakcí: 1.kyanokobalamin (růžová), 2.riboflavin (žlutá, fluorescence žlutozelená). Absorbanci kyanokobalaminu v jednotlivých frakcích stanovte fotometricky při 548 nm, intenzitu fluorescence riboflavinu vyhodnoťte pomocí UV lampy (k vyhodnocení použijte křížky #, # #, # # #).

Rozdělení směsi vitaminů a postupné jímání fází do zkumavek:



Maximum absorbance pro danou látku určuje její eluční objem V_e , který je dán množstvím eluátu od okamžiku nátoku směsi na gel až po eluované maximum látky.

Grafické zpracování výsledků:

Nakreslete eluční diagram (osa x eluční objemy v ml, na osu y vyznačte intenzitu zbarvení = změřená absorbance na Speckolu pro vitamin B_{12} a intenzitu fluorescence pro vitamin B_2 vyhodnocenou na křížky).

5 AMINOKYSELINY

5.1 CHROMATOGRAFICKÉ DĚLENÍ SMĚSI AMINOKYSELIN NA TENKÉ VRSTVĚ ALUFOLU

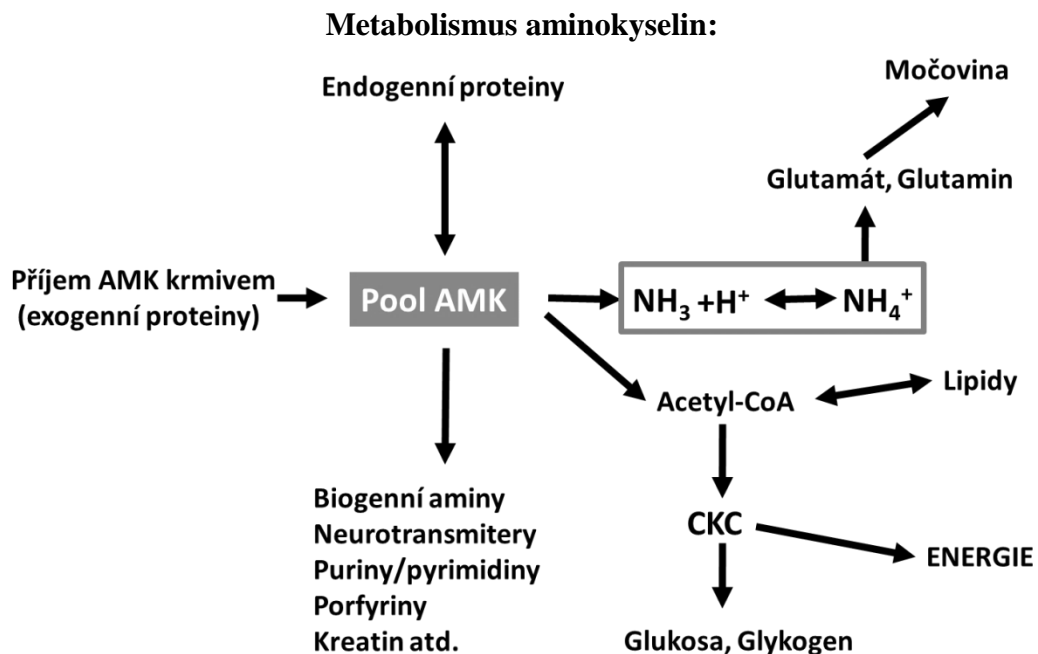
Úvod:

Postavení a význam AMK v metabolismu:

- ✓ Stavebními kameny proteinů (ve svalu se 10% AK denně rozloží a znovu syntetizuje)
- ✓ Energetickým substrátem pro specifické tkáně a buňky (Glutamin pro enterocyty a lymfocyty)
- ✓ Substrátem pro glukoneogenezi za hladovění (Alanin, Glutamin – glukogenní AMK)
- ✓ Některé jsou základem pro syntézu jiných důležitých a funkčních molekul (Tyr → adrenalin a noradrenalin, His → histamin, Gly → hem)

Katabolismus AMK odbourávání proteinů:

- ✓ trávicí enzymy
- ✓ proteiny z odloučených buněk GIT
- ✓ degradace svalových proteinů
- ✓ degradace hemoglobinu
- ✓ intracelulární poškozené proteiny



Základní reakce AMK

- Transaminace
- Dekarboxylace
- Deaminace

Transaminace:

- ✓ výměna $-NH_2$ mezi aminokyselinou a α -ketokyselinou.
- ✓ reakce jsou katalyzovány transaminázami (aminotransferázami)
- ✓ většina z nich vyžaduje α -ketoglutarát jako akceptor $-NH_2$ skupiny

Dekarboxylace

- ✓ vznikají primární (biogenní) aminy
- ✓ enzymy dekarboxylázy
 - a) dekarboxylace His \rightarrow histamin
 - b) dekarboxylace Trp \rightarrow serotonin
 - c) dekarboxylace Tyr \rightarrow adrenalin a noradrenalin
 - d) dekarboxylace Glu \rightarrow GABA (γ -aminobutyrát)

Deaminace

- ✓ (oxidativní deaminace)
- ✓ Glu \rightarrow α -ketoglutarát, enzym glutamátdehydrogenáza

Zdroje amoniaku:

- ✓ katabolismus AMK odbourávání proteinů:
- ✓ trávicí enzymy
- ✓ proteiny z odloučených buněk GIT
- ✓ degradace svalových proteinů
- ✓ degradace hemoglobinu
- ✓ intracelulární poškozené proteiny

Detoxikace amoniaku:

- ✓ odstranění aminoskupiny + napojení na transportní formy
- ✓ transport do jater
- ✓ vstup do mitochondrie
- ✓ močovinový cyklus
- ✓ močovina krví do ledvin

Transportní formy amoniaku:

- ✓ Glutamát – přenos aminoskupiny uvnitř buněk: transaminasa \rightarrow přenos aminoskupiny na α -ketoglutarát \rightarrow glutamátu Glutamátdehydrogenáza \rightarrow opačná reakce
- ✓ Glutamin přenos 2 aminoskupin mezi buňkami \rightarrow uvolní je v játrech
- ✓ Alanin – přenos aminoskupinu ze tkání (svalů) do jater

- ✓ Močovina – viz močovinový cyklus

Toxicita amoniaku

- ✓ pro CNS (jaterní ecefalopatie)
- ✓ Amoniak reaguje s α -ketoglutarátem → snižuje dostupnost pro CKC (klesá ATP)
- ✓ Vysoká koncentrace amoniaku stimuluje glutaminsyntázu → vzniká glutamin (excitační neurotransmitter) → snížení dostupnosti glutamátu pro syntézu GABA (inhibiční neurotransmitter)

SHRNUTÍ METABOLIZMU AMK

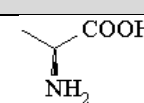
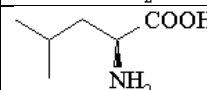
- ✓ proteiny savců se z velké části skládají z 20 běžných aminokyselin
- ✓ při fyziologickém pH většina aminokyselin existují ve formě obojetných iontů
- ✓ hydrofilní aminokyseliny se nacházejí na povrchu proteinů
- ✓ hydrofobní aminokyseliny jsou umístěny v interiéru proteinů
- ✓ cystin kovalentně spojuje různé regiony polypeptidových řetězců disulfidickou vazbou (-S-S-)
- ✓ většině savčích proteinů je forma L-aminokyselin
- ✓ hydroxyprolin a hydroxylysin jsou potřebné pro tvorbu kolagenu
- ✓ taurin je esenciální aminokyselina pro kočky
- ✓ GABA je hlavním inhibičním neurotransmiterem v mozku
- ✓ fenylalanin je potřebný pro tvorbu tyrosin v játrech
- ✓ většina neesenciálních aminokyselin mohou být navzájem přeměněny z metabolismu sacharidů transaminací

Úkol: Rozdělte jednotlivé aminokyseliny a jejich směs pomocí rozdělovací chromatografie na tenké vrstvě ALUGRAMU. Detekujte rozdělené komponenty roztokem ninhydrinu a vypočítejte hodnoty R_f . Porovnejte hodnoty R_f navzájem.

Princip:

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) používá pro dělení směsi látek tenké vrstvy sorbentu (silikagelu - stacionární fáze) nanesené na vhodném podkladu – skleněné desce, tenké fólii hliníku, speciálně preparovaném papíře ev. plastické hmotě. Dělená směs látek se nanáší na start kapilárou. Jednotlivé složky směsi se pohybují s mobilní fází (směs rozpouštědel) podle absorpčních koeficientů a rozdělovacích konstant (ev. relativní molekulové hmotnosti nebo náboje). Dráha, kterou jednotlivá složka urazí, je charakterizována hodnotou R_f (rozdělovací koeficient = poměr vzdálenosti středu skvrny látky od startu ke vzdálenosti čela mobilní fáze /rozpouštědla/ od startu). Vzhledem k tomu, že hodnota R_f je v dané mobilní fázi za stejných podmínek (teploty, tloušťky vrstvy, druhu absorbentu) přibližně konstantní, umožňuje identifikaci rozdělených složek směsi.

Rozdělovací koeficient je vždy menší než 1,00. Je charakteristickou veličinou pro každou látku v dané rozpouštědlové soustavě.

Aminokyselina	R_f silikagel	Molární hmotnost	Struktura
Alanin	0,30	89,09	
Leucin	0,61	131,18	

Činidla:

- roztoky jednotlivých aminokyselin – alanin a leucin. S roztoky aminokyselin v reagenčních lahvičkách před upotřebením NEMÍCHEJTE!!!
- modelová směs aminokyselin
- mobilní fáze n – butanol: kyselina octová:voda (4:1:1)
- ninhydrinové činidlo: 0,110 mol/l (1%) ethanolový roztok ninhydrinu

K analýze použijte připravená činidla, modelovou směs aminokyselin a roztoky jednotlivých aminokyselin (alanin a leucin).

Pracovní postup:

Chromatografické desky uchopte do rukou za hrany nebo lépe pinzetou tak, abyste nepoškodili souvislost tenké vrstvy. Zásadně se povrchu nedotýkejte prsty (pot obsahuje aminokyseliny)! Chromatografické desky jsou přechovávány v suchých obalech. Na desce označte lehce tužkou START ve výšce 2 cm od spodního okraje desky a tři místa pro aplikaci aminokyselin v pravidelných vzdálenostech od sebe. Při vyvíjení nesmějí být místa startů ponořena do vyvíjecí soustavy. Na starty naneste umělohmotnou špičkou roztoky jednotlivých aminokyselin (standarty alaninu a leucinu) a analyzované modelové směsi obou

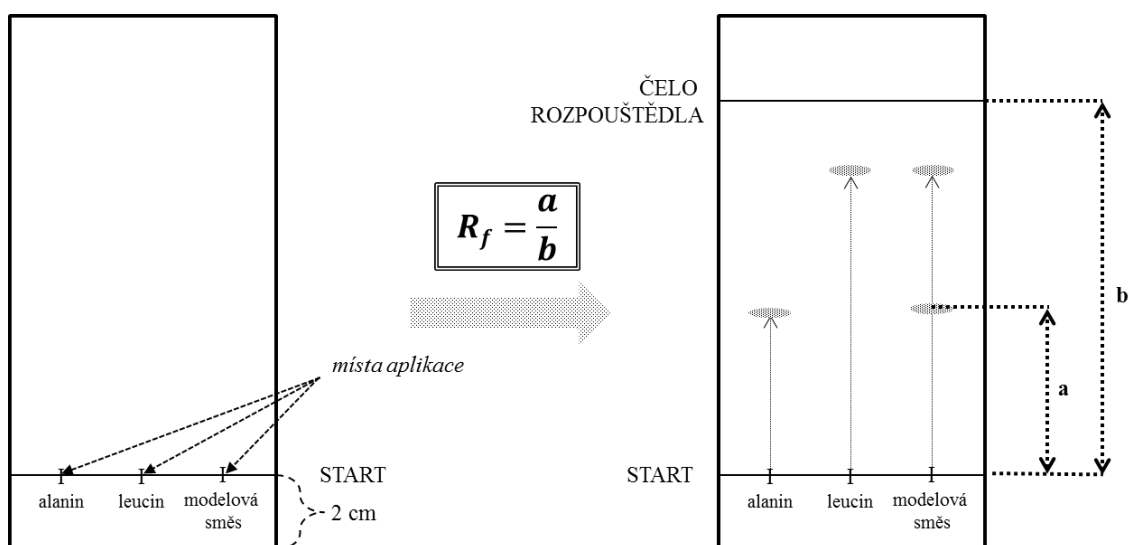
aminokyselin (asi 2 μ l). Při nanášení neporušte tenkou vrstvu alufolu. Průměr skvrn by měl být maximálně 3 mm. Nanášejte postupně, skvrnu vždy nechte vysušit a teprve pak naneste další podíl vzorku (citlivé místo metody - silně ovlivňuje výsledek). Po důkladném zaschnutí skvrn při laboratorní teplotě, vložte desku kolmo do chromatografické komory s mobilní fází tak, aby dolní okraj sorbentu zasahoval do rozpouštědla, ale starty musí zůstat nad hladinou. Komoru dobře uzavřete. Jakmile mobilní fáze dosáhne 2 cm pod horní okraj desky, desku vyjměte z komory, tužkou označte čelo rozpouštědla a usušte při laboratorní teplotě. Poté postříkejte roztokem ninhydrinu (s rozprašovačem pracujte v digestoři a v rukavicích), usušte chromatogram asi 3 min. nad ploténkou. **POZOR! Nespálit!** Aminokyseliny se objeví jako fialověčervené skvrny na bílém pozadí. Skvrny lehce tužkou obtáhněte a vyznačte jejich střed vertikálními a horizontálními úsečkami. Po změření vzdálenosti vypočtete jednotlivé hodnoty R_f .

Poznámka:

Pro výpočet R_f použijte shodné jednotky (mm; cm).

Při práci používejte rukavice!

Aplikace aminokyselin a vyhodnocení vzorků na TLC:



6 SEMINÁRNÍ CVIČENÍ

6.1 BIOLOGICKÉ MATERIÁLY

Biologickým materiálem se rozumí všechny tělní tekutiny a exkrementy, které můžeme podrobit biochemické analýze.

Krev – biologický materiál

Krev je významným biologickým materiálem k biochemickým analýzám. Významné jsou její funkce transportní, podíl na udržování homeostázy, obranyschopnosti organismu a zabezpečení srážení krve. V oblasti transportu jde o kyslík a oxid uhličitý, kdy probíhá výměna látek mezi jednotlivými orgány a dále odstraňování produktů metabolismu do plic, ledvin a jater. Významná je úloha při transportu hormonů, které se následně uplatní v rámci neurohumorální regulace (Koolman, Röhm, 2012).

Krev se skládá z buněk (**erytrocyty, leukocyty, trombocyty** – červené krvinky, bílé krvinky a krevní destičky) a dále z **krevní plazmy**, což je vodný roztok elektrolytů, minerálních látek, živin, metabolitů, bílkovin, vitaminů, stopových prvků a signálních látek. Krevní plazmu tvoří zejména 90% vody, 7% plazmatických proteinů, 2% hormonů (zahrnující i enzymy, vitaminy a podíl glukosy) a podíl 1% tvoří další uvedené látky.

Vedle krevní plazmy je **krevní sérum**, které se od plazmy liší nepřítomností fibrinogenu a dalších srážecích proteinů. Z metabolitů se jedná o zastoupení glukózy, lipidů, cholesterolu, triacylglycerolů a dále laktátu, pyruvátu, močoviny, kyseliny močové, kreatininu, aminokyselin a amoniaku (Koolman, Röhm, 2012).

Samostatnou část tvoří **získávání krevní plazmy a krevního séra** jako biologického materiálu k vlastní biochemické analýze. Krevní plazma se získává z plné krve, kdy se zabrání srážení vazbou na antikoagulační látky, tj. heparin, citrát, EDTA (kyselina etyléndiamintetraoctová). Při získávání krevního séra po proběhlé hemokoagulaci vzniká sraženina a část v tekutém stavu je krevní sérum.

Je definován i tzv. **fyzilogický roztok**, což je roztok NaCl (chloridu sodného) v koncentraci 0,9% nebo $0,154 \text{ mol.l}^{-1}$.

Krev, krevní plazma a krevní sérum slouží jako biologický materiál k řadě biochemických analýz.

Z dalších biologických materiálů se k vyšetření používá moč, sliny, žaludeční sekret, bачorová tekutina, duodenální obsah, plodová voda a mozkomíšní mok.

Cílem biochemických vyšetření biologických materiálů je diagnostika nebo prevence, zejména ve větších chovech zvířat zájmových (např. chovné stanice, apod.) a hospodářských. Z praktických příkladů se může jednat o eliminaci stresové zátěže, posouzení symptomů zdravotního stavu s cílem terapie nebo provedení potřebných opatření v oblasti výživy, pohody zvířat, apod.

6.2 LYONORM – KONTROLNÍ SÉRUM

Lyonorm je kontrolní sérum založené na séru porcinním, pro klinickou biochemii obohacené o elektrolyty, substráty a enzymy. Ke každému je přiložen atest, jehož číslo musí souhlasit s číslem šarže na lahvičce kontrolního séra. Uvádí se atestovaná hodnota a rozptyl analýz, které jsou vypočteny s použitím statistických metod z výsledků analýz prováděných v 50 laboratořích v ČR a SR standardizovanými nebo nejčastěji užívanými metodami.

Kontrolní séra je nutné skladovat v temnu a v chladu při teplotách pod +8°C. Dodávají se v lyofilizované formě a ředí se k použití redestilovanou vodou v objemu 3 ml.

Součástí je písemný materiál, který uvádí rozmezí hodnot jednotlivých parametrů biochemické analýzy krevního séra.

Poznámka:

Výsledky stanovení Lyonormu slouží pro kontrolu pracovního postupu, zahrnující jak vlastní práci v laboratoři, tak i čistotu a správnost zvolených chemikálií. Pokud je výsledek v rozmezí, které udává výrobce, výsledek, respektive celé měření, je správný a to i bez ohledu na to, jestli je nebo není ve fyziologickém rozmezí. V opačném případě je výsledek nesprávný, i když leží ve fyziologickém rozmezí.

7 GLYCIDY

7.1 ENZYMOVÉ STANOVENÍ GLUKOSY V KREVNÍM SÉRU

Úvod:

Běžná koncentrace glukózy v plazmě monogastrických zvířat na lačno je asi 4-8 mmol.l⁻¹, zatímco u přežvýkavců 3-5 mmol.l⁻¹. Měření glukózy v krevní plazmě či séru má specifický požadavek na vzorek – krev musí být odebrána do zkumavek obsahujících fluorid sodný, který blokuje glykolýzu v červených krvinkách, čímž se zabrání spotřeba glukózy ve vzorku. Nicméně, fluorid sodný v plazmě nemusí být vhodný pro některé další analýzy (např. stanovení inzulínu). *Glykémie* (hladina glukózy v krvi) je nezbytná pro normální funkci zejména mozku a všech dalších.

Glukóza v plazmě může pocházet z celé řady zdrojů, v závislosti na aktuálním stavu metabolismu sacharidů. V postabsorpční fázi je glukóza transportována z místa absorpce ve střevech na místa syntézy a ukládání glykogenu, hlavně v játrech a ve svalech. Nalačno je v plazmě koncentrace glukózy udržována pomocí mobilizace sacharidů z libovolného místa. Nejprve převládá glykogenolýza z jater a svalů, dále navazuje glukoneogeneze a lipolýza. Pokud hladovění pokračuje, prodlužuje se lipolýza a nakonec se aktivuje také proteolýza a glukoneogeneze ze získaných aminokyselin.

Velmi důležitá je komplexní a těsná zpětná vazba v hormonální kontrole, která zajišťuje dostatečně konstantní koncentrace glukózy v plazmě bez ohledu na to, jaký je současný stav organismu (postprandiálně či v době hladovění). Při běžné regulaci poptávek organismu na glukózu se uplatňuje glukagon a růstový hormon, zatímco v abnormálních stavech a situacích (dlouhodobé hladovění nebo stres) jsou obzvláště důležité glukokortikoidy a adrenalin. Na rozdíl od předchozích, inzulín snižuje koncentraci glukózy v plazmě. Zatímco přechodná hyperglykémie (postprandiálně) je docela běžný stav, hypoglykémie je potenciálně život ohrožující.

Ke stanovení glukózy v séru nebo krvi jsou používány různé enzymatické metody. Použít lze četné kvantitativní či polokvantitativní metody, nebo metody mokré a suché chemie. Lepší než stanovení glukózy z plné krve je její stanovení z plazmy či ze séra, které nejsou, na rozdíl od stanovení z plné krve, závislé na hematokritu. V případě metod suché chemie, kdy je většinou používána plná krev, jsou stanovované hodnoty nepřesné v důsledku stoupajícího hematokritu. Uvádí se, že hodnoty glukózy stanovené ze séra nebo plazmy jsou vždy vyšší než z plné krve.

Úkol: Stanovte koncentraci glukosy v krevním séru (glykemie).

Princip: Stanovení glukosy je založeno na enzymové reakci. Enzym glukosaoxidasa katalyzuje oxidaci glukosy kyslíkem za vzniku laktonu glukonové kyseliny a peroxidu vodíku. Vzniklý peroxid vodíku se ihned stává substrátem v navazující reakci katalyzované peroxidasou je oxidačně kopulován na červeně zbarvený produkt.

Činidla:

- standard: Solunorm GLUKOSA (SONO G1, G2) s uvedenou aktuální koncentrací (5 nebo 10 mmol/l)
- **glukosové činidlo, které již máte připraveno** z činidla 1 a činidla 2.
(činidlo 1: peroxidasa > 3,30 μ kat, glukosaoxidasa > 60,0 μ kat, 4-aminoantipyrin 0,245 mmol / lahvička;
činidlo 2 : pufr chromogen (fosforečnanový pufr 0,14 mol/l; 3-methyl-fenol 10 mmol/l)

K analýze použijte připravená činidla a krevní sérum.

Postup:

Pipetujte do krátkých odstředivkových zkumavek činidla dle tabulky:

Činidla, vzorky	Zkumavky:		
	Vzorek 2x	Standard 1x	Slepý vzorek 1x
Glukosové činidlo (ml)	1,0	1,0	1,0
Krevní sérum (ml)	0,01	-	-
Deionizovaná voda (ml)	-	-	0,01
Standard (SONO) (ml)	-	0,01	-

Obsah každé zkumavky dobře protřepejte (nasyčení kyslíkem). Vzniklou reakční směs je nutno chránit před světlem. Zkumavky dejte ihned po napipetování inkubovat (15 minut, 37 °C). Po inkubaci nejpozději do 60 minut změřte absorbanci vzorku (A_{VZ}), slepého vzorku (A_{SV}) a standardu (A_{ST}) v kyvetě při vlnové délce 492 proti deionizované vodě.

Výpočet:

Koncentrace glukosy ve vzorku vypočtete ze vztahu:

$$\text{Koncentrace glukosy (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{VZ} - A_{SV})}{(A_{ST} - A_{SV})} \times c_{ST}$$

c_{ST} – tj. koncentrace standardu (uvedena na lahvičce roztoku standardu)

SOUHRN

Hypoglykémie

- ✓ insuficience jater (cirhóza), bakteriální sepse
- ✓ insulinom (nádor β -buněk pankreatu)
- ✓ protražované hladovění
- ✓ intoxikace
- ✓ hyperinzulinismus, inzulinem nebo iatrogenní
- ✓ renální glykosurie (pes)
- ✓ otrava žaludy (skot)
- ✓ eperythrozoonóza (prase)
- ✓ těžké hepatopatie, jaterní cirhóza
- ✓ hypoglykemický syndrom štěňat trpasličích plemen psů
- ✓ komplex hypoglykemie-hypotermie u novorozených telat a jehňat
- ✓ hypoglykemie sajících selat
- ✓ hypothyreóza
- ✓ Addisonova choroba
- ✓ ketóza u přežvýkavců

Hyperglykémie

- ✓ terapie glukokortikoidy,
- ✓ diabetes mellitus
- ✓ postprandiálně (kašovitá potrava)
- ✓ akromegalie (kočka)
- ✓ diestrus (fena)
- ✓ zánět pankreatu
- ✓ progestageny
- ✓ insuficience ledvin
- ✓ stresové situace (obzvláště u koček extrémně vysoké hodnoty)
- ✓ Cushingův syndróm
- ✓ hypertyreóza
- ✓ onemocnění mozku
- ✓ křečové stavy
- ✓ postprandiální
- ✓ iatrogenní:
 - infuze glukózy
 - glukokortikoidy
 - ACTH
 - gestagen
 - morfin
 - adrenalin

7.2 SESTROJENÍ GLYKEMICKÉ KŘIVKY MODELOVÝCH VZORKŮ KREVNÍHO SÉRA

Úkol: Stanovte koncentraci glukózy v modelových vzorcích krevního séra

Princip: Stejným principem jako v předchozí části A) se stanoví koncentrace glukózy v modelových vzorcích, které představují krevní sérum psa odebrané v čase 0 min (před podáním glukosy) a pak za 15, 30, 45 a 60 minut po intravenózním podání glukosy.

Činidla:

- standard: Solunorm GLUKOSA (SONO G1, G2) s uvedenou aktuální koncentrací (5 nebo 10 mmol.l⁻¹)
- glukosové činidlo, které již máte připraveno z činidla 1 a činidla 2.
(činidlo 1: peroxidasa > 3,30 μkat, glukosaoxidasa > 60,0 μkat, 4-aminoantipyrin 0,245 mmol.l⁻¹ lahvička; činidlo 2 : pufr chromogen (fosforečnanový pufr 0,14 mol.l⁻¹; 3-methyl-fenol 10 mmol.l⁻¹)

K analýze použijte připravená činidla a sadu modelových roztoků glukózy v deionizované vodě odpovídající glykemii jedince v čase 0 (před podáním glukózy) a za 15, 30, 45 a 60 min po podání glukózy.

Pracovní postup:

Pipetujte z modelových vzorků do odstředivkových zkumavek dle schématu tabulky:

Činidla, vzorky:	Zkumavky:						
	Slepý vzorek (1x)	Standard (1x)	Vzorek 1 (0 min) (1x)	Vzorek 2 (15 min) (1x)	Vzorek 3 (30 min) (1x)	Vzorek 4 (45 min) (1x)	Vzorek 5 (60 min) (1x)
Glukosové činidlo (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Deionizovaná voda (ml)	0,01	-	-	-	-	-	-
Standard (SONO) (ml)	-	0,01	-	-	-	-	-
Roztok (0 min) (ml)	-	-	0,01	-	-	-	-
Roztok (15 min) (ml)	-	-	-	0,01	-	-	-
Roztok (30 min) (ml)	-	-	-	-	0,01	-	-
Roztok (45 min) (ml)	-	-	-	-	-	0,01	-
Roztok (60 min) (ml)	-	-	-	-	-	-	0,01

Obsah každé zkumavky dobře protřepejte (nasyčení kyslíkem). Vzniklou reakční směs je nutno chránit před světlem. Zkumavky dejte ihned po napipetování inkubovat (15 minut, 37 °C). Po inkubaci nejpozději do 60 minut změřte absorbanci vzorku (A_{VZ}), slepého vzorku (A_{SV}) a standardu (A_{ST}) v kyvetě při vlnové délce 492 proti deionizované vodě.

Výpočet: Proved'te stejně jako v případě úlohy A).

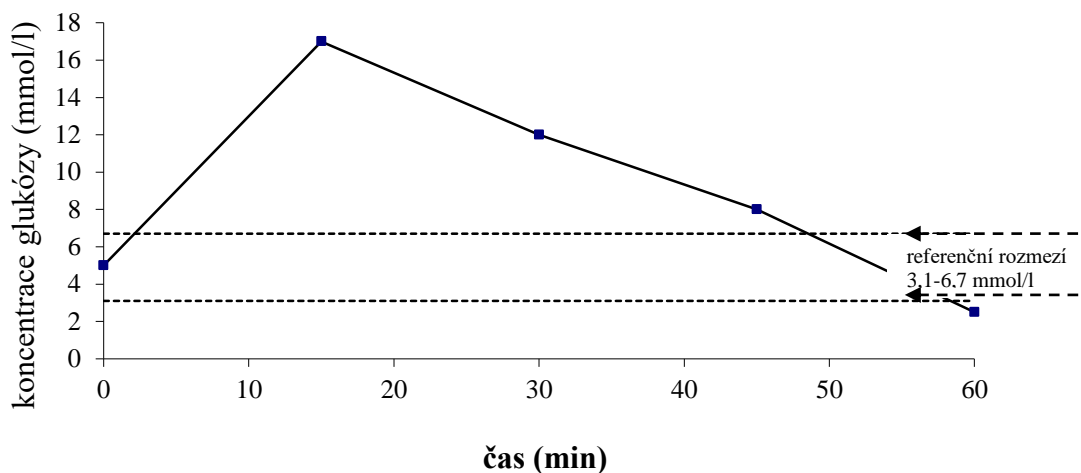
Sestrojení glykemické křivky:

U grafického sestrojení nanášíte na osu x časové intervaly v minutách dle modelových vzorků a na osu y příslušné vypočtené koncentrace glukosy v mmol/l. Na základě průběhu křivky zjistíte, zda modelový vzorek odpovídá průběhu glykémie u zdravého nebo nemocného jedince.

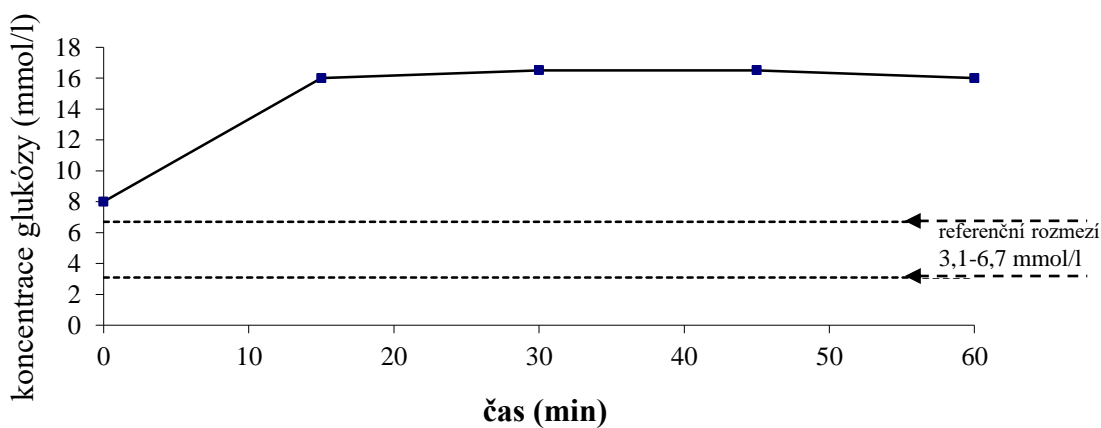
Vyhodnocení:

Pro vyhodnocení křivky použijte následující teoretický doplněk. Testem tolerance glukosy lze odlišit diabetického jedince od zdravého. U zvířat se aplikuje glukosa intravenózně. Ke stanovení křivky lze použít krev, krevní sérum nebo krevní plazmu. Na obr. 1 je uveden příklad glykemické křivky u zdravého psa a na obr. 2 u diabetického psa.

Obr. 1: Glykemická křivka zdravého psa



Obr. 2: Glykemická křivka diabetického psa



Komentář k obrázkům: Během prvních 15 minut (2. odběr) by měla hladina glukosy poklesnout na 15 – 18 mmol/l a za 45 min od aplikace glukosy (3. odběr) by se měla vrátit do fyziologického rozmezí.

Význam stanovení glykémie při poruchách intermediárního metabolismu je jednorázové stanovení glukosy základním vyšetřením. Např. při diabetes mellitus je hyperglykémie projevem nedostatečného regulačního vlivu insulinu. Hypoglykémie bývá důsledkem vyčerpání energetických rezerv (např. u novorozenců bez časného napití kolostra, při prochlazení). Testem tolerance glukosy lze odlišit diabetického jedince od zdravého.

Poznámka:

Křivka je sestavena z modelových vzorků, které pro potřeby cvičení jsou záměrně upraveny. Sekundární kontaminace nesterilními špičkami představuje půdu pro činnost mikroorganismů z prostředí s následkem postupného úbytku glukosy v médiu.

8 LIPIDY, STEROLY

8.1 KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CELKOVÉHO CHOLESTEROLU V KREVNÍM SÉRU.

Úvod:

- ✓ cholesterol je produktem metabolismu zvířat
- ✓ žluč je hlavní cestou pro vylučování cholesterolu z těla
- ✓ Acetyl-CoA je zdrojem všech atomů uhlíku v cholesterolu
- ✓ HMG-CoA-reduktáza je enzym limitující rychlost biosyntézy cholesterolu
 - glukagon a kortizol - hormony typicky zvýšené během hladovění, zabránit jaterní biosyntéze cholesterolu
 - inzulín a hormony štítné žlázy mají tendenci ke zvýšení jaterních biosyntéze cholesterolu
- ✓ játra syntetizují nejvíce cholesterolu

Úkol: Proveďte stanovení celkového cholesterolu v krevním séru.

Teoretická příprava: Biosyntéza cholesterolu. Přeměna cholesterolu na speciální produkty. Lipoproteiny přenášející cholesterol. Aldosteron a renin-angiotensinový systém (RAA systém).

Princip:

Cholesterol reaguje s acetanhydridem a kyselinou sírovou za vzniku zeleně zbarvené sloučeniny. Interferenci bílkovin potlačuje kyselina 2,5-dimethylbenzensulfonová.

Činidla:

- **čínidlo 1 :** standardní roztok cholesterolu 5,17 mmol/l, kyselina octová 17,5 mol/l
!POZOR! ŽÍRAVINA ! hořlavá kapalina II.třídy nebezpečnosti!
- **čínidlo 2 :** acetanhydrid 6,5 mol/l, kyselina octová 7 mol/l,
kys. 2,5-dimethylbenzensulfonová 0,05 mol/l
!POZOR! ŽÍRAVINA ! hořlavá kapalina II.třídy nebezpečnosti!
- **čínidlo 3 :** koncentrovaná kyselina sírová **! POZOR ! ŽÍRAVINA!**

!!! VAROVÁNÍ !!!

Před začátkem práce použijte ochranné brýle!!! Nebezpečí vystříknutí žiravin!!!

Dodržujte chlazení zkumavek ve studené vodní lázni!!!

Pracovní postup :

Vzorek krevního séra, standardní vzorek a slepý vzorek napipetujeme do suchých, čistých, vysokých zkumavek dle následující tabulky:

Činidla [ml]	Vzorek 2x	Standard 2x	Slepý vzorek 1x
Sérum	0,05	-	-
Čínidlo 1 – Standard	-	0,05	-
Deionizovaná voda	-	-	0,05
Čínidlo 2 Acetanhydrid	1,5	1,5	1,5
Promíchá se a temperuje se 5 minut ve studené vodní lázni (voda z vodovodu ± 10-20 °C) – dodržet !!! Hrozí vystříknutí obsahu zkumavek a poleptání očí.			
Čínidlo 3 konc. H ₂ SO ₄	0,3	0,3	0,3

Promíchá se a temperuje 10 minut ve vodní lázni se **studenou vodou!!!** Při vlnové délce **575 nm** se změří absorbance vzorků (A_{VZ}), standardů (A_{ST}) a slepého vzorku (A_{SV}) proti deionizované vodě. Měření je nutno provést do 45 minut po ochlazení. Při výpočtu odečítejte hodnotu slepého vzorku od naměřených hodnot vzorků a standardů!

Výpočet:

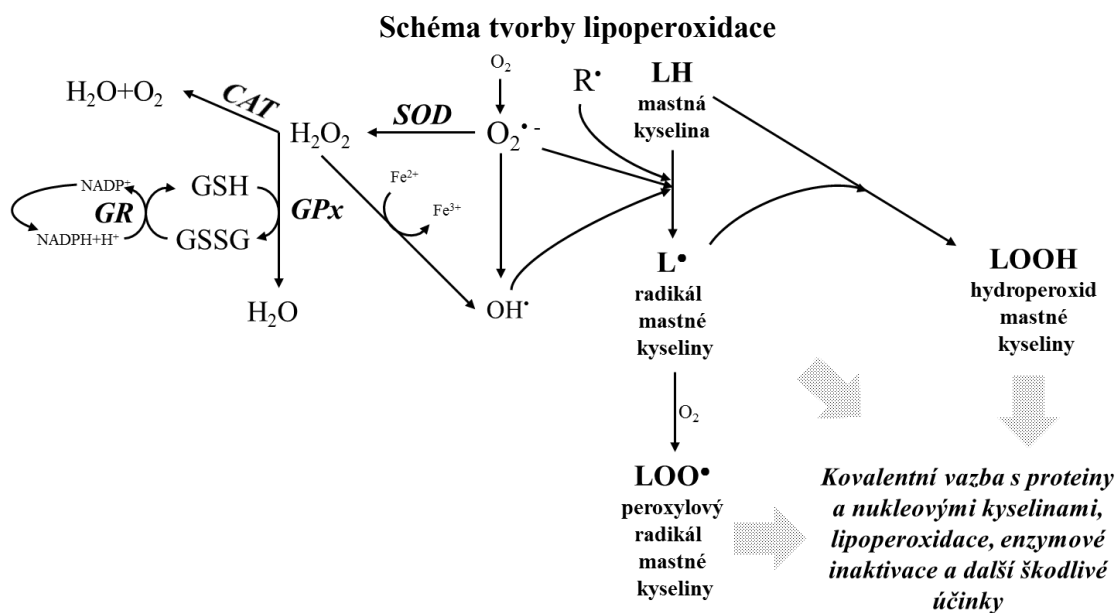
$$\text{Koncentrace cholesterolu (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{Vz} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

c_{St} je koncentrace standardu cholesterolu (5,17 mmol/l)

8.2 KVALITATIVNÍ PRŮKAZ LIPOPEROXIDACE V OLEJÍCH

Úvod:

Lipoperoxidace je destruktivní proces úzce spjatý s oxidativním stresem v biologických systémech. Oxidativní stres je výsledkem nerovnováhy produkce a eliminace volných radikálů ve prospěch jejich produkce. Tvoří tak významnou oblast biochemie potravin, obecné a klinické biochemie. Jde o proces související s volnými radikály, které jsou velmi reaktivní a iniciují peroxidaci lipidů. Útočí na biomolekuly, jako jsou lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a způsobují jejich oxidační poškození, narušují funkčnost buněčných mechanismů, poškozují buněčné membrány a mohou vyústit až v zánik buňky. Tento proces urychluje stárnutí a způsobují poškození organismu, které může indukovat závažná onemocnění. Proces lipoperoxidace je radikálová řetězová reakce, která nejvíce zasahuje polynenasycené mastné kyseliny lipidů a sloučenin lipofilního charakteru. Z nich po útoku radikálů vznikají lipoperoxylové radikály. Primárními produkty lipoperoxidace jsou hydroperoxydy, jež podléhají dalším přeměnám za vzniku sekundárních produktů – hydroxyaldehydů (zejména malondialdehyd), které jsou velmi reaktivní a pro organismus toxické. Enzymové a neenzymové antioxidanty tvoří významné složky ochrany buněk a celého organismu proti volným radikálům a působení oxidativního stresu.



Úkol: Proved'te kvalitativní průkaz lipoperoxidace v olejích.

Princip:

Malondialdehyd (MDA) představuje potenciálně rizikovou látku v potravinách připravených za vysoké teploty. Představuje sekundární produkt peroxidace polynenasycených mastných kyselin esterifikovaných ve fosfolipidech. Pozitivním výsledkem důkazu je vznik růžového zbarvení.

Činidla:

- ✓ činidlo TBA (kyselina 2-thiobarbiturová c = 0,029 mol/l v kyselině octové c = 2,19 mol/l)
 - ✓ modelové vzorky: rostlinné oleje (čerstvý – č. 1 a žluklý – č. 2)
-

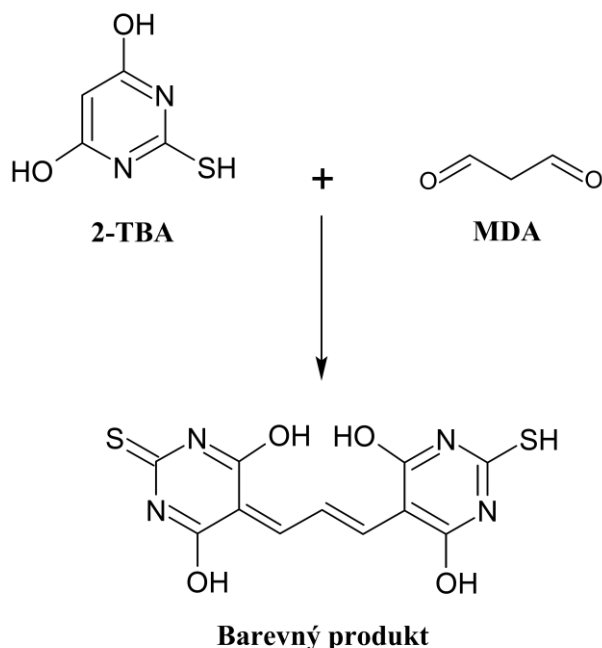
Pracovní postup:

Do dvou připravených zkumavek odměříme 2 ml vody. Pak do první zkumavky přidáme 5 kapek čerstvého oleje (č. 1), do druhé zkumavky žluklý olej (č. 2). Protřepeme a do každé zkumavky odměříme 0,5 ml činidla kyseliny 2-thiobarbiturové (TBA). Zkumavky důkladně promícháme a ve vroucí vodní lázni (kádinka nad plynovým kahanem se sítkou) zahříváme zakryté alobalovou fólií po dobu 10 min. Přibližně po 5 min se začne vyvíjet **růžové zbarvení**.

Vyhodnocení:

Podle intenzity růžového zbarvení vyhodnotíme přítomnost malondialdehydu v jednotlivých vzorcích olejů na křížky #, ##, ###.

Reakce tvorby barevného aduktu malondialdehydu s kyselinou 2-thiobarbiturovou:



9 ENZYMY I.

Úvod:

Využití enzymů ve veterinární medicíně:

- ✓ indikátory patologického stavu
- ✓ při poškození buněk se zvyšuje aktivita intracelulárních enzymů v extracelulární tekutině
- ✓ analytická činidla v klinické biochemii
- ✓ léčiva

Klinická enzymologie

- ✓ v plazmě se obvykle objevují nízké aktivity dg. významných enzymů
- ✓ rovnováha mezi uvolňováním enzymů do cirkulace v průběhu normální obměny buněk a jejich zvýšenými metabolickými nároky či vylučováním
- ✓ rozmezí hodnot aktivity enzymů v plazmě u zvířat ztěžuje určení limitů pro „normální rozmezí“

Jak změřit množství enzymu?

- ✓ celkové množství všech enzymů v plazmě je nižší než 1 g/l
- ✓ velmi obtížně změřitelné
- ✓ fyziologicky nízké (stopové) koncentrace enzymů
- ✓ přítomnost mnoho dalších proteinů
- ✓ běžné chemické reakce důkazu jsou nepoužitelné
- ✓ není specifické pro odlišení jednotlivých enzymů

Jak změřit množství enzymu?

Nepřímé stanovení

- katalytická koncentrace
- $\mu\text{kat/l}$
- stanoví se produkt enzymové reakce
- většina klinicky významných enzymů

Přímé stanovení

- hmotnostní koncentrace
- $\mu\text{g/l}$
- stanoví se molekula enzymu jako antigen (imunochemicky)
- jen některé, např. tumorové markery

Katalytická aktivita enzymu:

jednotka katal, 1 kat = mol/s

jeden katal je katalytická aktivita enzymu, při které se v reakci přemění jeden mol substrátu za sekundu

mezinárodní jednotka IU (international unit)

1 IU = $\mu\text{mol/min}$

Převodní vztahy:

1 μkat = 60 IU

1 IU = 0,0166 μkat

Katalytická koncentrace enzymu

- ✓ aktivita je vztažena na objem biologické tekutiny (krevní plazma, sérum)
- ✓ jednotky mkat/l, $\mu\text{kat/l}$

Zvýšení aktivity

- ✓ dochází především v důsledku poškození, prasknutí nebo nekrózy buněk
- ✓ buněčná proliferace může také vést ke zvýšení enzymů v plazmě
- ✓ závisí na rychlosti a rozsahu poškození buněk
- ✓ rovnováha mezi rychlostí katabolismu a vylučováním enzymů
- ✓ poločas v plazmě/séru
- ✓ únik enzymů do cirkulace vs. indukce tvorby enzymů

Schéma úniku enzymů do cirkulace při poškození hepatocytu:

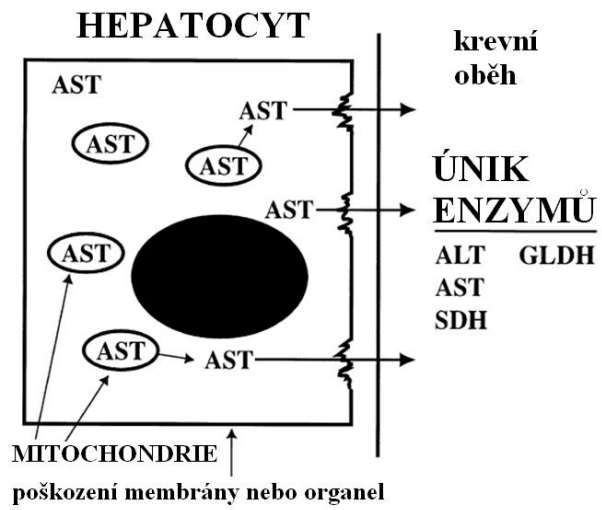
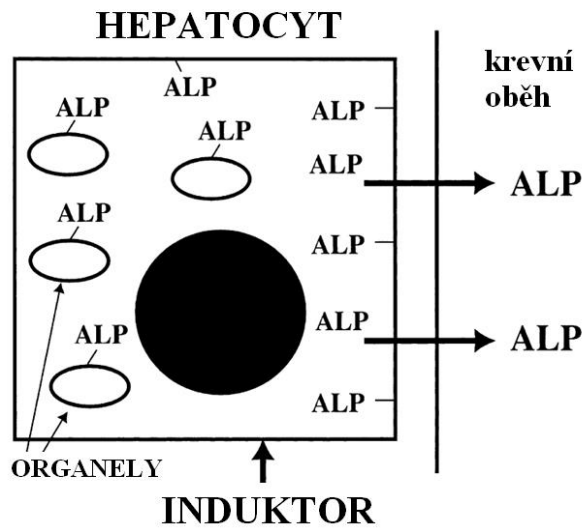


Schéma indukce zvýšené tvorby enzymů:



Příklady nespecifického zvýšení aktivity enzymů:

- ✓ Věk - novorozenci + mláďata (ALP - před uzavřením epifyzárních růstových štěrbin)
- ✓ Indukce enzymů - léky mohou stimulovat produkci (ALP - barbituráty; GMT-alkoholem indukované poškození jater)
- ✓ Hemolýza
- ✓ Zvýšené sérové aktivity ALP a GMT v důsledku cholestázy

Induktory enzymů	Supresory enzymů
✓ etanol	✓ allopurinol
✓ barbituráty	✓ chloramfenikol
✓ karbamáty	✓ sulfonamidy
✓ spironolakton	✓ ketokonazol
✓ glukokortikoidy	✓ metronidazol
✓ griseofulvin	✓ parathion

Snížená aktivita

- ✓ mnohem méně často
- ✓ mnoho případů = špatné skladování vzorku (většina enzymů jsou poměrně labilní)
- ✓ příslušný orgán může být hypoplastický, atrofický nebo zničený (exokrinní pankreatická insuficience)

Mnohá léčiva jsou inhibitory enzymů

- ✓ Acetylsalicylová kyselina (cyklooxygenáza)
- ✓ Ibuprofen (cyklooxygenáza)
- ✓ Statiny (HMG-CoA reductáza) – hypolipidemika, snižují syntézu cholesterolu (lovastatin)
- ✓ Inhibitory ACE (angiotensin konvertující enzym) – léčba hypertenze (enalapril)
 - Reverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy
 - Selektivní inhibitory mozkové acetylcholinesterázy (rivastigmin, galantamin) - Alzheimerova choroba

Lokalizace poškození?

Většina enzymů

- ✓ téměř ve všech buňkách, různé koncentrace
- ✓ většina enzymů výskyt současně v různých tkáních

Špatná příprava vzorků

- ✓ sérové enzymy = proteiny
- ✓ rozklad nebo denaturace teplem, změna pH, stabilita, chemikálie
- ✓ může mít za následek ztrátu aktivity enzymu
- ✓ většina enzymů je stabilních v chlazeném séru/plazmě po dobu 24 hodin
- ✓ vliv hemolýzy a lipemie

Orgánová specifita enzymů?

- ✓ Odhad specifity může být zlepšen:
- ✓ stanovením izoenzymů
- ✓ stanovením více než jednoho enzymu
- ✓ Velmi málo enzymů jsou specifické pouze pro jeden typ buněk (tkáňově či orgánově specifické)
 - ALT je převážně specifická pro játra u psů a koček, a méně pro svaly u koní

9.1 SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA ENZYMŮ

Úvod:

Specificita enzymů

Specificita účinku

- ✓ enzym katalyzuje pouze jednu z několika termodynamicky možných přeměn substrátu
- ✓ určuje především koenzym

Substrátová specificita

- ✓ schopnost určitého enzymu katalyzovat přeměnu pouze určitého substrátu
- ✓ určuje apoenzym (aktivní centrum)
- ✓ může být úzká (enzym má pouze jeden substrát) nebo široká (enzym katalyzuje přeměnu několika chemicky příbuzných substrátů)

Schopnost enzymu přeměňovat ze skupiny substrátů, které by mohly podléhat dané chemické přeměně, jen některé se nazývá *substrátová specificita*. Tato ojedinělá vlastnost enzymů je vysvětlována tím, že do aktivního místa enzymu se mohou vázat jen molekuly určitého tvaru a vymezených schopností, které mohou nekovalentně interagovat s vazebnými skupinami enzymu. Substrátová specificita může být absolutní (=přeměňuje se jen jeden substrát) nebo tzv. skupinová (=přeměňuje se celá skupina substrátů).

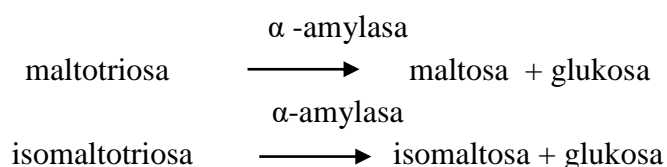
Úkol: Zjistěte hydrolytické účinky α -amylasy a sacharasy vůči škrobu a sacharose.

Teoretická příprava: Enzymy, jejich klasifikace, způsoby aktivace enzymů (limitovaná proteolýza, kovalentní modifikace, alosterická modifikace).

Princip:

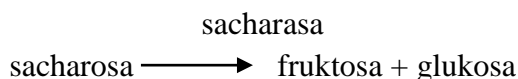
Zjišťuje se substrátová specifita α -amylasy a sacharasy ke škrobu a sacharose na základě kvalitativního stanovení některých substrátů a produktů enzymové reakce.

1) α -Amylasy (1, 4- α -D-glukan-4-glukan-hydrolasa, E.C. 3.2.1.1 – AMS) hydrolyzuje α (1 \rightarrow 4) glykosidové vazby sacharidů obsahujících nejméně tři glukosové jednotky :



Škrob je touto endoglykosidasou štěpen na kratší glukonové řetězce a posléze až na hlavní produkt maltosu. Schopnost enzymu katalyzovat metabolickou přeměnu škrobu indikuje negativní jodoškrobová reakce (nízkomolekulární dextriny a maltosa nereagují) a pozitivní Fehlingova reakce na redukující cukry. Zdrojem α -amylasy jsou sliny, u nichž nelze vyloučit přítomnost redukujících cukrů z potravy.

2) **Sacharasa** (β -D-fruktofuranosid – fruktohydrolasa, E.C. 3.2.1.2.6) hydrolyzuje β -D-fruktofuranosidy za odštěpení molekuly fruktosy, např.:



Schopnost enzymu katalyzovat metabolickou přeměnu sacharosy indikuje pozitivní reakce na redukující cukry a glukosu. Zdrojem enzymu jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* rasa droždářenská, u nichž je enzym lokalizován především vně cytoplazmatické membrány. Nelze vyloučit vznik falešně pozitivního výsledku vlivem přítomnosti redukujících cukrů z kvasinkových buněk nebo rozkladem roztoku sacharosy vlivem sekundární kontaminace.

Činidla a biologický materiál:

- kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* rasa droždářenská
 - vlastní sliny
 - 1% roztok škrobu (10 g škrobu / l)
 - fyziologický roztok : NaCl 0,15 mol/l
 - roztok sacharosy 20 g/l (skladovat v chladničce, používat čerstvý roztok)
 - Lugolův roztok (vodný roztok jodu a jodidu draselného)
 - Fehlingův roztok I: modrá skalice 40 g/l
 - Fehlingův roztok II: vinan sodnodraselný 200 g/l a NaOH 150 g/l
 - Fehlingovo činidlo : 1 díl Fehl. roztoku I a 1 díl Fehl. roztoku II (činidlo se připravuje těsně před použitím; po zahřátí nesmí vzniknout červená sraženina; proveďte.).
-

Pracovní postup : Odvažte 1 g kvasnic a rozmíchejte je ve 4 ml deionizované vody. Do zkumavky nasbírejte 1 ml vlastních slin a zřeďte je 2 ml fyziologického roztoku. Poté pipetujte do tenkostěnných, vysokých zkumavek dle tabulky:

Enzym	Amylasy					Sacharasy				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zkumavka číslo:										
Slina (ml)	0,5	-	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-
Suspenze kvasinek (ml)	-	-	-	-	-	0,5	-	0,5	0,5	0,5
Deioniz. voda (ml)	2,0	0,5	-	-	-	2,0	0,5	-	-	-
Var 4 min (vodní lázeň)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Škrob (ml)	-	2,0	2,0	2,0	-	-	-	-	-	2,0
Sacharosa (ml)	-	-	-	-	2,0	-	2,0	2,0	2,0	-

Obsahy zkumavek dobře promíchejte, poté inkubujte při 37 °C po dobu 30 minut. Pak obsah každé zkumavky rozdělte tak, aby bylo možné provést reakce na:

- **Škrob** (zkumavky 2, 3, 4, 10) : k 1 ml analyzovaného roztoku přidejte 1-2 kapky Lugolova roztoku. V přítomnosti škrobu vzniká **modré zbarvení**.

- **Redukující sacharidy** (všechny zkumavky) : k 1 ml Fehlingova činidla přidejte 1 ml analyzovaného roztoku a povařte ve vroucí vodní lázni. V přítomnosti redukujícího cukru vzniká **červená sraženina** oxidu měďného.

Poznámka :

Před cvičením není vhodné konzumovat potraviny, z nichž v dutině ústní mohou vznikat redukující cukry (chléb, pečivo, ovoce, sladké limonády, kofola...).

Je třeba pracovat velmi čistě, používat dobře vymyté zkumavky a u reagenčních lahvíček nezaměňovat zátky. Pro každé činidlo nebo substrát použít čistou špičku u dávkovače nebo čistou skleněnou pipetu s nástavcem.

Při inaktivaci (var) je třeba počítat s vytemperováním reakční směsi na teplotu vroucí vodní lázně (kádinka).

Při vyhodnocení neprůkazných reakcí přihlédněte k čistotě média, v němž je enzym obsažen (zkumavky 1,6; sliny bez redukujících cukrů viz bod 2, kvasnice v záruční době - zkumavka 8) a inaktivaci enzymu (zkumavky 4,9; viz bod 3).

Zdrojem α -amylázy jsou sliny, u nichž nelze vyloučit přítomnost mikrobiálních enzymů.

Doba inaktivace je závislá na stáří kvasinek (obvykle trvá 3 až 4 minuty).

9.2 STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE ALP V KREVNÍM SÉRU

Úvod:

alkalická fosfatáza (ALP)

Fosfatázy hydrolyzují estery fosforu a tvoří anorganické fosfáty. Existují v podobě celé rady izoenzymů. Z klinického hlediska rozlišujeme zejména dvě skupiny: alkalické fosfatázy, které mají reakční optimum v oblasti pH 9-10, a kyselá fosfatázy s reakčním optmem okolo pH 5. Referenční hodnoty se zvláště u AP výrazně liší v závislosti na používání různých pufru. AP byla prokázána téměř ve všech tkáních organismu v různých aktivitách: osteoblasty, střevní sliznice, placenta, buňky tubulu ledvin, epitel žlučových cest, játra, leukocyty (značné druhové rozdíly). Normálně se zjišťuje v homogenizátu jaterních buněk jen nízká aktivita AP. Zřejmě existuje izoenzym, který má odchylné vlastnosti a je indukovaný různými účinnými látkami, např. kortikosteroidy. To může být důvod, proč při léčbě kortikosteroidy nebo v případě přirozeného hyperkortizolismu (Cushinguv syndróm) dochází ke zvýšení aktivity AP. Značné zvýšení aktivity AP je pozorováno při cholestáze. U přežvýkavců a koček reaguje AP teprve při výrazných hepatopatiích. Protože je AP obsažena v osteoblastech, mají mladá zvířata podstatně vyšší aktivitu než dospělí. K této věkové závislosti je třeba přihlédnout.

- ✓ ALP EC 3.1.3.1; Fosforylázová monoesteráza kys. orthofosforečné [alkalické optimum]
- ✓ lokalizace v buňce: buněčná membrána (extracelulární glykoprotein)
- ✓ štěpí fosfátové estery
- ✓ vyžaduje pH ~ 10,2; Mg^{2+} a Zn^{2+}
- ✓ ISOENZYMY:
- ✓ střevní
- ✓ tkáňově nespecifický (játra, kosti, ledviny)
- ✓ placentární
- ✓ fetální

Úkol: Proveďte stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatasy (ALP) v séru metodou konstantního času.

Princip (metoda konstantního času): Alkalická fosfatasa (alkalická fosfohydrolasa-monoesterů kyseliny o-fosforečné, E.C.3.1.3.1 - ALP) štěpí v N-methyl-D-glukaminovém pufru 4-nitrofenyl-fosfát na 4-nitrofenol a fosfát. Alkalická fosfatasa je aktivována chloridem sodným a chloridem hořečnatým. Mírou aktivity enzymu je množství uvolněného 4-nitrofenolu, který se stanovuje fotometricky metodou konstantního času po zastavení enzymové reakce inhibitorem ALP (roztok EDTA/NaOH), který blokuje aktivní centrum enzymu.

Činidla:

- N-methyl-D-glukaminový pufr = roztok 2
- standardní roztok : 4-nitrofenol = roztok 3; koncentrace 2,4 mmol/l
- substrát : 4-nitrofenylfosfát = roztok 1
- roztok inhibitoru (EDTA/ NaOH)

K analýze použijte připravená činidla a krevní sérum.

Pracovní postup:

Do zkumavek nepipetujte dle následující tabulky:

Činidla, vzorky:	Zkumavky:			
	Vzorek 2x	Slepý vzorek ke vzorku (A_{SVZ1}) 2x	Standard 1x	Slepý vzorek ke standardu (A_{SVZ2}) 1x
Roztok 2 (pufr) (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00
Sérum	0,02	-	-	-
Roztok 3 (standard) (ml)	-	-	0,02	-
Promíchat a preinkubovat 5 minut při 37 °C a poté přidat do zkumavek v termostatu				
Roztok 1 (substrát) (ml)	0,20	0,20	-	-
Deionizovaná voda	-	-	0,20	0,22
Inkubovat přesně 10 minut při 37 °C a poté přidat do zkumavek v termostatu				
Roztok inhibitoru (ml)	0,50	0,50	0,50	0,50
Sérum (ml)	-	0,02	-	-

Promíchat a do 30 minut změřit A_{ST} (absorbance standardu), A_{SVZ2} (absorbance slepého vzorku ke standardu), A_{VZ} (absorbance vzorku) a A_{SVZ1} (absorbance slepého vzorku ke vzorku) při vlnové délce 420 nm proti deionizované vodě.

Výpočet:

A) Pomocí vlastního kalibračního faktoru, který platí pro vaše laboratorní podmínky:

$$F = 4 / (A_{ST} - A_{SVZ2})$$

Koncentrace 4-nitrofenolu ve standardním roztoku (2400 $\mu\text{mol/l}$) při inkubaci 10 min (600 s) odpovídá katalytické koncentraci ALP (2400/600) 4 $\mu\text{kat/l}$.

$$\text{Katalytické koncentrace ALP: } \text{ALP } [\mu\text{kat/l}] = F \times (A_{VZ} - A_{SVZ1})$$

B) V případě, že nebyla provedena kalibrace, jsou faktory F výpočtu při různých vlnových délkách následující:

$$405 \text{ nm} = 7,899 \quad 410 \text{ nm} = 8,373 \quad \underline{420 \text{ nm} = 10,263} \quad 430 \text{ nm} = 14,546$$

Poznámka:

Bez zředění lze analyzovat vzorky do 7 $\mu\text{kat/l}$. Přesáhne-li aktivita ALP tuto hodnotu je nutné sérum zředit fyziologickým roztokem a analýza se musí opakovat (výsledek x ředění).

U psů má ALP vysokou senzitivitu, ale nízkou specifitu pro játra, u koček je tomu naopak. U psů existuje ALP ve formě tří hlavních izoenzymů (kostní, jaterní, kortikoidy indukovaný izoenzym). U koček chybí kortikoidy indukovaný izoenzym. Falešně zvýšené koncentrace se vyskytují při hyperbilirubinemii, těžké hyperlipemii a hemolýze.

10 ENZYMY II.

10.1 STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE ALT V KREVNÍM SÉRU

Úvod:

ALANIN-AMINOTRANSFERÁSA

Tento enzym můžeme u psa a kočky označit jako jaterně specifický. U všech ostatních živočišných druhů — s výjimkou primátů včetně člověka — je k diagnostice jaterních onemocnění nevhodný. U psa, kočky, případně primátů je tento enzym velmi vhodný ke stanovení, zda játra jsou či nejsou postižena. Ohraničené jaterní změny (abscesy, některé tumory) se nebudou odrážet ve výrazných výkyvech aktivity ALT (určitou vypovídací hodnotu má jen pozitivní výsledek). ALT se nachází pouze v cytoplazmě. Ke zvýšení její aktivity dochází tedy již při porušení membrány jaterních buněk, aniž by muselo dojít k jejich nekróze.

- ✓ ALT EC 2.6.1.2; L-alanin: 2-oxoglutarát-aminotransferáza
- ✓ lokalizace v buňce: CYTOSOL
- ✓ lokalizace v organismu: hepatocyty
- ✓ ukazatel citlivý, ale ne specifický

Zvýšení aktivity:

- ✓ poškození jater
- ✓ anémie
- ✓ akutní pankreatitida
- ✓ myopatie, myokarditida u Eq

Úkol: Stanovte katalytickou koncentraci ALT metodou konstantního času pomocí diagnostické soupravy

Teoretická příprava:

ALT - významný diagnostický enzym, reakce a lokalizace. Transaminace aminokyselin. Coriho-Alaninový cyklus.

Princip:

Katalytickým působením alaninaminotransferázy (ALT) na substrát obsahující L-alanin a 2-oxoglutarát vzniká pyruvát a glutamát. 2-oxoglutarát a pyruvát reagují s 2,4-dinitrofenylhydrazinem za vzniku hydrazonů. Stanovení je založeno na měření absorbance těchto hydrazonů v alkalickém prostředí. Hydrazon vzniklého pyruvátu má vyšší absorbanci.

Činidla:

- činidlo 1 - standardní roztok pyrohroznanu sodného 2 mmol/l, je potřebný pro kalibraci, pro vlastní měření nepoužijete
- činidlo 2 - 2,4-dinitrofenylhydrazin 1 mmol/l v HCl 1 mol/l
- činidlo 3 - hydroxid sodný (hotový pracovní roztok)
- činidlo 4 - **substrát ALT:** L-alanin 0,2 mol/l, 2-oxoglutarát 2 mmol/l, fosforečnanový pufr 0,1 mol/l, pH 7,4 (25 °C).

Pracovní postup:

Pipetujte jednotlivé složky reakční směsi do krátkých skleněných zkumavek:

Činidla [ml]	Vzorek (2x)	Slepý vzorek (1x)
Činidlo 4 (substrát ALT)	0,25	0,25
Preinkubujte 3 min při 37 °C.		
Sérum	0,05	-
Inkubujte přesně 30 min při 37 °C.		
Činidlo 2 (2,4-dinitrofenylhydrazin)	0,25	0,25
Promíchejte a nechte stát 20 min při laboratorní teplotě.		
Činidlo 3 (NaOH)	2,5	2,5
Sérum	-	0,05

Promíchejte a po uplynutí 10 min proveďte měření absorbance při **500 nm**. Dále odečtěte hodnotu slepého vzorku od průměrné hodnoty vzorků. Výslednou koncentraci odečtěte z kalibrační přímky pro ALT (výsledek je nutno **VYNÁSOBIT 2**, protože došlo ke zkrácení původní doby inkubace ze 60ti minut na polovinu – 30min.)

10.2 STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE GGT V KREVNÍM SÉRU

Úvod:

γ -GLUTAMYLTRANSFERÁZA

Jedná se o enzym, který je vázaný na mitochondriální matrix hepatocytu. Je monolokulární a můžeme jej označit jako jaterně specifický. V rámci jaterního lalůčku se nachází největší aktivita v centrilobulární oblasti. To je předpokladem pro skutečnost, že GLDH velmi citlivě reaguje při sekundárních hepatopatiích, pokud noxa atakující játra poškodí nejprve centrilobulární hepatocyty. Jako příklad lze uvést stázi žluči, kongestivní kardiomyopatii a hypoxemii. Při malém poškození dochází někdy k izolovanému zvýšení aktivity GLDH pouze mírné nad horní hranici fyziologického rozmezí. GLDH reaguje mimořádně citlivě. Zvýšení do 15 IU/l nehodnotíme jako výrazné patologické. Hodnoty překračující trojnásobné horní hranici referenčního rozmezí poukazují na těžké jaterní onemocnění nebo jaterní cirhózu.

- ✓ GGT EC 2.3.2.2; γ -glutamyl-peptid:aminokyselina γ -glutamyltransferáza
- ✓ lokalizace v buňce: membránový enzym
- ✓ lokalizace v organismu: žlučové cesty, mikrosomální frakce hepatocytů, ledviny, pankreas, střevo
- ✓ GMT je citlivým, avšak nepříliš specifickým markerem jaterního onemocnění
- ✓ zvýšení aktivity enzymů může provázet akutní pankreatitidu
- ✓ citlivý marker hepatobiliárního poškození u koček GMT > ALP, u steatózy jater roste ALP (u psa spíše ALP)
- ✓ ALP + GMT ve společném vyšetření mají vyšší vypovídací sílu pro zjištění onemocnění jater

Zvýšení aktivity:

- poškození jater, cholestáze
- anémie (hypoxické poškození jater)
- akutní pankreatitida
- poškození ledvin (tubulů)

Úkol: Stanovte katalytickou koncentraci gama-glutamyltransferasy pomocí diagnostické soupravy

Teoretická příprava:

GMT – Meisterův cyklus. Biosyntéza glutathionu. GMT významný diagnostický enzym. Uveďte enzymy glutathion-dependentní.

Princip:

GMT přenáší z γ -L-(+)-glutamyl-4-nitranilidu glutamylový zbytek na dipeptidový akceptor, kterým je glycyglycin, který současně slouží jako pufr. Uvolněný 4-nitranilin se stanovuje fotometricky po zastavení enzymové reakce okyselením.

Činidla:

- substrát: γ -L-glutamyl-4-nitranilid
 - glycyglycinový pufr
 - kyselina octová 1,7 mol/l (10%)
 - **pracovní roztok je již připraven** rozpuštěním 1 tablety substrátu v 10 ml deionizované vody a po ochlazení přidat 2,5 ml pufru.
-

Pracovní postup:

Pipetujte jednotlivé složky reakční směsi do krátkých skleněných zkumavek dle následující tabulky:

Činidla [ml]	Vzorek (2x)	Slepý vzorek (1x)
Pracovní roztok	0,25	0,25
Preinkubujte 5 min při 37 °C, poté přidejte		
Sérum	0,025	-
Inkubujte přesně 30 min při 37 °C, poté přidejte		
Roztok kyseliny octové	1,5	1,5
Sérum	-	0,025

Promíchejte a po uplynutí 10 min proveďte měření absorbance na Spekolu 11 při **405 nm**. Dále odečtěte hodnotu slepého vzorku od průměrné hodnoty vzorků. Výslednou koncentraci odečtěte z kalibrační přímky pro ALT (výsledek je **nutno VYDĚLIT 2, protože došlo k prodloužení původní doby inkubace z 15-ti minut na 30min.**)

11 CVIČENÍ PROJEKTU OPVK

11.1 SPRÁVNÁ LABORATORNÍ PRAXE OPVK KA 2110/1-10 ZÁSADY SPRÁVNÉ LABORATORNÍ PRAXE – VYBRANÁ USTANOVENÍ

Zabezpečování jakosti v laboratorní praxi je významnou součástí práce každé laboratoře. Problematiku jakosti řeší řada předpisů, z nichž zásadní jsou normy a legislativa pro činnost v oblasti akreditace laboratoří.

Abychom přiblížili studentům zabezpečování jakosti v biochemické laboratoři v rámci našich praktických cvičení, uvádíme dvě skupiny příkladů, které jsou součástí zabezpečování jakosti.

Jde o zásady:

- správné laboratorní praxe v biochemické analýze,
- prezentace a interpretace získaných výsledků v rámci biochemické analýzy.

Nedílnou součástí a samostatnou kapitolou příručky jakosti je dodržování zásad správné laboratorní praxe. Se zabezpečováním správné laboratorní praxe v rámci jakosti laboratorní činnosti se setkáváme i v našich praktických cvičeních a pro studenty uvádíme konkrétní příklady aplikace správné laboratorní praxe:

1) používání kontrolního séra v rámci jednotlivých praktických laboratorních úkolů – jde o využití tzv. Lyonormu, kdy se využívají kontrolní sérum (porcinní sérum obohacené o elektrolyty, příslušné substráty a vybrané enzymy, biochemické parametry jsou stanoveny v příslušném atestu) jde o vlastní systém kontroly správnosti laboratorní práce,

2) práce s automatickými pipetami (dávkovači) – nutnost dodržování přesných objemů činidel a roztoků,

3) práce s laboratorním vybavením v průběhu biochemických analýz – např. vodní lázeň (správné nastavení požadované teploty a dodržení přesného času inkubace), odstředivka (správný počet otáček a čas odstředování), spektrofotometr (nastavení správné vlnové délky a kalibrace přístroje), automatická míchačka (správná rychlost a čas míchání k dokonalému promíchání), práce s připravenými činidly (použití správné koncentrace a objemu dané metodikou práce).

Součástí praktické aplikace zásad správné laboratorní praxe v rámci zabezpečování jakosti je i vlastní prezentace a interpretace výsledků biochemických analýz. Jde o dodržování těchto zásad:

- 1) získané laboratorní výsledky kvalitativních důkazů a kvantitativní analýzy hodnotíme podle stanovených kritérií,
- 2) u kvalitativních důkazů jde o hodnocení výsledku ve smyslu „ano/ne“, ale i o posouzení např. vzniku barevných reakcí a jejich intenzity, vzniku dalších struktur ve zkumavce např. sraženin, gel, apod.,

- 3) v případě kvantitativní analýzy jde o porovnání hodnot získaných analýzou a tzv. referenčních (srovnávacích) hodnot, tj. hodnot předem stanovených pro daný bioanalyt a metodu,
- 4) hodnocení výsledků v obecné rovině podle daných kritérií, např. metoda hodnocení pomocí křížků (nejčastěji u kvalitativních důkazů), metoda slovního hodnocení „pozitivní, negativní, dubiózní“, aplikace a posouzení výsledků podle správných referenčních hodnot (ve veterinární biochemii pro daný parametr a druh zvířete, resp. se zohledněním věku zvířat i obecnou formulací),
- 5) správné a přesné vypracování laboratorního protokolu o výsledku biochemické analýzy podle daných parametrů výstupu protokolu.

Vybraná odborná terminologie z oblasti správné laboratorní praxe

Jakost – stupeň splnění určitých požadavků souborem znaků

Akreditace – úřední postup, na jehož základě je úřední autoritou vydávat uznání, že příslušná organizace nebo osoba jsou způsobilé k vykonávání určitých činností (v laboratořích k laboratorní činnosti, včetně specifikace příslušných analýz).

Audit – člení se na interní a externí

Interní audit – ověření existence a zavedení systému jakosti v dané laboratoři, včetně jeho posouzení a přezkoumání vyšším managementem laboratoře, zejména s cílem, zda je tento systém účinný.

Externí audit – provádí nezávislý orgán jako součást akreditace.

Mez detekce – jedná se o nejmenší množství analytu v analyzovaném vzorku, které lze danou laboratorní technikou detekovat, např. množství analytu naměřené v systému zvolené instrumentální metody. Mez detekce patří mezi validační parametry.

Mez stanovitelnosti – nejmenší množství analytu, které může být stanoveno. Mez stanovitelnosti patří mezi validační parametry.

Audit – interní prověrka:

Horizontální – zkoumání jednoho prvku

Vertikální – kontrola na podkladě náhodně vybraného vzorku.

Certifikace – jde o postup, kterým se poskytuje písemné zjištění, že výrobek, proces nebo služba jsou ve shodě se stanovenými požadavky.

Certifikace – postup, kterým se poskytuje písemné zjištění, že výrobek proces nebo složka jsou ve shodě stanovenými požadavky. Certifikace se liší od akreditace tím, že výslovně nezmiňuje odbornou způsobilost.

Certifikační orgán vydává certifikát. Po dobu platnosti certifikátu pak provádí periodické kontroly.

Validace (laboratorní metody) – je potvrzení přezkoušením a poskytnutím objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické použití splněny.

Verifikace (laboratorní metody) – tj. ověření správnosti fungování laboratorní metody. Ověření je součástí všech systémů a realizuje se při zavedení dané laboratorní metody, včetně změnového řízení.

Kalibrace – je posouzení hodnot uznaných měřicím systémem a hodnotami odpovídajícími obsahu ve vzorku.

Zabezpečování jakosti (Quality Assurance) představuje plánované a systematické činnosti pro poskytnutí důvěry, že produkt nebo služba (v případě laboratoře se jedná o výsledek laboratorního vyšetření nejčastěji ve formě laboratorního protokolu) bude splňovat požadavky na jakost, které v rámci preventivního charakteru, zahrnují:

- systém jakosti,
- vhodné a odpovídající laboratorní prostředí,
- kvalifikovaný personál s odpovídajícím vzděláním, výcvikem a dovednostmi,
- vhodné zařízení laboratoře,
- postupy řízení jakosti,
- dokumentované metody (tj. analogické postupy),
- validované metody,
- standardní operační postupy,
- kalibrace,
- přípravky a analytická činidla,
- testy způsobilosti,
- kontrolní postupy pro činnost laboratoře,
- postupy vyjadřující výsledky laboratorních analýz
- nápravná opatření,
- interní audity (někdy označované jako interní prověrky a přehodnocování systému jakosti),
- postupy pro řešení stížností.

Vedle QA je součástí i operativní řízení jakosti (označovány jako QC – z angl. Quality Control), což představuje operativní prostředky a činnosti používané při splnění požadavků na jakost.

Řízení jakosti, resp. operativní řízení jakosti zahrnuje:

- analýzu vzorků,
- standardů a referenčních materiálů,
- analýzu duplikátů,
- analýzu obohacených vzorků,
- použití vzorků QC,
- použití regulačních diagramů,
- mezilaboratorní testování,
- interní prověrky a analýzy jakosti (interní a externí).

Základním legislativním dokumentem je ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří v akreditačním systému České republiky. Norma představuje základní dokument, který popisuje a charakterizuje plnění akreditačních kritérií.

Předpokladem akreditace je zpracování tzv. příručky jakosti (zkr. PJ), která musí být k dispozici všem pracovníkům laboratoře. Současně je povinností trvale ji udržovat v aktuálním stavu.

Příručka jakosti musí obsahovat následující informace:

- identifikační údaje organizace a laboratoře,

- ustanovení o koncepci jakosti,
- strukturu laboratoře,
- organizační schéma (organizace a laboratoře),
- informace personálního charakteru,
- pracovní a funkční činnosti pracovníků,
- včetně odpovědnosti a pravomocí (personálně má mít laboratoř vedoucího laboratoře, technického vedoucího a manažera jakosti),
- charakteristika prostor, nástupů osob,
- technické zařízení a vybavení,
- všestranné a specifické postupy zabezpečování jakosti
- zkoušení způsobilosti,
- nápravná opatření,
- používání referenčních materiálů,
- vyřizování stížností,
- zabezpečení nestrannosti, nezávislosti a věruhodnosti (nesmí být vnější vlivy).

Důležitým prvkem systému jakosti je vedení dokumentace. Vedle již zmíněné příručky jakosti je třeba vést záznamy o zařízení laboratoře, včetně kalibrace a s ní související dokumentace, použití referenčních materiálů, zahrnující jejich identifikaci.

Akreditační orgán provádí vizuálně 1x ročně dozor nad dodržováním akreditačních kritérií.

Vlastní akreditace (z latinského *Accredo* – dáti důvěru) je nestranné a objektivní posouzení způsobilosti, které provádí v České republice Český institut pro akreditaci (ČIA).

ČIA – obecně prospěšná společnost, je národní akreditační orgán založený vládou České republiky, který poskytuje svoje služby v souladu s platnými právními předpisy ve všech oblastech akreditace jak státním, tak privátním subjektům. Český institut pro akreditaci (ČIA) je výkonným orgánem pro:

- akreditaci zkušebních laboratoří
- akreditaci kalibračních laboratoří
- akreditaci certifikačních orgánů, které provádějí certifikaci výrobků, systém jakosti a personálu
- akreditaci inspekčních orgánů

Dokumentace laboratoře v rámci SLP:

Výstupem laboratorní analýzy je protokol o zkoušce, který musí obsahovat následující údaje:

- název a identifikace protokolu,
- název a adresa zákazníka,
- identifikace použitých metod (ve stylu přílohy k ověření k akreditaci),
- popis zkoušené položky,
- datum přijetí vzorků a provedení analýz,
- odkaz na plán a postup vzorkování,
- výsledky zkoušek, včetně jednotek,
- identifikace osob podepisujících protokol.

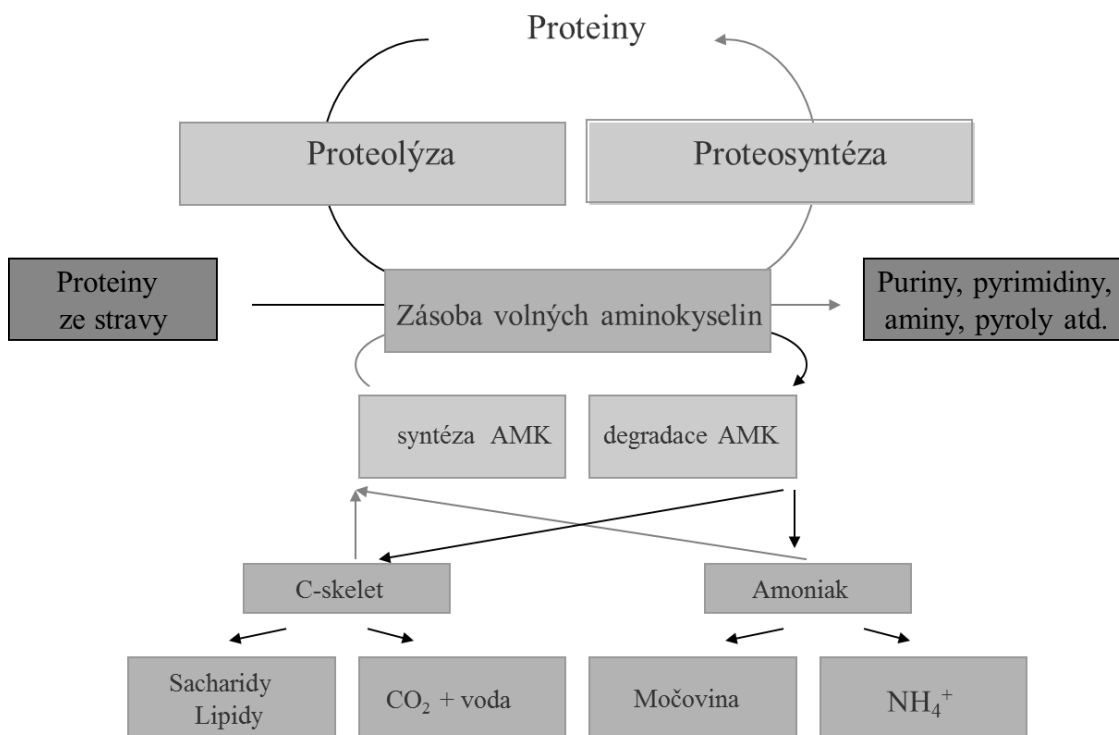
11.2 STANOVENÍ BÍLKOVIN BIURETOVOU REAKCÍ V KREVNÍM SÉRU A LYONORMU

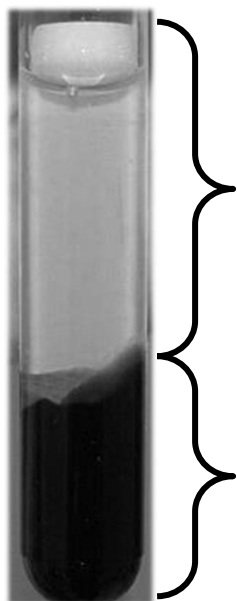
Úvod:

Funkce proteinů v organismu

- Katalýza chemických reakcí (*enzymy*)
- Transportní funkce (*hemoglobin, albumin, globuliny*)
- Imunologická funkce (*imunoglobuliny*)
- Kontraktilní funkce (*aktin a myozin*)
- Funkce při srážení krve (*fibrinogen, trombin*)
- Hormonální funkce (*peptidové a proteinové hormony: inzulín, glukagon, růstový hormon...*)
- Strukturální funkce (*kolagen, elastin*)

Zjednodušené schéma metabolismu proteinů a aminokyselin:





Krevní plazma – 55%

90% voda

7% plazmatické proteiny

2% nutrienty, enzymy, hormony

0,9% elektrolyty

Buněčné komponenty - 45%

Vrstva leukocytů a trombocytů

Červené krvinky

Plazma vs. sérum

- ✓ plazma je tekutá část krve, která nebyla sražena (použití antikoagulant)
- ✓ sérum je kapalná část krve, která zůstává po srážení
- ✓ obsahují podobné složky (s výjimkou plazmatických koagulačních faktorů)
- ✓ plazma bez koagulačních faktorů = sérum

Plazmatické proteiny

- koncentrace **celkového proteinu** 60 - 80 g/l ($\downarrow Ca$)
- koncentrace **albuminu** 25 - 35 g/l (Ca a Fe nižší než velkých zvířat)
- sérové globuliny (transportní proteiny, reaktanty akutní fáze, globuliny)

PARAMETRY:	JEDNOTKA	PRASE	PES	KOČKA	SKOT	KŮŇ
Celk. bílkovina (TP)	g/l	65-85	54-71	54-94	60-80	52-79
Albumin (Alb)	g/l	35-45	23-44	21-56	30-42	25-45

✓ **Místa syntézy:**

- hlavní plazmatické proteiny jsou syntetizovány hepatocyty
- imunoglobuliny + B-lymfocyty ve slezině, lymfatických uzlinách a kostní dřeni
- enterocyty → apoprotein B-48
- sekrece albuminu je stimulována poklesem osmotického tlaku
- role hormonů štítné žlázy (TH), růstového hormonu (GH→IGF-1), insulinu
- vliv patofyziologických změn – infekce nebo zánět

Odbourávání plazmatických proteinů

- hepatocyty
- mononukleární fagocytární systém (komplexy antigen protilátka, hemoglobin-haptoglobin)

Faktory ovlivňujících plazmatické proteiny

- věk:
 - o novorozenci (↓ Glob)
 - o s přibývajícím věkem - ↑CB (↓Alb vs. ↑Glob)
- patofyziologické a fyziologické změny:
 - o hormony, gravidita, produkční fáze

Hlavní funkce plazmatických proteinů:

- základ struktury buněk, orgánů a tkání
- dusíková bilance pro výživu (albumin)
- katalýza biochemických reakcí (enzymy - lipáza, cholinesteráza)
- koloidně-osmotický tlak (albumin)
- vyrovnávací funkce ABR rovnováhy
- srážení krve (fibrinogen)
- obrana proti patogenům (imunoglobuliny, komplement)
- prevence proteolýzy (α_1 -antitrypsin)
- transport metabolitů (albumin, transferin, ceruloplasmin)
- regulace buněčného metabolismu (hormony)

Celkové proteiny plazmy

v plazmě více jak 3000 proteinů

±70 validovaných testů -referenční intervaly

asi 10 parametrů jsou v současné době používány k diagnostice u domácích zvířat

Hypoproteinémie

- ✓ malnutriční stavy
- ✓ snížení koncentrace jedné nebo několika málo bílkovin (např. ztráta albuminu při nefrotickém syndromu)
- ✓ nedostatečná tvorba albuminu u těžkých hepatopatií (celková hypoproteinémie)
- ✓ převodnění pacienta

Hyperproteinémie

- ✓ dehydratace
- ✓ zvýšení koncentrace jedné nebo několika málo bílkovin (polyklonální či monoklonální hyperimunoglobulinémie)

Úkol: Stanovte celkové proteiny v krevním séru a kontrolním séru Lyonorm biuretovou reakcí.

Princip:

Látky obsahující peptidovou vazbu reagují s ionty Cu^{2+} v alkalickém prostředí za vzniku červenofialového komplexu.

Činidla:

- standard bílkoviny v g/l (63 g/l)
- biuretové činidlo (roztok měďnaté soli) : síran měďnatý 0,15 mmol/l, Chelaton III 0,18 mol/l, hydroxid sodný 0,2 mol/l **!POZOR! ŽÍRAVINA!**

Postup:

1) Do zkumavek napipetujte podle následující tabulky v předepsaných objemech:

Činidla, vzorky	Zkumavky:			
	Vzorek krevního séra 3x	Standard 2x	Slepý vzorek 1x	Lyonorm 3x
Biuretovo činidlo (ml)	1,50	1,50	1,50	1,50
Sérum (ml)	0,02	-	-	-
Lyonorm (ml)	-	-	-	0,02
Standard bílkoviny (ml)	-	0,02	-	-
Deionizovaná voda (ml)	-	-	0,02	-

- 2) Obsah zkumavek **promíchejte** na automatické míchačce a **nechte stát 12 minut** při laboratorní teplotě.
- 3) Obsah zkumavek znovu promíchejte a změřte absorbance vzorku (A_{VZ}), slepého vzorku (A_{SV}), standardu (A_{ST}) a Lyonormu (A_L) při vlnové délce 550 nm proti deionizované vodě.
- 4) Proveďte výpočet obsah celkových proteinů podle následujícího vzorce:

PRO VZOREK:

$$\text{Celkový protein (g.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{VZ} - A_{SV})}{(A_{ST} - A_{SV})} \times c_{st}$$

PRO LYONORM:

$$\text{Celkový protein (g.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{LYO} - A_{SV})}{(A_{ST} - A_{SV})} \times c_{st}$$

c_{st} – tj. koncentrace standardu (uvedena na lahvičce roztoku standardu)

**Výuková opora pro studenty ke studiu předmětu
Biochemie I a II**

II. SEMESTR

2 PROTEINY I.

2.1 STANOVENÍ SÉROVÉHO ALBUMINU METODOU BCP

Úvod:

Albumin

- ✓ tvoří **35-60%** všech plazmatických bílkovin
- ✓ pouze 30-40% z celkového albuminu je v krvi, zbytek v intersticiu
- ✓ syntézu ovlivňuje osmotický tlak, insulin, thyroxin, kortizol
- ✓ vzniká v hepatocytech (preproalbumin, proalbumin)
- ✓ $T_{1/2} \pm 20$ dnů (druhově různé ↓Ca)
- ✓ zajišťuje onkotický tlak
- ✓ umožňuje volnou cirkulaci plazmy kapilárním řečištěm
- ✓ váže vodu a udržuje ji v krevním řečišti
- ✓ transportní funkce
- ✓ extracelulární antioxidant (-SH skupiny cysteinu)
- ✓ negativní reaktant akutní fáze
- ✓ po skončení existence dodává potřebné AMK = nutriční funkce

Transportní funkce pro:

- ✓ ionty (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+})
- ✓ nekonjugovaný bilirubin (2 mol bilirubinu/1 mol albuminu)
- ✓ oxid dusnatý NO
- ✓ neesterifikované mastné kyseliny
- ✓ kyselinu močovou
- ✓ vitamin C
- ✓ léčiva (penicilin, kyselina salicylová, sulfonamidy)
- ✓ kortizol, hormony T4 + T3 (u Ca více než TBG), testosteron (38%), estrogeny (60%), progesteron (50%), aldosteron (15%)

Úkol: Stanovte albumin pomocí metody BCP

Princip: 5,5'-dibrom-o-kresolsulfonftalein (= bromkresolový purpur, zkratka BCP) tvoří s albuminem ve slabě kyselém prostředí za přítomnosti povrchově aktivních látek barevný komplex vhodný k fotometrickému stanovení (s globuliny nereaguje).

Činidla:

- 1 tableta BCP
- činidlo 2: octanový pufr (pH 5,2 při 25 °C), Brij 35, azid sodný
- činidlo 1: (pracovní roztok), který máte již připraven rozpuštěním 1 tablety BCP v 60 ml činidla 2.
- standard albuminu – koncentrace uvedena na etiketě (30 g/l)

Postup: Pipetujete do krátkých zkumavek. Jeden vzorek připravte jako Lyonorm a druhý s krevním sérem.

Činidla	Zkumavky			
	Vzorek 2x	Lyonorm 2x	Standard 1x	Slepý vzorek 1x
Pracovní roztok (ml)	2,5	2,5	2,5	-
BCP (ml)	-	-	-	2,5
Deionizovaná voda (ml)		-	-	0,02
Standard (ml)	-	-	0,02	-
Krevní sérum (ml)	0,02	-	-	-
Lyonorm P (ml)	-	0,02	-	-

Nechejte stát 10 minut a poté změřte absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce **600-605 nm**.

Výpočet :

Pro sérum:

$$Albumin (g.l^{-1}) = \frac{(A_{Vz} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

Pro kontrolní sérum - Lyonorm:

$$Albumin (g.l^{-1}) = \frac{(A_{Ly} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

c_{St} koncentrace standardu albuminu - uvedená na lahvičce

Hodnocení vyšetření albuminu v séru:

Hypoalbuminémie:

- chronické insuficience jater
- hepatopatie (cirhóza)
- karcinomů, sarkomů
- akutní a chronické hepatitis
- cirhóza jater
- deficitní výživa
- ztráta krve nebo plasmy
- renální ztráty
- rozsáhlé popáleniny
- gastrointestinální choroby
- reakce akutní fáze
- podvýživa, dlouhodobé hladovění
- zvýšený katabolismus u akutních zánětů a nádorů
- hyperhydratace (iatrogenní)

Hyperalbuminemie:

- dehydratace
- chyby v laboratorní analýze

Poznámka:

- *Zvýšenou péči je nutné věnovat dosažení homogenity vzorků.*
- *Stanovení je značně citlivé na změny teploty, proto je nutné dodržovat stejnou teplotu vzorku, standardu a všech slepých vzorků.*
- *Interferuje heparin, zbytky bílkovin, mycích prostředků na skle, séra silně ikterická a hemolytická. Lipemická séra musí být vždy korigována slepým sérovým vzorkem.*

3 PROTEINY II.

3.1 VYSOLOVÁNÍ A DIALÝZA BÍLKOVIN KREVNÍHO SÉRA

Úvod:

Dialýza je proces, který umožňuje pomocí polopropustné membrány oddělovat z roztoku látky nízkomolekulární od látek vysokomolekulárních. Na jejím principu je založena funkce umělé ledviny, kdy krev protéká soustavou dialyzačních tubic omývaných roztokem o specifickém složení iontů. Je samozřejmé, že ionty i ostatní nízkomolekulární látky mohou membránou procházet oběma směry. Dialýza je tedy umělým způsobem odstraňování odpadních produktů a nadbytečné tekutiny z těla, což je proces, který je nutný v případě akutního či chronického selhání ledvin, nebo jejich dysfunkce.

Druhy dialýzy

- ✓ hemodialýza
- ✓ peritoneální dialýza

1) Hemodialýza

Při hemodialýze je krev čerpána přístrojem mimo tělo do dialyzátoru (umělé ledviny). Dialyzátor filtruje metabolické odpadní produkty z krve a vyčištěná krev se poté vrací zpět do těla. Hemodialýza vyžaduje opakovaný přístup do krevního řečiště. Lékaři mohou provést dočasný přístup vložení velkého intravenózního katétru do velké žíly (obvykle krční).

2) Peritoneální dialýza

Peritoneální dialýza je prováděna přes membránu pobřišnice, která funguje jako filtr. Tato membrána má velkou povrchovou plochu a bohatou síť krevních cév. Látky z krve mohou snadno projít přes pobřišnici do abdominální dutiny. Tekutina (dialyzát) je infuzí čerpán pomocí katétru vloženého skrz břišní stěnu do peritoneální prostoru v oblasti břicha. Dialyzát musí zůstat v oblasti břicha po dostatečně dlouhou dobu, aby mohly odpadní produkty z krevního oběhu pomalu přecházet. Poté se dialyzát se vypustí, odstraní a je nahrazen čerstvým dialyzačním roztokem.

Hemodialýza je tedy náhradou funkce ledvin, která pomůže pacientům umožnit obnovu homeostáze při akutním selháním ledvin a případně prodloužit přežití u pacientů se selháním ledvin v konečném stadiu nap. chronického selhání. Hemodialýza je také vhodná pro řešení stavů popálenin a odstranění určitých toxinů z krevního řečiště. V průběhu posledního desetiletí veterinární medicína prohlubuje zkušenosti s hemodialýzou a její dostupnost se zvýšila. Počet veterinárních dialyzačních zařízení se zvyšuje a hemodialýza se tak stává standardem pro moderní péči o zvířata.

Úkol: Izolujte základní bílkoviny krevního séra vysolováním a získané bílkoviny přečistěte dialýzou. O účinnosti dialýzy se přesvědčte kvalitativními reakcemi na důkaz nízkomolekulárních iontů NH_4^+ , SO_4^{2-} v dialyzátu v aktuálních časových intervalech.

Princip: Separace plazmatických bílkovin (albuminu a globulinů) z krevního séra frakcionováním (postupným) vysolováním síranem amonným a následné odstranění nízkomolekulárních látek, včetně vysolovacího činidla dialýzou (zakoncentrování roztoku proteinů).

Uvedená metoda má však svá omezení. Přítomnost některých iontů rozpustnost proteinů naopak zvyšuje. Některé ionty vyvolávají denaturaci (a poškození) bílkovin a tím znemožňují po separaci jejich další využití. V takových případech je nutno zvolit buď jinou sůl, nebo jinou separační metodu.

Činidla:

- síran amonný pevný
 - nasycený roztok síranu amonného: 76,7 g/100 ml deionizované vody
 - Nesslerovo činidlo
 - dusičnan barnatý 0,038 mol/l
 - hydroxid sodný 2,5 mol/l
 - síran měďnatý 0,040 mol/l
-

Dialyzační aparatura: nálevka opatřená semipermeabilní celofánovou membránou, stojan, kádinka, elektromagnetická míchačka, magnetické míchadlo, magnetická tyčinka na vyjmutí míchadla.

Pracovní postup:

- a) Vysolování globulinů: Do malé kádinky odpipetujte 4,0 ml krevního séra a 4,0 ml nasyceného roztoku síranu amonného. Směs dobře promíchejte na elektromagnetické míchačce a poté odstřeďte 3000/ot. po dobu 10 minut. -> bude připraveno. Sediment obsahuje globuliny, v supernatantu je obsažen albumin. Supernatant slijte a použijte ke kvalitativním zkouškám na přítomnost bílkovin (biuretova reakce), iontů amonných (Nesslerovo činidlo) a síranových (dusičnan barnatý). Sediment globulinů přečistěte dialýzou (bod b).
- b) Dialýza globulinů: Sediment globulinů suspendujte v deionizované vodě (asi 1 ml). Vzniklý koloidní roztok globulinů přeneste pomocí pipety do dialyzačního přístroje (z časových důvodů přeneste a dialyzujte pouze 1 ml). Dialyzujte 15 minut proti deionizované vodě v kádince za intenzivního míchání na elektromagnetické míchačce. Poté vypněte míchačku, odeberte asi 3 ml dialyzátu (roztok v kádince) na kvalitativní důkaz bílkovin, iontů síranových a amonných. Zbytek roztoku z kádinky vylijte a nahraďte novou deionizovanou vodou. Pokračujte v dialýze a v 10 min intervalech provádějte kontrolní analýzy (kvalitativní důkazy/d jako v předchozím kroku/b) a sledujte jejich intenzitu. Výsledky zapisujte průběžně do protokolu. Dialýzu proveďte nejméně 3x (tj. celkem 30 minut).

Kvalitativní důkazy:

- Důkaz bílkovin (globulinů, albuminu) biuretovou reakcí: K asi 1,0 ml vzorku přidáme stejný objem roztoku hydroxidu sodného, důkladně promícháme a opatrně přidáme několik kapek roztoku síranu měďnatého. Přítomnost bílkovin indikuje vznik fialového zbarvení. Negativní vzorek má zbarvení modré. U vzorků, které obsahují množství bílkovin blízké mezi detekce zkoušky, je vhodné souběžně analyzovat slepý vzorek (vzorek s předpokládanou bílkovinou nahradit deionizovanou vodou).
- Důkaz amonných iontů Nesslerovým činidlem: K asi 0,5 ml vzorku přikapávejte Nesslerovo činidlo. I stopy amonných iontů způsobují žluté až oranžové zbarvení, popř. hnědočervenou sraženinu. I zde je vhodné souběžně analyzovat slepý vzorek.
- Důkaz síranových iontů dusičnanem barnatým: K asi 0,5 ml vzorku přikapávejte roztok barnatých solí. V přítomnosti síranových iontů vzniká bílá sraženina málo rozpustného síranu barnatého.

Upozornění:

S činidly pracujte opatrně, podle zásad pro bezpečnou práci s chemikáliemi v pracovních rukavicích.

Poznámka:

Vysolování = pokles rozpustnosti sféroproteinů v důsledku vysoké koncentrace určitých solí. Postupné (frakční) vysolování bílkovin z krevního séra (síran amonný, ethanol) patří k nejběžnějším metodám izolace bílkovin.

4 PROTEINY III.

4.1 IZOLACE PROTEINŮ MLÉKA A DŮKAZ JEHO JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Úvod:

Vyšetření mléka

Mléko je u laktujících zvířat nejnáze získatelný biologický materiál. Samotné množství mléka získané při každodenním dojení, dále jeho teplota a makroskopické vlastnosti, mohou upozornit chovatele a veterinárního lékaře na důležitá fakta. Pravidelné analýzy (např. kontroly obsahu bílkovin a tuků v dodávaném mléce) umožňují další kontroly vzhledem k obsahu látek, které vyjadřují kvalitu získaného mléka. Rovněž důležitou roli hrají bakteriologické zkoušky, zjišťování počtu somatických buněk, jakož i měření bodu mrazu. Na základě vyšetření mléka můžeme utvořit názor o celkovém zdravotním stavu zvířete, zahrnující:

- ✓ Stav metabolismu ve vztahu ke krmení
- ✓ Kvalitu mléka
- ✓ Zdravotní stavu vemene

První důležité informace nám poskytne makroskopické vyšetření (barva, zápach, konzistence, obsah krve). Barevné změny – odstín žluté, hnědé, červené nebo modré - poukazují na mastitidy nebo přítomnost rostlinných barviv. Odchytky od specifického mléčného zápachu (ovocný, matový, kafrový, éterický, ostrý, hnilobný, pižmový) bývají způsobeny krmivem nebo mastitidou.

Při změnách konzistence (vodnatá, zahuštěná, úplná ztráta mléčného charakteru) je třeba vyloučit cizí příměsi. Kromě toho jsou pravidelným důsledkem zánětlivých procesů. Totéž platí i o vločkování (drobné bílé, hlenové bílé, hlienovo- hnisavým žluté). Jejich výskyt je prvním podezřením na bakteriální podmíněné mastitidy. Příměsi krve jsou po delším stání výraznější kvůli tvorbě usazeniny, která se podobá hematurii. Mohou mít traumatické, alimentární-toxické nebo infekční příčiny. Zpětné závěry o látkové přeměně i o krmení povolují analýzy obsahu bílkovin, močoviny a tuků, koncentrace ketonových látek jakož i mléčné kyselosti (pH hodnota, Soxhlet-Henkelova kyselost). Mají úzký vztah ke zdravotnímu stavu vemene, a proto korelují s takovými kritérii, jako jsou počet buněk, koncentrace laktózy, K^+ , Na^+ , Cl^- tak užítkovosti.

Mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny se syntetizují z plazmatických aminokyselin. Tyto pocházejí částečně z bachorové syntézy bakteriálních proteinů, postačují přibližně pro 15 kg mléka, a částečně z bypass proteinů. Schopnost proteosyntézy ve vemeni je ve velké míře fixována geneticky, v určité míře je však ovlivnitelná i zásobováním energií a bílkoviny.

Úkol: Proved'te izolaci bílkovin mléka a důkaz jednotlivých složek - důkaz bílkovin, kyseliny fosforečné (vázaného fosforu), vápníku a laktózy.

Teoretická příprava: Mléko-složení, mlezivo - složení, hlavní rozdíly mléka a mleziva, nutriční význam mléka. Syntéza laktózy v laktující mléčné žláze.

Princip:

Kravné mléko obsahuje průměrně 2,9 % fosfoproteinu kaseinu. Izolace hlavního mléčného proteinu je založena na precipitaci kaseinu okyselením mléka na pH 4,7 při 20 °C. Srážení je spojeno s uvolněním části kaseinátového vápníku do vodné fáze. Mléčné albuminy a globuliny lze izolovat po odstranění kaseinu ze zbytku mléka (syrovátky) po přidavku NaCl zahřátím k teplotám varu. Vodná fáze mléka zbavená bílkovin je zdrojem látek rozpustných ve vodě, např. iontového vápníku, fosforečnanů a laktózy, jejichž přítomnost v tomto prostředí lze prokázat kvalitativními zkouškami.

Činidla:

- ledová kyselina octová
- hydroxid sodný 1 mol/l a 2,5 mol/l
- biuretové činidlo: 40 g NaOH, 89 g vlnan sodno-draselný, 5 g CuSO₄ / l deionizované vody
- octan olovnatý 0,03 mol/l
- kyselina dusičná 1,59 mol/l
- soluce molybdenová: 7,5 g molybdenanu amonného se rozpustí za tepla v 50 ml deionizované vody a pomalu se smísí s 50 ml 5,08 mol/l kyseliny dusičné
- chlorid sodný (pevný)
- šřavelan amonný 0,7 mol/l
- Fehlingův roztok I = 40 g/l CuSO₄ · 5H₂O
- Fehlingův roztok II = vlnan sodno-draselný 200 g/l a NaOH 150 g/l
 - **Fehlingovo činidlo:** 1 díl Fehlingova roztoku I a 1 díl Fehlingova roztoku II (**roztok se připravuje těsně před použitím**, po přivedení k varu musí být stabilní bez sraženiny).

Pracovní postup:

Do kádinky (100 ml) odměřte válcem 20 ml mléka a 20 ml deionizované vody.

Izolace kaseinu: Kasein ze zředěného mléka vysrážejte ledovou kyselinou octovou (až 10 kapek). Po promíchání zfiltrujte a získáte **filtrát č. 1**. Uchovejte. Sraženinu kaseinu na filtru rozpust'te v 1 mol/l NaOH (4 až 5 ml). Kasein z tohoto roztoku opět vysrážejte ledovou kyselinou octovou, zfiltrujte a sraženinu na filtru rozpust'te v 2,5 mol/l NaOH (až 7 ml). Vzniklý roztok rozdělte do 3 zkumavek: Obsahy použijete k provedení důkazu bílkovin, fosforečnanů a organické síry, resp. výskytu aminokyselin obsahujících síru v kaseinu.

Izolace mléčných albuminů a globulinů se provádí **ve filtrátu č. 1**. K filtrátu přidejte NaCl (množství cca 1 až 2 malé laboratorní lžičky), promíchejte a dejte zahřívát do vroucí vodní lázně. Po vzniku zákalu kádinku z lázně vyjměte, nechte chvíli volně chladnout na stole. Připravte si filtrační aparaturu s hladkým filtrem (filtrační kruh, filtrační nálevka, kádinka). Po vychladnutí obsah kádinky převed'te tyčinkou na filtr. Vzniklý filtrát označte (filtrát č. 2) a uschovejte k důkazu přítomnosti laktózy, vápníku a anorganického fosforu ve vodné fázi mléka. Poté bílkoviny na filtru propláchněte vodou, vzniklý filtrát označte (filtrát č. 3) a použijte k důkazu bílkovin (albuminů a globulinů).

Kvalitativní reakce:

- ❖ **Průkaz bílkovin** (kaseinu, laktalbuminů a laktoglobulinů) : k 1 ml vzorku přidejte po kapkách biuretové činidlo. V přítomnosti proteinů vznikne **fialové zbarvení** (pozor ne modré ani růžové).
- ❖ **Průkaz fosforečnanů** (fosforu anorganického): K 1 až 2 ml roztoku molybdenové přidejte jen několik kapek vzorku okyseleného kyselinou dusičnou. Povařte na vodní lázni, poté ochlaďte. Po chvíli se vytvoří **žlutá sraženina** fosfomolybdenanu amonného $(\text{NH}_4)_3 [\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \cdot x \text{H}_2\text{O}$.
- ❖ **Průkaz vápníku**: k 1 ml vzorku přidejte asi 0,5 ml šťavelanu amonného. V přítomnosti vápníku vzniká **bílá sraženina** šťavelanu vápenatého $(\text{C}_2\text{O}_4)_2\text{Ca}$.
- ❖ **Průkaz laktosy**: k 2 ml vzorku se přidá 2 ml Fehlingova činidla (1ml Feh. I a 1 ml Feh. II), povařte na vodní lázni. V přítomnosti redukujícího cukru laktosy vznikne na dně zkumavky **cihlově červená sraženina oxidu měďného (Cu_2O)**.
- ❖ **Průkaz síry** (v kaseinu – cystin a cystein): K 2-3 ml vzorku přidejte několik kapek octanu olovnatého a hydroxidu sodného (vznik olovnatanu sodného) vzniklou směs povařte. V pozitivním případě vzniká **černá** (v závislosti na množství a přítomnosti dalších látek) **také hnědošedá, hnědá nebo šedá sraženina** sulfidu olovnatého (PbS).

Poznámka !!!!!

Pro následující praktické cvičení připravte zředěné mléko. Kasein ze zředěného mléka vysrážejte ledovou kyselinou octovou (až 10 kapek) a uložte do poličky nad pracovním stolem.

5 NEBÍLKOVINNÉ DUSÍKATÉ LÁTKY I.

5.1 STANOVENÍ KONCENTRACE MOČOVINY V KREVNÍM SÉRU A LYONORMU

Úkol: Stanovte koncentraci močoviny v krevním séru.

Teoretická příprava: Zdroje amoniaku v tělesných buňkách. Netoxické transportní formy amoniaku v krvi. Ureosyntetický cyklus. Metabolismus argininu.

Princip :

Močovina tvoří s diacetylmonoximem v silně kyselém prostředí za přítomnosti thiosemikarbazidu a železitých iontů červeně zbarvený komplex vhodný k fotometrickému stanovení. Koncentrace močoviny v séru se zvyšuje, když klesá funkční schopnost ledvin. Pro posouzení funkčnosti ledvin má stanovení močoviny rozhodující význam.

Činidla:

- standard : standardní roztok močoviny 16,65 mmol/l
- činidlo 2 : diacetylmonoxim, thiosemikarbazid, železitá sůl **!POZOR! JED!**
- kyselina sírová 1,87 mol/l ; společně s činidlem 2 slouží k přípravě pracovního roztoku
- pracovní roztok - **těsně před analýzou si připravte pracovní roztok** smícháním roztoku činidla 2 a kyseliny sírové v poměru 1 : 1. Připravte si pouze tolik ml pracovního roztoku, které k analýze momentálně potřebujete.

Pracovní postup :

Dávkujte do **krátkých zkumavek** podle následující tabulky:

Činidla	Zkumavky			
	Vzorek 2x	Standard 1x	Slepý vzorek 1x	Lyonorm P 2x
Pracovní roztok (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
Krevní sérum (ml)	0,01	-	-	-
Standard (ml)	-	0,01	-	-
Deionizovaná voda (ml)	-	-	0,01	-
Lyonorm P (ml)	-	-	-	0,01

Hrdla zkumavek uzavřeme hliníkovou fólií (alobal) nebo parafilmem. Zkumavky poté zahříváme **přesně** 10 minut ve vroucí vodní lázni (v kádince nad kahanem) – pracujte opatrně ! Po vyjmutí z vodní lázně zkumavky rychle ochladíme v proudící vodě a do 15 minut změříme v 1 cm kyvetě při vlnové délce **515 nm** absorbanci vzorků (A_{VZ}), standardu (A_{ST}), slepého vzorku (A_{SV}) a Lyonormu (A_L) proti deionizované vodě.

Výpočet:

Pro vzorek séra:

$$\text{Koncentrace močoviny (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{Vz} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

Pro kontrolní sérum - Lyonorm:

$$\text{Koncentrace močoviny (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{Ly} - A_{Sv})}{(A_{St} - A_{Sv})} \times c_{St}$$

c_{St} = koncentrace standardu močoviny (16,65 mmol.l⁻¹)

6 DIAGNOSTICKY VÝZNAMNÉ PROTEINY

Rozdělení plazmatických bílkovin:

- ✓ albumin
- ✓ globuliny
 - $\alpha_1 + \alpha_2$ globuliny
 - $\beta_1 + \beta_2$ globuliny
 - γ globuliny
- ✓ fibrinogen

Frakce plazmatických bílkovin:

- ✓ **Albuminy:** albumin
prealbumin
- ✓ **α_1 -globuliny:** thyroxin-vázající globulin, transkortin, α_1 -kyselý glykoprotein α_1 -antitrypsin, α_1 -lipoprotein (HDL), α_1 -fetoprotein
- ✓ **α_2 -globuliny:** haptoglobin, α_1 -makroglobulin, ceruloplasmin, RBP a antitrombin
- ✓ **β -globuliny:** transferin, hemopexin, β -lipoprotein LDL, fibrinogen, C-reaktivní protein, C3 a C4 složka komplementu
- ✓ **γ -globuliny:** IgG, IgM, IgA, IgD, IgE

Albumin

- ✓ tvoří **35-60%** všech plazmatických bílkovin
- ✓ pouze 30-40% z celkového albuminu je v krvi, zbytek v intersticiu
- ✓ syntézu ovlivňuje osmotický tlak, insulin, thyroxin, kortizol
- ✓ vzniká v hepatocytech (preproalbumin, proalbumin)
- ✓ $T_{1/2} \pm 20$ dnů (druhově různé \downarrow Ca)
- ✓ zajišťuje onkotický tlak
- ✓ umožňuje volnou cirkulaci plazmy kapilárním řečištěm
- ✓ váže vodu a udržuje ji v krevním řečišti
- ✓ transportní funkce
- ✓ extracelulární antioxidant (-SH skupiny cysteinu)
- ✓ negativní reaktant akutní fáze
- ✓ po skončení existence dodává potřebné AMK = nutriční funkce

α_1 -globuliny

Thyroxin-vázající globulin (TBG = thyroxine-binding globulin)
váže asi 60 % thyroxinu T_4 (zbytek na albuminu a prealbuminu)

- váže trijodthyronin (T_3) (menší afinita)
- relativně velké množství u primátů a velkých domácích zvířat, ale v nižších množstvích u psů a koček

- estrogen během gravidity stimuluje syntézu TBG

α_1 -antitrypsin

(α_1 -inhibitor proteas, α_1 -antiproteinasa)

- **tvoří hlavní podíl v α_1 -globulinech**
- reaktant akutní fáze
- inhibitor proteolytických enzymů (elastasy, kolagenasy)
 - *pozn. nedostačující inhibice účinku proteas se projeví zejména v plicích narušením vaziva mezi plicními sklípky způsobí časný vznik emfyzému (juvenilní emfyzém) a rovněž v plicích (astma, COPD)*
- při pankreatitidách „neutralizuje“ proteolytické aktivity trypsinu a chymotrypsinu
- Zvýšení: reakce akutní fáze
- Snížení: onemocnění jater, chronická plicní nemoc

α_1 -lipoprotein

(HDL)

(HDL=high-density lipoprotein)

- zahrnují HDL lipoproteiny
- transport cholesterolu (estery) z periférie do jater (reverzní transport cholesterolu)
- Snížení: reakce akutní fáze

Sérový amyloid A (SAA)

- sumární název pro skupinu plazmatických lipoproteinů, součást HDL₃
- reaktant akutní fáze
- podobný C-reaktivnímu proteinu

Haptoglobin (Hp)

- **slouží k transportu volného hemoglobinu z plasmy do RES sleziny**
- antioxidant - zabraňuje vzniku $\bullet\text{OH}$ na kterém se podílí volný hemoglobin
- komplex Hb-Hp neprochází glomeruly
- Zvýšení: reakce akutní fáze, glukokortikoidy (Ca)
- Snížení: intravaskulární hemolýza, hemolytické anémie, vrozené poruchy krvetvorby, transfuze

α_2 -globuliny

Haptoglobin (Hp)

- **slouží k transportu volného hemoglobinu z plasmy do RES sleziny**
- antioxidant - zabraňuje vzniku $\bullet\text{OH}$ na kterém se podílí volný hemoglobin
- komplex Hb-Hp neprochází glomeruly
- Zvýšení: reakce akutní fáze, glukokortikoidy (Ca)
- Snížení: intravaskulární hemolýza, hemolytické anémie, vrozené poruchy krvetvorby, transfuze

Ceruloplasmin

- **váže a transportuje 90% plazmatické mědi (na 1 molekulu - 6 atomů Cu^{2+})**
- působí jako ferroxidasa
 - $\text{Fe}^{2+} - \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{3+}$
 - brání vzniku nebezpečného $\bullet\text{OH}$ hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí
 - umožní vazbu železa Fe^{3+} na transferin
- při nízké koncentraci ceruloplasminu - hromadění mědi v mozku, v játrech, ledvinách, rohovce (Wilsonova choroba)
- Zvýšení: reakce akutní fáze
- Snížení: dědičně, malnutrice, onemocnění jater

Antitrombin

- hlavním fyziologický koagulační inhibitor
- inhibuje aktivované serinové proteázy (trombin, faktory Xa, IXa, XIa, XIIa)
- regulace hemokoagulace a zamezení trombózy
- inhibiční schopnost je potencována heparinem (v komplexu)
- Zvýšení: akutní hepatitida, cholestáza, deficit vitamínu K, antikoagulační léčba warfarinem

β -globuliny

Transferin (Tf)

- transport plazmatického železa (1 molekula 2 atomy Fe^{3+})
- působí tak jako antioxidant (zabraňuje vzniku ROS)
- za fyziologických okolností celková vazebná kapacita transferinu (TIBC) saturována železem asi z 1/3
- další formy železa jsou **feritin, hemosiderin**
- Zvýšení: akutní onemocnění jater, nefrotický syndrom, chronické hepatopatie
- Snížení: poruchy uskladnění železa, reakce akutní fáze, zánětlivá onemocnění, ztráty železa

Hemopexin

- **s hemem vytváří komplex v poměru 1:1, který je vychytáván hepatocyty (recyklace železa)**
- vazba hemu s hemopexinem tlumí toxické účinky hemu (železa)
- váže hemin uvolněný z MetHb
- Snížení: hemolytická anémie, chronickou aktivní onemocnění jater

β -lipoprotein LDL

- odpovídá lipoproteinu o nízké hustotě (LDL)
- LDL lipoproteiny roznášejí cholesterol pro všechny buňky těla

Fibrinogen

- **součást koagulační kaskády**
- aktivován thrombinem (serinová proteasa) na fibrin

- **fyziologicky jen v plazmě (ne v séru)**
- Zvýšená: akutní fáze reakce
- Snížení: diseminovaná intravaskulární koagulace, dědičná afibrinogenemia

C-reaktivní protein (CRP)

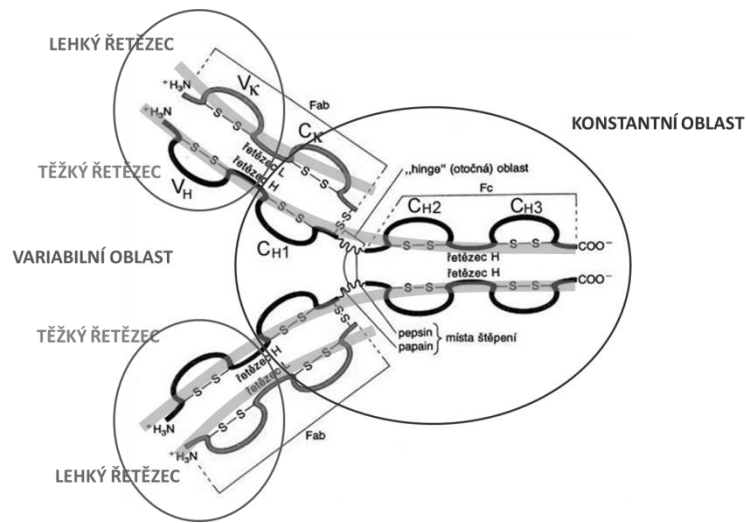
- reaguje za přítomnosti Ca^{2+} s C-polysacharidem buněčné stěny pneumokoků
- **je zapojen do imunitního systému**
- CRP se váže na patogen či umírající buňku (fosfocholin) → aktivace komplementu → **opsonizace** → fagocytóza a uvolňování lymfokinů a modulace fce neutrofilů
- nespecifický marker - infekce, tkáňového poškození, nebo nekrózy spojenou s infarktem
- je to protein akutní fáze zánětu - reaguje nejrychleji největším nárůstem koncentrace

γ -globuliny

Imunoglobuliny

- protilátky produkované B buňkami jako odpověď organismu na stimulaci antigenem
- reagují specificky s antigenními determinanty (epitop)
- struktura:
 - glykoproteiny
 - minimálně 4 polypeptidové řetězce
 - 2 těžké (H) a 2 lehké (L) řetězce spojené disulfidovými můstky
 - řetězce obsahují konstantní oblast (C) a variabilní oblast (V)
 -
- **nemají antimikrobiální vlastnosti**
- podpora buněčného imunitního systému:
 - váží se na antigeny na povrchu patogenů = zabránění jejich interakci s buňkami (**neutralizace**)
 - propojují jednobuněčné patogeny do agregátů (**aglutinace**)
 - aktivují systém komplementu (**opsonizace**)
- diagnostický význam
- u zvířat mnoho podtříd (*Eq*: IgM, IgD, IgA, IgE a IgG1-IgG7)

Schéma imunoglobulinu G:



Reaktanty akutní fáze (Acute Phase Reactants, APRs)

- ✓ kvantitativní markery onemocnění
- ✓ **použití: stanovení diagnózy onemocnění, prognózy, sledování reakce na léčbu, celkový zdravotní screening**
- ✓ citlivé na přítomnost patologických lézí
- ✓ nízká specificita pro konkrétní onemocnění
- ✓ významné rozdíly mezi jednotlivými druhy

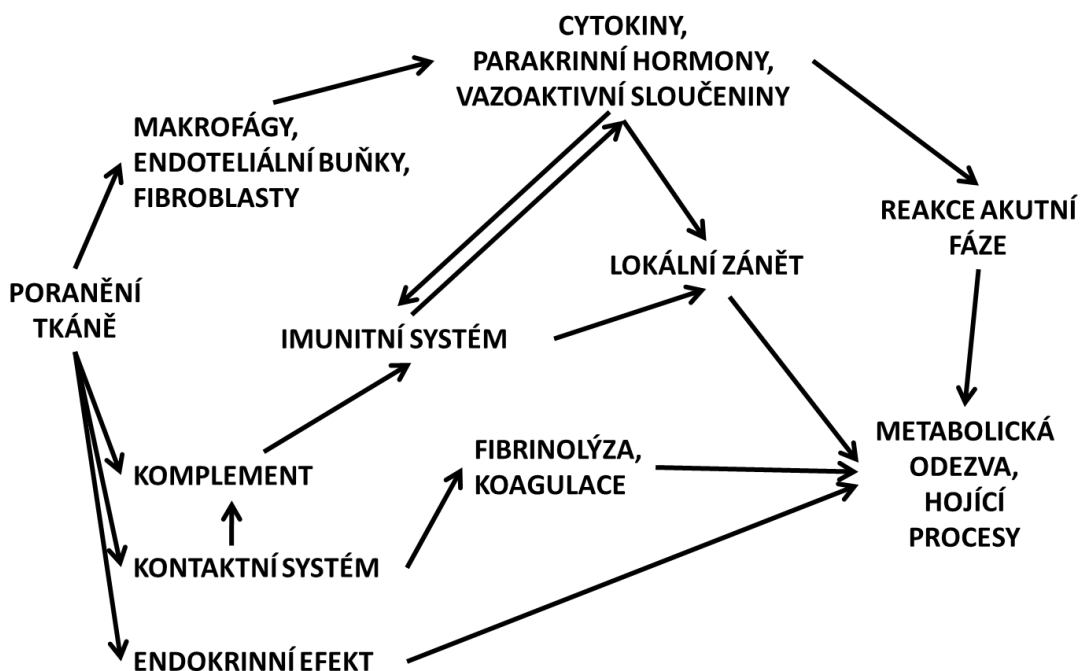
Podmínky stimulující změny koncentrace APRs:

- ✓ zánět
- ✓ infekce
- ✓ trauma
- ✓ nádory

Iniciace procesů:

- ✓ destrukce buněk
- ✓ reverzibilní poškození buněk či tkání a jejich následná reparace (hojení)
- ✓ aktivace některých buněk (imunitní buňky)
- ✓ metabolická odezva organismu

Schéma mechanismů reakce akutní fáze:



Rozdělení reaktantů akutní fáze:

POZITIVNÍ	NEGATIVNÍ
C-reaktivní protein (↑1000x)	albumin (Alb)
α_1 -antitrypsin	transferin (Tf)
fibrinogen	antitrombin
haptoglobin (Hp)	transkortin
C3, C4	protein vázající retinol (RBP)
sérový amyloid (SAA)	transthyretin
ceruloplasmin	
α_1 -kyselý glykoprotein	

7 NEBÍLKOVINNÉ DUSÍKATÉ LÁTKY II.

7.1 STANOVENÍ KONCENTRACE KYSELINY MOČOVÉ VE VLASTNÍ MOČI

Úvod:

Stanovení kyseliny močové v séru a v moči

Zvýšená koncentrace kyseliny močové v krvi (hyperurikémie) může být důsledkem její zvýšené tvorby (včetně zvýšeného přísunu potravou), zvýšeného rozpadu buněk (maligní procesy, leukémie) nebo jejího sníženého vylučování ledvinami. Hyperurikémie může vést k ukládání málo rozpustných krystalů kyseliny močové do tkání a kloubů (dna). Kyselina močová a její soli jsou také často součástí močových sedimentů a konkrementů.

Rozpustnost kyseliny močové a jejich solí

Kyselina močová (2,6,8-trihydroxypurin), hlavní produkt degradace purinových bází u primátů, je vylučována močí. Purinové jádro zůstává tedy během degradačního procesu intaktní. Kyselina močová je látka nepatrně rozpustná ve vodě (25 mg/l při 18° C). Vůči bázím projevuje vlastnosti slabé dvojsytné kyseliny s hodnotami $pK_A = 5,4$ a $10,3$ při 25° C. Rozpustnost kyseliny močové se asi dvacetkrát zvýší v alkalických roztocích, v důsledku tvorby alkalických solí - urátů. Nejvíce rozpustný je urát lithný. Na rozdíl od běžných amonných solí je naopak urát amonný velmi málo rozpustný.

Při degradaci purinů je kyselina močová a vyrábí dalmatské psi mají genetickou vadu v genu pro transportér kyseliny močové kyseliny močové v krvi a proto není metabolizován což vede ke zvýšeným koncentracím v plazmě a moči kyseliny močové. Významné onemocnění mohou být přítomny nebo mohou být náhodné; koreluje s klinickými příznaky. Tito psi mají dostatečnou urikázy v hepatocytech ve srovnání s absencí tohoto enzymu u lidí, ale Dalmatinců nemůže transportovat kyselinu močovou na hepatocyty pro urikázy převést kyselinu močovou na allantoin proto vylučování kyseliny močové v moči. Tyto krystaly mohou být také vidět u psů s primárním jaterním onemocněním, které nejsou převést kyselinu močovou na allantoin a amoniaku na močovinu.

Úkol: Stanovte koncentraci kyseliny močové ve vlastní moči.

Princip: Stanovení kyseliny močové je založeno na jejích redukčních schopnostech. Reakcí s kyselinou fosfowolframovou v alkalickém prostředí vzniká zbarvený komplex wolframové modři. Jeho koncentrace se stanovuje fotometricky při 650 nm.

Činidla:

- fosfowolframové činidlo
- nasycený roztok uhličitanu sodného
- standardní roztok kyseliny močové (1mg/100ml)

K analýze použijte připravená činidla a vlastní moč.

Pracovní postup:

Vzorek moči je nutno před analýzou naředit 50x a 100x. K tomu použijte odměrné baňky, řed'te deionizovanou vodou a po zazátkování dobře promíchejte.

Do zkumavek pipetujte dle následující tabulky:

Činidla, vzorky:	Zkumavky:		
	Vzorek 3x pro každé ředění	Standard 1x	Slepý vzorek 1x
Zředěná moč (ml)	2,0	-	-
Standard (ml)	-	2,0	-
Deionizovaná voda (ml)	-	-	2,0
Nasycený roztok sody (ml)	1,0	1,0	1,0
Fosfowolframové činidlo (ml)	0,1	0,1	0,1

Obsah zkumavek dobře promíchejte a chraňte před světlem – vložte zkumavky do skříňky stolu. Nechejte 10 minut stát. Poté změříme na spektrofotometru při vlnové délce při 650 nm proti deionizované vodě. Absorbanci lze měřit v rozmezí 60 min. Naměřené absorbance vzorku (A_{VZ}), slepého vzorku (A_{SV}) a standardu (A_{ST}) dosad'te do vzorce pro výpočet koncentrace kyseliny močové.

Výpočet:

$$\text{Koncentrace kyseliny močové (mg. 100 ml}^{-1}) = \frac{(A_{vz} - A_{sv})}{(A_{st} - A_{sv})} \times c_{st}$$

c_{st} – tj. koncentrace standardu (uvedena na lahvičce roztoku standardu)

Nezapomeňte zohlednit ředění vzorků!

$$\text{mg/100 ml} \times 0,05948 = \text{mmol/l}$$

Referenční hodnoty pro danou metodu u člověka:

- 0,25 - 1,0 g kyseliny močové za 24 hodin. (2,4 - 3,5 mmol/l)

Poznámka:

U zdravých lidí má exkrece kyseliny močové značné rozpětí hodnot, zpravidla 2,4 – 3,5 mmol/den. Množství závisí na obsahu purinových nukleotidů ve stravě. Má-li se získat představa o syntéze a degradaci nukleových kyselin v organismu, je nutné provést stanovení endogenního urátu, tj. při stravě s minimálním množstvím purinových bází.

Při vylučování kyseliny močové vyšším než 6 mmol/den je riziko urolitiázy až 50 %. Důležité je i pH moči – hodnoty pod 5 rovněž zvyšují pravděpodobnost vzniku močových kamenů. Hyperurikemie může vyvolávat poškození ledvin, které spočívá v ukládání krystalů kyseliny močové v ledvinných tubulech nebo intersticiu.

Při terapii hyperurikemie hrají roli i režimová opatření – vynechání alkoholu, snížení hmotnosti a hlavně omezení příjmu purinů.

Ptáci a plazi:

Kyselina močová představuje hlavní exkreční produkt katabolismu purinů u ptáků a plazů. Pro posouzení stavu a funkce ledvin u plazů má praktický význam kvantitativní sledování kyseliny močové, vápníku a fosforu.

Individuální rozdíly v koncentraci kyseliny močové v krvi nejsou tak významné, jako rozdíly mezidruhové (např. hadi x želvy/terestrické x akvatické druhy).

7.2 MUREXIDOVÁ ZKOUŠKA

Úkol: Proved'te důkaz kyseliny močové murexidovou zkouškou.

Princip: Kyselina močová se oxidačně štěpí koncentrovanou HNO_3 na alloxan a močovinu. Vzniklý alloxan po přidání koncentrovaného amoniaku vytváří amonnou sůl kyseliny purpurové, tzv. murexid.

Činidla:

- roztok kyseliny močové v NaOH, resp. urát sodný (aliquot roztoku z úkolu A)
 - koncentrovaná HNO_3
 - koncentrovaný NH_3
-

Pracovní postup:

Kyselinu močovou v množství na špičku nože (několik krystalků) suspendujte ve 2 ml deionizované vody ve zkumavce. Poté po kapkách přidávejte NaOH tak dlouho, až se veškerá kyselina močová rozpustí (vzniká rozpustný **urát sodný**).

Dále **pracujte v digestoři**. Na porcelánovou misku napipetujte cca 3-5 kapek roztoku urátu sodného a přidejte stejné množství konc. HNO_3 . Poté opatrně, pozvolna odpařte nad plamenem v digestoři do sucha. Odpařování provádíte na misce, kterou držíte rukou (okraj nesmí být teplejší, než jaký snesete) a vzniklý odparek musí mít okrové zbarvení.

Nikdy neodpařujte zahříváním misky na stojanu se sít'kou!

K odparku přikápněte několik kapek konc. NH_3 . Vzniká **červenofialové** zbarvení murexidu.

Poznámka:

- 1) *Nejčastější chybou bývá nevhodný poměr mezi kyselinou dusičnou a močovou, krátké nebo dlouhé odpařování a spálení vzorku.*
- 2) *Této reakce se využívá při rozboru močového konkrementu, dále k důkazu samotné kyseliny močové získané stěrem z dutiny ústní, břišní, z perikardu (viscerální forma dny u plazů).*

8 TETRAPHYROLY

8.1 CHEMICKÝ PRŮKAZ KRVE TVORBOU TEICHMANOVÝCH KRYSTALŮ

Úkol: Proved'te chemický průkaz krve tvorbou Teichmanových krystalků

Teoretická příprava: Biosyntéza hemoglobinu, methemoglobinreduktasa a glutathionperoxidasa erytrocytů. Zdroje peroxidu vodíku v erytrocytech a způsoby jeho eliminace.

Princip: Působením zředěných kyselin na hemoglobin dojde k jeho rozštěpení na globin a hem, který se v přítomnosti chloridů přeměňuje na chlorhemin. Chlorhemin se vyznačuje charakteristickým tvarem krystalů pro daný živočišný druh.

Činidla:

➤ Rostok ledové kyseliny octové s přidavkem halogenových solí (KI + KBr + KCl)

Pracovní postup:

Na podložní sklo dejte jednu kapku krve a rovnoměrně ji rozetřete. Sklíčko protáhněte 3× nad nesvítivým plamenem kahanu, přikryjte krycím sklem a přikápněte 4 kapky kyseliny octové s halogenovými solemi. Opatrně zahřívejte k varu. **Skříčko nesmí vyschnout!!** Znovu přidejte ještě několik kapek tohoto činidla a uveďte opět do varu. Pod mikroskopem pozorujte vzniklé krystalky chlorheminu – Teichmanovy krystalky (lokalizace nejčastěji při okraji krycího sklíčka). Krystalky zakreslete.

Poznámka:

Je třeba dodržet optimální poměr mezi krví a činidlem. Nátěr musí být neustále vlhký, tj. kapalina se nesmí úplně vypařit a současně doba záhřevu musí být dostatečná k vytvoření krystalků.

8.2 STANOVENÍ CELKOVÉHO BILIRUBINU V KREVNÍM SÉRU.

Úvod:

Bilirubin vzniká z převážné části štěpením hemoglobinu, malá část (do 20 %) z myoglobinu, cytochromu a katalázy. Nejprve dochází k uvolnění železa a v RES (slezina, Kupfferovy buňky jater, kostní dřeň, po krvácení také jiné tkáně) vzniká primární, ve vodě nerozpustný, v tuku rozpustný bilirubin (bilirubin I). Tento bilirubin se po uvolnění z RES transportuje krevní plazmou, vázán na sérový albumin. Ledvinami se primární bilirubin nevylučuje, pouze v případě, že je tvořen v ledvinách samotných v souvislosti s renálním krvácením či po resorpci hemoglobinu z primární moci v proximálním tubulu.

Primární, na albumin vázaný bilirubin, se krvi dostává do jater, kde přichází do styku s hepatocyty. Tam, na portálním pólu hepatocytu, dojde k uvolnění barviva z albuminu a bilirubin I vstupuje do hepatocytu. Uvnitř hepatocytu dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou za vzniku vodorozpustného **bilirubin-diglukuronidu**, tedy bilirubinu II, který je přes intaktní mikrokylky na kanalikulárním pólu hepatocytu se žlučí vylučován do tenkého střeva.

Teoretická příprava:

Degradace hemoglobinu, biliverdin, bilirubin, sterkobilin, urobilin; urobilinogen, kyselina glukuronová – biosyntéza a funkce.

Princip:

Bilirubin kopuluje s diazotovanou kyselinou sulfanilovou na roztok azobarviva, který je vhodný k fotometrickému stanovení. Stanovení celkového bilirubinu se provádí v prostředí s akcelerátorem.

Činidla:

- **čínidlo 1** - roztok kyseliny sulfanilové a kyseliny chlorovodíkové
- **čínidlo 2** - akcelerátor: kofein, octan sodný, benzoan sodný a chelaton III.
- **čínidlo 3** - pufr: vinan sodno-draselný a hydroxid sodný
- **čínidlo 4** - dusitan sodný (JED!!!)
- **roztok 1** – čínidlo 2 rozpuštěné ve 170 ml deionizované vody – **máte připraveno!**
- **roztok 3** - těsně před stanovením **si sami připravíte** roztok 3 smícháním 1 ml **čínidla 1** a 25 μ l **čínidla 4** – NaNO₂

Pracovní postup:

Do **vyšokých zkumavek** pipetujte činidla dle tabulky:

Činidla [ml]	Vzorek (2×)	Slepý vzorek (1×)
Sérum (ml)	0,1	0,1
Roztok 3 (ml)	0,2	-
Čínidlo 1 (ml)	-	0,2
Roztok 1 (ml)	0,8	0,8

Obsah zkumavek ihned promíchejte a nechte stát 10 min **ve tmě** (ve skřínce stolu) a dále postupujte podle tabulky:

Čínidlo 3 (ml)	0,6	0,6
----------------	-----	-----

Obsah zkumavek opět promíchejte a ponechte stát 10 min **ve tmě** (ve skřínce stolu).

Změřte při vlnové délce **600 nm** absorbanci vzorku (A_{VZ}) a absorbanci slepého vzorku (A_{SV}) proti deionizované vodě. Zbarvení je za nepřístupu světla stále minimálně 30 minut.

Výpočet: Obsah bilirubinu ve vzorku odečtete z kalibračního grafu. K odečtení použijte absorbanci vypočtenou ze vztahu $A_{VZ} - A_{SV}$.

Poznámka:

Analýzu je nutné provádět za nepřístupu světla. Na světle klesá zbarvení azobilirubinu asi o 10 % během 15 minut. Pokud by nebyl měřen slepý sérový vzorek, mohou být ve vzorku nalezeny falešně vyšší hodnoty bilirubinu podle druhu séra o 2 – 14 μ mol/l. Použitá séra musí být čirá a nehemolytická

9 MED

9.1 STANOVENÍ KYSELOSTI MEDU, KA 2110/1-6

Úvod:

S obsahu kyselin v medu přímo souvisí jeden z důležitých parametrů jeho kvality – kyselost medu. Jsou rozeznávány tři druhy kyselosti: volná, laktonová a celková. Pro vyjadřování kyselosti medu se obvykle používá termín volná kyselost, která je definována jako obsah všech volných kyselin obsažených v medu. Kyselost medu je vyjadřována v miliekvivalentech (mekv) na 1 kg medu.

Kvalitní medy z České republiky většinou obsahují běžně do 30 mekv kyselin/kg medu. Při vytočení nevyzrálých medů s vyšším obsahem vody nebo při nevhodném skladování může dojít k procesu kvašení medu, při kterém dochází ke zvýšení obsahu organických kyselin a tím i ke snížení celkové kvality medu. Limit dle norem je do 40 mekv kyselin/kg.

Celkovou kyselost medu lze rovněž vyjádřit i jako hodnotu pH. Medy mají průměrné pH od 3,9 do 4,0, při čemž medy nektarové jsou kyselejší (pH 3,4) a medovicové mohou obsahovat až pH 6,1. Příčinou menší aktivní kyselosti medovicových medů je vyšší obsah minerálních látek, které působí tlumivě na kyselost.

Kyseliny jsou v medu obsaženy ve všech druzích a způsobují kyselou reakci a chuť. Nejdůležitější kyselinou v medu je kyselina glukonová (vzniká z glukózy enzymatickou oxidací). V medu je obsažena spíše ve formě laktonu, které tvoří asi třetinu celkové kyselosti medu. V medu jsou dále ve významném množství přítomny kyselina citrónová, jablečná a jantarová. V malém množství pak kyseliny octová, mravenčí, máselná, mléčná, šťavelová, glykolová a 2-oxoglutarová. Bohaté spektrum organických kyselin je znakem pravosti medu, cukerné zásoby včel jsou na organické kyseliny chudé. Kvalitativní i kvantitativní zastoupení organických kyselin v medech je velice variabilní a závisí hlavně na botanickém druhu medu, ale může být ovlivněno také procesem zrání medu a způsobem jeho skladování po vytočení.

Úkol: Stanovte kyselost vzorků medu.

Princip: Stanovení kyselosti medu je založeno na alkalimetrickém stanovení s využitím odměrného roztoku hydroxidu sodného titrační metodou na acidobazický indikátor fenolftalein.

Činidla:

- ✓ Hydroxid sodný ($c = 0,1 \text{ mol/l}$)
 - ✓ Etanolvý roztok fenolftaleinu ($c = 1\%$)
-

Postup:

- 1) navážíme do kádinky 10 g medu (v případě tmavého medu činí navážka 5 g, u výsledku nutno násobit dvěma),
- 2) přidáme 75 ml destilované vody a rozmícháme tyčinkou,
- 3) přidáme 5 kapek fenolftaleinu,
- 4) titrujeme 0,1 M hydroxidem sodným do růžového zbarvení, které vydrží 10 sekund,
- 5) titraci je nutno provést během 1 minuty,
- 6) odečteme výslednou spotřebu hydroxidu sodného na desetiny mililitru.

Výpočet:

Kyselost medu je vyjádřena jako miliekvivalent kyseliny na 1 kg medu. Výsledek se vyjádří jako spotřeba hydroxidu sodného $\times 10$. Při analýze navážky 5 g vzorku se výsledná spotřeba vynásobí dvěma.

10 NUKLEOPROTEINY

10.1 IZOLACE NUKLEOPROTEINŮ Z KVASNIC A PRŮKAZ JEJICH SLOŽEK

Úkol: Izolujte nukleoproteiny z kvasnic a kvalitativními reakcemi prokažte jednotlivé složky.

Teoretická příprava: Purinové a pyrimidinové báze nukleových kyselin. Významné metabolity a intermediáty.

Princip:

Z porušených buněk kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae*, rasa droždářenská) lze kyselým roztokem ethanolu extrahovat a vysrážet nukleoproteiny, které hydrolyzujeme za varu kyselinou sírovou. Hydrolyzát obsahuje mimo degradační produkty bílkovin také degradační produkty nukleových kyselin: purinové a pyrimidinové báze, kyselinu fosforečnou a pentosy (ribosa, deoxyribosa). Uvedené látky se prokazují kvalitativními reakcemi a to: purinové báze jako nerozpustné stříbrné soli, kyselinu fosforečnou molybdenanem amonným jako nerozpustný žlutý fosfomolybdenan amonný a pentosy reakcí s orcinem, floroglucinem nebo difenylaminem. Pentosy po odštěpení molekuly vody silnou kyselinou vytvářejí furfural, který s uvedenými látkami dává barevné kondenzační produkty.

Činidla:

- ✓ chlorid sodný (pevný)
 - ✓ kyselina octová 1,7 mol/l • roztok konc. amoniaku.
 - ✓ ethanol
 - ✓ kyselina octová konc., tzv. ledová
 - ✓ kyselina sírová 1,1 mol/l,
 - ✓ orcinové činidlo: 1g orcinu v 500 ml 9,5 mol/l HCl, přidá se 4 - 5 ml FeCl₃ (10g/ 100 ml),
 - ✓ roztok floroglucinu (1,3,5-trihydroxybenzen dihydrát): 2 g v 1000 ml 9,5 mol/l-HCl,
 - ✓ roztok molybdenanu amonného v kyselině dusičné: 7,5 g molybdenanu amonného se rozpustí ve 100 ml vody a přidá se 100 ml 6 mol/l HNO₃
 - ✓ amoniakální roztok stříbra /k roztoku AgNO₃ (5g/100 ml) se přidává koncentrovaný roztok amoniaku, pokud se vzniklá sraženina nerozpustí/,
 - ✓ Discheho činidlo: 1g difenylaminu se rozpustí ve 2,5 ml konc. kyseliny sírové a doplní se do 100 ml konc. kyselinou octovou.
-

Pracovní postup:

- 1) Do vysoké kádinky (objem 600 ml) odměřte 42 ml deionizované vody. V ní rozpustíte 4,2 g NaCl a poté přidejte 42 g (kostka) rozdrobených kvasnic, které musíte dobře tyčinkou rozmíchat na homogenní suspenzi.
- 2) Suspenzi povařte opatrně za častého míchání nad plynovým kahanem. Suspenze nesmí překypět.
- 3) Přidejte 8,4 ml 1,7 mol/l CH₃COOH a obsah znovu uveďte do varu.
- 4) Po ochlazení kádinky pod tekoucí vodou rozlijte suspenzi přibližně stejně do dvou velkých plastových centrifugačních zkumavek a odstředte při 3000 otáčkách/ 10 minut.
- 5) Odpipetujte 1 ml supernatantu do dvou zkumavek (pro důkaz glutathionu), zbytek čirého žlutého supernatantu opatrně slijte do odměrného válce a změřte objem.
- 6) Z válce přelijte supernatant do 400 ml kádinky a přidejte dvojnásobný objem ethanolu a několik kapek koncentrované kyseliny octové. Obsah dobře promíchejte tyčinkou a ponechejte v chladničce po dobu 15 minut.

- 7) Vyndejte opatrně kádinku z ledničky a nezviřte sraženinu nukleoproteinů. Odlejte co nejvíce roztoku (dekantace) a zbytek spolu se sraženinou filtrujte na skládaném filtru (při nedostatku času odstřed'te).
- 8) Vlhkou sraženinu na filtru opatrně seškrábněte do kádinky (vysoká, objem 100 ml), která obsahuje 10 ml 1,1 mol/l H_2SO_4 .
- 9) Hydrolyzujte ve vroucí vodní lázni minimálně 10 min.
- 10) Obsah zfiltrujte a filtrát (hydrolyzát) nukleoproteinů použijte k dalším analýzám.

Následující reakce jsou kvalitativní a lze proto při dodržení poměru vzorek/činidlo přizpůsobit množství roztoků v reakci množství hydrolyzátu, který máte k dispozici.

- **Důkaz kyseliny fosforečné:** K 1 ml hydrolyzátu přidejte stejný objem roztoku molybdenanu amonného v kyselině dusičné a zahřejte ve vodní lázni. Vznikne žlutá sraženina fosfomolybdenanu amonného.
- **Důkaz purinových bází:** K 1 ml hydrolyzátu přidejte 5-6 kapek roztoku amoniaku do alkalické reakce (na lakmus) a dále 0,5 ml amoniakálního roztoku stříbra. Vznikne bílá sraženina stříbrných solí purinových bází, jež pozvolna sedimentuje.



Důkaz pentos:

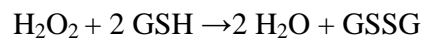
- a) **Reakce s orcinem:** Do zkumavky odměřte 1 ml orcinového činidla a zahřejte do varu s 5 – 6 kapkami hydrolyzátu nukleoproteinů. Za 2 – 3 min vznikne zelené zbarvení.
- b) **Reakce s floroglucinem:** 1 ml roztoku floroglucinu zahřejeme ve zkumavce s 5–6 kapkami hydrolyzátu až do vytvoření červeného (resp. nahnědlého) zbarvení. V případě nahnědlého zbarvení zřed'te obsah zkumavky malým množstvím vody.
- c) **Reakce s difenylaminem:** K 1 ml hydrolyzátu přidejte 2 ml Discheho činidla, promíchejte a zahřívajte ve vroucí vodní lázni až do vzniku modrého zbarvení (deoxyribosa), případně zeleného zbarvení (ribosa). Rozlišovací barevná reakce obou pentos.

10.2 DŮKAZ GLUTATHIONU

Úvod:

Glutathion – nejvýznamnější intracelulární antioxidant, chemicky je tripeptid (-glutamylcysteinylglycin). Vyskytuje se v redukované a oxidované formě. V redukované formě je thiol, v oxidované formě disulfid. Je nutné udržet stabilní poměr redukované a oxidované formy (GSH/GSSG). Převahu má redukovaná forma před oxidovanou. Hlavním posláním redukované formy glutathionu je ochrana bílkovin obsahujících sulfhydrylové skupiny. Glutathion se svým antioxidantním působením uplatní v likvidaci peroxidu vodíku a organických hydroperoxidů v buňce.

Glutathionperoxidáza je enzym, který katalyzuje redukci peroxidu vodíku a současnou oxidaci glutathionu na oxidovanou formu glutathionu (GSSG).



Glutathionperoxidáza se vyskytuje ve třech formách – cGSHPx (výskyt v cytoplazmě), eGSHPx (výskyt v krevní plazmě, extracelulární tekutině) a pGSHPx (fosfolipidová glutathionperoxidáza). Fosfolipidová forma chrání i fosfolipidy biomembrán a přeměňuje řetězovou reakci lipidů (lipoperoxidaci), kdy brání tvorbě malondialdehydu. Ve vztahu ke glutathionperoxidase je nutné uvést význam selenu zastoupeného v aminokyselině selenocysteinu, kdy nedostatek selenu vede k poklesu aktivity glutathionperoxidázy.

Glutathionreduktáza katalyzuje přeměnu oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za spotřeby $\text{NADPH} + \text{H}^+$, tímto tedy regeneruje redukovanou formu glutathionu. Obsahuje dvě podjednotky s flavinem jako aktivní částí.



Úkol: Dokažte přítomnost redukované formy glutathionu v extraktu z kvasnic

Teoretická příprava: funkce glutathionu v somatických buňkách, v erytrocytech, glutathion-S-transferasa.

Princip: Glutathion se dokazuje barevnou reakcí nitroprussidu sodného se skupinou (-SH) glutathionu v alkalickém prostředí.

Činidla:

- ✓ NaOH 2,5 mol/l
 - ✓ roztok nitroprussidu sodného 1g/100 ml v nasyceném roztoku síranu amonného
-

Pracovní postup:

K cca 1 ml extraktu z kvasnic přidejte několik kapek roztoku nitroprussidu a poté 0,5 ml NaOH po kapkách. Za přítomnosti redukované formy glutathionu (-SH skupiny) se roztok zabarví intenzivně červeně. Oxidovaná forma (disulfidická) tuto reakci nedává. Při delším stání červené zbarvení slábne. Změnu červeného zbarvení na žluté lze vyvolat nadbytkem hydroxidu. Ověřte a diskutujte v závěru protokolu.

11 INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA V BIOCHEMII

Biochemický analyzátor IDEXX VetTest



- biochemický analyzátor IDEXX VetTest® nabízí přesnost díky technologii dry-slide, která minimalizuje účinky interferujících látek (lipémie, hemolýza, ikterus), takže můžete činit spolehlivá lékařská rozhodnutí
- na výběr z 26 parametrů seřazených v různých hotových panelech nebo individuálních testech
- k dispozici 39 individuálních referenčních rozsahů, které jsou specifické pro jednotlivé druhy a věk
- všechny výsledky jsou k dispozici během cca osmi minut (šest minut trvá test plus dvě minuty na přípravu při použití plazmy).

Biochemické parametry analyzátoru IDEXX VetTest®

Lze stanovit 24 parametrů u 38 druhů zvířat:

S pohodlným výběrem hotových panelů a individuálních biochemických testů v sadách po 12 testech a 25 testech můžete:

- upravit si diagnostické protokoly podle rozdílů vyplývajících z druhu a věku
- upravit si panely na monitorování choroby a medikace pro péči zaměřenou na pacienta

Testy na jednotlivých slidech - jednotlivé biochemické parametry:
(12/25 slidů v krabičce)

GLU = Glukóza
TP = Celkové bílkoviny
ALB = Albuminy
GLOB = globuliny*
TRIG = Triglyceridy
NH₃ = Amoniak
ALT = Alanin aminotransferáza
AST = Aspartát aminotransferáza
LDH = Laktát dehydrogenáza
CK = Kreatin kináza
ALP = Alkalická fosfatáza
GGT = Gama-glutamyl transferáza
AMYL = Amyláza
LIPA = Lipáza
LACT = Laktát
CREA = Kreatinin
PHOS = Anorganický fosfát
UREA = Močovina
URIC = Kyselina močová
CHOL = Cholesterol
Ca²⁺ = Vápník
Mg²⁺ = Hořčík

*vypočítaný parametr

Hotové panely:

➤ **Diagnostický zdravotní profil**

Stanovte diagnózu klinicky nemocných pacientů na základě kompletního diagnostického zdravotního profilu.

(13 biochemických parametrů v jednom panelu (jedna vypočítaná hodnota), 2 panely v krabičce)

ALB, ALKP, ALT, AMYL, BUN, Ca, CREA, GGT, GLU, LIPA, TBIL, TP, GLOB*

➤ **Monitorovací panel NSAID**

Pět cílených testů doporučených k monitorování pacientů léčených pomocí NSAID.

(5 biochemických parametrů v jednom panelu, 4 panely v krabičce)

ALKP, ALT, AST, BUN, CREA

➤ **Celkový zdravotní profil**

Nejúplněší panel, který se používá k základnímu stanovení zdravotního stavu, screening u starších zvířat a posouzení stavu nemocných zvířat.

(13 biochemických parametrů v jednom panelu (jedna vypočítaná hodnota), 2 profily v krabičce)

ALB, ALKP, ALT, AMYL, BUN, Ca, CHOL, CREA, GLOB*, GLU, PHOS, TBIL, TP

➤ **Preanestetický panel**

Zajistěte bezpečnou anestézii pacienta pomocí pohodlného panelu s šesti biochemickými parametry.

(6 biochemických parametrů v jednom profilu, 4 profily v krabičce)

ALKP, ALT, BUN, CREA, GLU, TP

➤ **Panel zdravotního stavu koní**

Všechny biochemické parametry, které potřebujete na testování koní, v jedné pohodlné sadě. (13 biochemických parametrů v jednom panelu (jedna vypočítaná hodnota), 2 panely v krabičce)

ALB, ALKP, AST, BUN, Ca, CK, CREA, GGT, GLOB*, GLU, LDH, TBIL, TP

➤ **Zdravotní stav ptáků**

Diagnostikujte onemocnění u mnoha druhů ptáků; můžete provést celý profil nebo jen jednotlivé slidy, které potřebujete.

(6 biochemických parametrů v jednom panelu (plus vypočítaná hodnota GLOB*), 4 panely v krabičce)

ALB, AST, Ca, GLU, TP, URIC, GLOB*

➤ **Poměr P:C v moči**

Detekujte a kvantifikujte proteinurii podle poměru P:C (protein:kreatinin) v moči a diagnostikujte renální choroby v raném stádiu, dříve než se u zvířete projeví azotemie.

(Používat se sadou na přípravu vzorků; 2 biochemické parametry v jednom poměru, 6 poměrů v krabičce)

UCRE, UPRO

➤ **Panel na kontrolu kvality**

Pomáhá zajistit ty nejpřesnější výsledky testů pro vaše pacienty – všechny biochemické parametry, které potřebujete pro komplexní kontrolu kvality u vašeho analyzátoru VetTest®.

(6 slidů v jednom panelu, 4 panely v krabičce)

ALB, ALKP, ALT/SGPT AST, Ca, GLU, NH₃
Technologie IDEXX VetTest® Dry-Slide

Při odběru biologického materiálu se vždy nemusí podařit odebrat tzv. „čistý“ vzorek krve (bez vad) a to zejména jedná-li se o nemocné nebo stresované zvíře.

- Vzorky od pacientů, kteří nedávno jedli, mohou být lipemické (mastné sérum).
- Vzorky od nemocných pacientů mohou být ikterické (žloutenka).
- Vzorky od pacienta, který se při vyšetření urputně brání, mohou být hemolytické (červeně zbarvené sérum).

Na následujícím obrázku je znázorněno, že biochemické slidy VetTest jsou vybaveny filtrační vrstvou, která minimalizuje účinky těchto interferujících látek. Konstrukce dry-slide s několika vrstvami odfiltruje látky, které by mohly zkreslit výsledky, což zajišťuje větší přesnost.

Na horní stranu nanášecí vrstvy se aplikuje vzorek pacienta.



Použití biochemického analyzátoru IDEXX VetTest®

Vzorek plazmy nebo séra můžete analyzovat pomocí zkumavky s lithiem a heparinem s gelovou bariérou. Vzorek plazmy poskytuje rychlejší výsledky, takže můžete rychle posoudit stav vašeho pacienta, stanovit diagnózu a zahájit léčbu ještě v průběhu návštěvy pacienta.

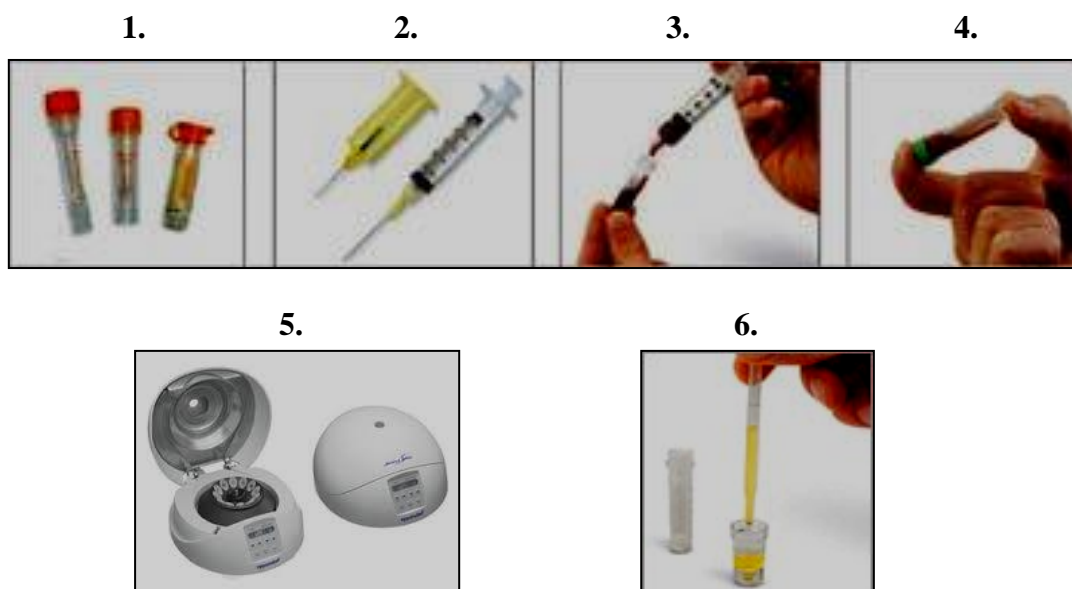
Plazma

Doporučujeme používat zkumavku s lithiem a heparinem s gelovou bariérou.

Pozn.: Aby nedošlo se sražení krevního vzorku, obsahují zkumavky antikoagulant a inertní polymerní gel, který během centrifugace vytvoří bariéru mezi buňkami a krevní plazmou.

Postup:

- 1) Použijte správnou zkumavku (obr. 1.).
- 2) Použijte správnou pomůcku na odběr vzorku (obr. 2.).
- 3) Vzorek odebírejte opatrně (obr. 3.).
(Použijte správný poměr krve k heparinu, 50-100IU heparinu/ml krve)
- 4) Opatrně vzorkem otáčejte po dobu 30 vteřin, aby se promíchal (obr. 4.).
- 5) Vzorky odstředte (standardní odstředivka - 3000 ot./10 minut) (obr. 5.).
- 6) Přeneste vzorek plazmy do kelímku nebo zkumavky pro snadný přístup špičky analyzátoru (obr. 6.).



Sérum

Postup:

- 1) Použijte správnou zkumavku (obr. 1.).
- 2) Použijte správnou pomůcku na odběr vzorku (obr. 2.).
- 3) Vzorek odebírejte opatrně (obr. 3.).
- 4) Nechte vzorek srážet minimálně 20 minut.
- 5) Vzorky odstředte (standardní odstředivka - 3000 ot./10 minut) (obr. 5.).
- 6) Přeneste vzorek plazmy do kelímku nebo zkumavky pro snadný přístup špičky analyzátoru (obr. 6.).

1.



2.



3.



4.



5.



6.



Vlastní provedení analýzy:

V hlavní nabídce analyzátoru VetTest vyberte NEW SAMPLE (nový vzorek) a podle pokynů na obrazovce запиšte informace o pacientovi. Po výzvě zasuňte slidy.

1. Nasaďte na pipetu pevně špičku.
2. Držte pipetu vertikálně. NEŽ stisknete tlačítko, položte špičku do středu vzorku. Stiskněte tlačítko na pipetě. Uslyšíte 1 PÍPNUTÍ; zkontrolujte, zda se vzorek nasál do špičky.
3. Při 2 PÍPNUTÍCH vyjměte pipetu z kelímku.
4. Při 3 PÍPNUTÍCH otřete špičku pipety utěrkou, která nepouští vlákna. Špičku otírejte krouživým pohybem.
5. Prohlédněte si špičku pipety a zkontrolujte, zda v ní není vzduchová bublinka. Dejte pipetu zpět do držáku v analyzátoru. Zbytek testu proběhne automaticky.



Vzorek před a po nasátí vizuálně zkontrolujte.

Rychlá kontrola odhalí, zda vzorek neobsahuje cizí částice nebo vzduchové bublinky, což by mohlo způsobit nepřesné nanesení na slide. Jestliže zjistíte přítomnost cizích částic nebo vzduchových bublinek, průběh testu zrušte tlačítkem „C“ a naberte vzorek znovu s novou špičkou na pipetě.

Tento studijní materiál byl zpracován z informací k Biochemickému analyzátoru IDEXX VetTest, firmy Cymedica spol. s.r.o.,

dostupné na www.cymedica.com

12 MOČOVÁ ANALÝZA

12.1 KVALITATIVNÍ ANALÝZA MOČE, HODNOCENÍ MOČOVÉHO SEDIMENTU, MOČOVÁ ANALÝZA SYSTÉMEM POCKET CHEM PU 4010, KA 2110/1-9

Úkol: Proved'te makroskopické posouzení (zbarvení, pach, zákal, pěna...).

Proved'te důkazy patologických součástí moči kvalitativními zkouškami ve zkumavkách (proteiny, glukosa, ketolátky, krev, žlučová barviva a žlučové kyseliny).

Teoretická příprava:

Složení primární moči, systém renin-angiotensin-aldosteron, funkce ledvin ve vztahu k ABR. Objasněte pojmy: polyurie, polydipsie, polakisurie, strangurie, anurie, isostenurie.

Úvod:

Vyšetření moči patří k základním klinicko-biochemickým vyšetřením ve veterinární medicíně a zahrnuje vyšetření:

- fyzikální
- chemické
- mikroskopické (močový sediment)

Speciální vyšetření zahrnuje mikrobiologické vyšetření a rozbor močových konkrementů.

Nemůže-li být analýza moči provedena do 2 hodin po odběru, moč musí být uchována při 4 °C a před analýzou ekvilibrována na teplotu laboratoře.

Makroskopické posouzení moči

K fyzikálnímu vyšetření patří především smyslová analýza, kdy zjišťujeme barvu, pěnu, čirost a zápach moči. Dále sem náleží zjištění reakce moči (pH), její specifické hmotnosti (hustoty) a diurézy.

1. Barva

U masožravců a přežvýkavců je světle až slámově žlutá, u koně červeno- až hnědožlutá barva (barva koňaku), kalného vzhledu (obsah uhličitanu vápenatého) s hustou až vazkou konzistencí, neboť obsahuje mukoproteiny. H = světle až zlatě žlutá.

Odchylky:

Světlejší barva – nadměrné pití (zředěná moč), selhání (insuficience) regulační funkce ledvin.

Tmavší barva – nedostatek vody, mimořádně ztráty vody (průjem, pocení).

Červená barva – erytrocyty, myoglobin, porfyriny, rostlinná barviva (např. červená řepa).

Červenohnědá barva – methemoglobin, myoglobin, erytrocyty, hemoglobin, intoxikace olovem nebo rtutí.

Hnědá až černá barva – melanin, alkapton, methemoglobin, fenoly; často se toto zbarvení objevuje teprve po stání na vzduchu.

Žlutozelená, žlutohnědá barva – bilirubin, biliverdin.

2. Pěna

Žlutou až hnědožlutou pěnu může způsobit bilirubin. Větší množství bezbarvé pěny bývá u moči obsahující bílkovinu nebo glukosu. Pěna je hojnější a trvalejší.

3. Množství (objem moči) za 24 h (tj. diuréza) je pro každé zvíře odlišné; u skotu se pohybuje od 6 do 25 l, u koně od 4 do 15 l, u psa od 0,04 až do 2 l. H = u dospělých 1 - 2 litry.

Zvýšená diuréza = polyurie

Snížená diuréza = oligurie

Úplná zástava = anurie (produkce moči pod 50 ml za 24 h).

4. Čiřost

Normální čerstvá moč je čirá a průhledná u masožravců, všežravců a přežvýkavců. Zkalená moč se vyskytuje fyziologicky vždy u koní; přítomnost mucínu jí dodává hustou až vazkou konzistenci.

Příčinou zkalené moči ihned po vymočení bývá také pyurie.

5. Zápach

Je ovlivněn skladbou přijatého krmiva a také dlouhým stáním (oxidace, bakteriální rozklad) kdy se mění na amoniakální. Aromatický zápach vnímáme u moči býložravců, pichlavě ostrý u masožravců. Typický je zápach při přítomnosti acetonu – je přirovnáván k zápachu shnilých jablek (provází např. hladovění, diabetes mellitus). H = pach je svérázný, připomíná pach hovězí polévky nebo bujónových kostek.

6. Reakce moči (určení pH)

Reakci moči určíme v čerstvé moči co nejdříve. Není-li moč konzervována (thymol v isopropanolu, formaldehyd), dochází k rozmnožení mikroorganismů, spojené s hydrolyzou močoviny na NH_3 a k posunu na alkalickou stranu.

Při rutinním vyšetření měříme pH pomocí pH-papírků (PHAN, ALBUPHAN, PENTAPHAN, HEPTAPHAN), které jen krátce (na 1s) ponoříme do moči. Po vyjmutí otřeme kapku ulpívající na dolním okraji proužku o okraj zkumavky a **ihned** srovnáme se zbarvením příslušné zóny s barevnou stupnicí, na které odečteme pH. Zóna papírku obsahuje acidobazické indikátory (methylenová červeň a bromthymolová modř), které reagují na koncentraci H^+ iontů v moči změnou svého zbarvení. Analýza může být zkrácena přítomností par amoniaku v ovzduší laboratoře, stáje apod.

kyselé pH = moč většiny masožravců (obsahuje dihydrogenfosforečnan sodný / $\text{Na H}_2\text{PO}_4$)

alkalické pH = moč koně, býložravců (obsahuje uhličitan vápenatý / CaCO_3)

moč všežravců – pH je závislé na složení krmiva

člověk = pH 5,5 < 6,5 s krajními mezemi 4,5 - 8,0

⇓ **pH moči** : acidóza, hladovění, zátěž, infekce, dehydratace, febrilie.

7. Hustota (specifická hmotnost)

Specifická hmotnost dává informaci o iontové koncentraci moči. Referenční hodnoty jsou při běžném příjmu tekutin a potravin během dne mezi 1010 - 1050 g/l.

U diabetu, akutního zánětu ledvin má stanovení hustoty velký diagnostický význam.

Přehled referenčních rozmezí hustoty a pH moči u vybraných druhů zvířat

	Hustota (g/l)	pH
Kůň	1020 – 1032 – 1050	7,5 – 8,0 – 8,5 – 9,0
Hříbata	pod 1010	7,5 – 8,0 – 8,5 – 9,0
Dojnice	1030 – 1045	7,0 – 7,5 – 8,0 – 8,5
Ovce	1015 – 1045	7,4 – 8,4
Koza	1015 - 1045	7,4 – 8,4
Prase	1010 – 1030	5,0 – 6,5 – 6,8 – 7,0
Pes	1015 – 1040	5,5 – 7,0
Kočka	1015 – 1050	5,5 – 7,0
Člověk	1010 – 1025	5,5 – 6,5

Poznámka:

- u **vysokoprodukčních dojnic** nemá pH moči klesnout pod hodnotu 7,0; silný vliv výživy, metabolické zátěže, vysoké produkce mléka

- u **psa** je hustota moči nad 1050 signálem dehydratace (vliv výživy, granule x vařená strava, maso + zelenina)

- u **kočky** je hustota moči nad 1060 rovněž signál dehydratace.

DŮKAZ PATOLOGICKÝCH SOUČÁSTÍ MOČI

Úkol: Proveďte základní vyšetření vlastní moči na přítomnost patologických součástí (kvalitativní reakce, diagnostické papírky). Při provádění důkazů souběžně s vyšetřovaným vzorkem vlastní moči analyzujte modelový vzorek. Příprava modelového vzorku: moč s přidavkem vyšetřované patologické součásti ke vzorku vlastní moči, např. při průkazu glukosy v moči přidáte k moči několik kapek roztoku glukosy, podobně žluč (žlučová barviva), krev, krevní sérum (bílkovina), aceton (ketolátky).

PROTEINY V MOČI (PROTEINURIE)

Zkouška s kyselinou sulfosalicylovou: Její princip spočívá v tom, že se bílkovina kyselinou sulfosalicylovou denaturuje, což se projeví tvorbou zákalu až sraženiny podle množství přítomné bílkoviny. Tato zkouška je nejpoužívanější ze všech způsobů důkazu bílkoviny

v moči. Je vysoce citlivá a prokáže i fyziologická množství bílkovin v moči (nepřesahující 0,15 g/ 24 h). Proto negativní výsledek s určitostí znamená, že v moči není patologické množství bílkoviny, kdežto v případě opalescence rozhodnou další, méně citlivé zkoušky, zda nalezená bílkovina v moči nepřesáhla fyziologicky se vyskytující množství (zkouška varem).

Pracovní postup:

K 2 ml moči přidáme 2 kapky kyseliny octové (5 mol/l) a 3-5 kapek kyseliny sulfosalicylové (0,917 mol/l). Jestliže je ve vzorku přítomna bílkovina, pozorujeme opalescenci, zákal nebo dokonce bílou sraženinu bílkovin. Intenzitu zákalu hodnotíme ve světle dopadajícím na zkumavku z boku dle následující tabulky.

Hodnocení:

Nález	Označení	Přibližná koncentrace bílkovin v g/l
opalescence je viditelná proti černému pozadí v bočním světle (fyziologický nález)	stopy	cca 0,1
lehký zákal , prosvítá jím drobný text, který je dobře čitelný	+	0,1 – 0,25
mléčný zákal neprůhledný	++	0,25 – 1,0
mléčný zákal vločkující	+++	2,0 – 4,0
tvarohovitá sraženina	++++	4,0 a více

Poznámka: Moč použitá na zjištění přítomnosti bílkoviny musí být čirá!! V případě vzniku opalescence je vhodné provést s močí méně citlivou zkoušku (zkouška varem) a dle jejího výsledku rozhodnout, zda nalezená bílkovina v moči nepřesáhla fyziologicky se vyskytující množství (stopy).

Zkouška varem: Využívá termolability bílkovin při pH v okolí jejich izoelektrického bodu.

Asi 5 ml moči okyselíme třemi kapkami 5 mol/l kyseliny octové (izoelektrický bod) a zahřejeme do varu. Bílkovina se projeví bílým zákalem až sraženinou. Dbáme, abychom nepřidali kyseliny octové příliš mnoho, bílkovina by se pak nevysrážela (falešně negativní výsledek).

Zvýšení (proteinurie): enormní zátěž, horečka, glomerulonefritida, pyelonefritida.

Falešně pozitivní reakci dávají v moči přítomné sulfonamidy, perorální antidiabetika a vyšší koncentrace penicilínu. Kůň : falešně pozitivní protein reaguje na diagnostickém proužku (alkalická moč, fyziologická přítomnost mukoproteinů).

GLUKOSA V MOČI (GLYKOSURIE)

Zkoušky redukční: Zkouška Fehlingova

Při Fehlingově zkoušce s $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Fehling I) v alkalickém prostředí vzniká sraženina $\text{Cu}(\text{OH})_2$, která se vitanem sodnodraselným (Fehling II + hydroxid sodný) rozpustí na modrý komplexní anion. Glukosa vyredukuje za tepla z tohoto roztoku cihlově červený Cu_2O . Zkouška se používá v klinické praxi k průkazu všech redukujících cukrů v moči (diagnostickými proužky prokážeme jen glukosu).

Pracovní postup:

1 díl Fehlingova roztoku I. + 1 díl Fehlingova roztoku II. a stejný díl moči vpravíme do zkumavky a opatrně povaříme. V přítomnosti cukrů vzniká zelenavá, zelenožlutá a žlutočervená sraženina oxidu měďného. Pouhá změna barvy (z jasně modré barvy se stane modrozelená nebo zelená, ale roztok zůstává průhledný, bez sraženiny) neznačí pozitivní výsledek zkoušky. Toto zelené zbarvení vzniká tím, že vyredukováný oxid měďný vytváří barevný komplex s kreatininem. Před zkouškou je dobře se přesvědčit povařením samotného činidla, zda nedává spontánní reakci – což se může stát, jsou-li roztoky staré.

Zvýšení (glykosurie): diabetes mellitus, léčba glukokortikoidy, stres, traumata.

Falešně pozitivní reakci způsobuje např. přítomnost kyseliny močové, gentisové (metabolit aspirinu) nebo kyseliny askorbové v moči při nedodržení reakčních podmínek. Výsledek je ovšem ovlivněn přítomností dalších redukujících látek v moči (alkapton, streptomycin a jeho metabolity, bílkoviny apod.).

Poznámka: Při důkazu glukosy redukční zkouškou nesmí moč obsahovat bílkoviny, které se musí odstranit vysrážením filtrací (deproteinovaná moč).

KETOLÁTKY V MOČI (KETONURIE, NAD 0,1 g/l MOČI)

Teoretická příprava: Ketogeneze, ketolýza, transport ketonových látek krví, ketoacidóza.

Zkouška Legalova

Aceton dává s nitroprussidem sodným v alkalickém prostředí karmínově červené zbarvení. Tutéž barvu však vytváří i kreatinin, obsažený fyziologicky v moči. Na rozdíl od zbarvení vyvolaného acetonem zmizí barva způsobená kreatininem, jestliže roztok okyselíme kyselinou octovou.

Pracovní postup:

Několik krystalků nitroprussidu sodného rozpustíme asi ve 2 ml moči. Potom přidáme několik kapek NaOH (2,5 mol/l). Vznikne-li červené zbarvení, neznamena ještě přítomnost acetonu. Přidáme několik kapek ledové kyseliny octové (koncentrované). Není-li aceton přítomen, červené zbarvení se mění na žlutavé, kdežto v pozitivním případě se původní červená barva ještě zvýrazní.

Zkouška Langeova (modifikace zkoušky Legalovy)

5 ml moči, 5 kapek nitroprussidu sodného (0,624 mol/l), 2 – 3 kapky kyseliny octové (1,665 mol/l) a směs se převrství amoniakem (14,705 mol/l). Na rozhraní amoniaku a směsi se objeví červenofialový prstenec, je-li v moči obsažen aceton.

Zkouška Lestradetova (oblíbená rychlá zkouška proveditelná i ve stáji)

Působením acetonu na práškové Lestradetovo činidlo vzniká fialové zbarvení. Reakce je citlivější než Legalova zkouška.

Na hodinové sklíčko dáme na špičku nože práškového činidla a přidáme 1 – 2 kapky moči. Pozorujeme, zda vzniklo červenofialové zbarvení, způsobené ketolátkami. Lehké narůžovění se odečítá jako stopy.

Zvýšení (ketonurie): diabetes mellitus, diabetická ketoacidosa, lačnění, hladovění. Dislokace slezu, ulehnutí a lipomobilizační syndrom krav. Ketonurie je indikací pro stanovení glukosemie.

KREV A KREVŇÍ BARVIVO V MOČI

Teoretická příprava: krevní barvivo a jeho deriváty. Biosyntéza hemoglobinu.

Heitz – Boyerova zkouška (velmi citlivá)

K 1 ml moči přidáme 1 kapku krve, smísíme se stejným dílem Heitz-Boyerova činidla a opatrně navrstvíme peroxid vodíku (0,88 mol/l). Vzniklý červený prstenec na rozhraní kapalin je důkazem přítomnosti krve.

Zvýšení (hematurie): erythrocyty, stroma erythrocytů, poranění (exogenní, chirurgické, konkrementy), tumory, infekce, septické záněty, paraziti.

Hemoglobinurie: bez přítomnosti erythrocytů. Rozlišení hematurie a hemoglobinurie umožní mikroskopické vyšetření močového sedimentu.

Myoglobinurie: rozpad svalových vláken / zhmoždění svalů, vyčerpávající svalová zátěž, akutní svalové trauma, myositis.

PIGMENTURIE = hemoglobinurie, myoglobinurie / moč je načervenalá příp. dohněda zbarvená a má lakový vzhled.

Poznámka: Obsahuje-li moč větší množství hnisu (peroxidasy leukocytů), léčiva, jodidy, soli mědi a železa, může vzniknout falešně pozitivní reakce. Považením moči se enzymy inaktivují a reakce je negativní, zatímco v případě krevního barviva se jeho aktivita zahřátím nemění. Nález je vhodné potvrdit (vyvrátit) výskytem četných erythrocytů v močovém sedimentu.

ŽLUČOVÁ BARVIVA V MOČI

Zkouška s dusitanem sodným na bilirubin (zelený Ehrlich)

K 5 ml moči přidáme 2 kapky roztoku dusitanu sodného (0,072 mol/l) a moč okyselíme několika kapkami koncentrované kyseliny chlorovodíkové. V přítomnosti bilirubinu se objeví zelené zbarvení. Nadbytkem dusitanu sodného se mění zelené zbarvení rychle v modré a zmizí. Proto přidáváme dusitan sodný velmi opatrně.

Zkouška s roztokem jodu

1 ml moči převrstvíme 1 ml jodové tinktury. V pozitivním případě se na styčné ploše vytvoří zelený prstenec.

Zvýšení (bilirubinurie): onemocnění jaterního parenchymu, invaze parazitů.

Poznámka: Moč k důkazům bilirubinu musí být co nejčerstvější. Bilirubin se na vzduchu snadno oxiduje. U koně je vylučován jako hydrobilirubin. U zdravých psů je bilirubin prokazatelný ve 20 až 60 % vzorků moči při hustotě moči > 1020 g/l.

ŽLUČOVÉ KYSELINY V MOČI

Žlučové kyseliny (kyselina cholová, deoxycholová, chenodeoxycholová, lithocholová) vznikají v játrech z cholesterolu, jsou zde konjugovány s glycinem nebo taurinem a ve formě konjugátu vylučovány do duodena jako součást žluče. Snižují povrchové napětí, čímž napomáhají emulgaci tuků a jejich trávení ve střevě. Do moči se žlučové kyseliny dostávají při snížení průchodnosti až blokadě žlučových cest.

Zkouška Pettenkoferova

Na styčné ploše mezi koncentrovanou kyselinou sírovou a močí, do které přidáme sacharosu, se za přítomnosti žlučových kyselin vytváří purpurový prstenec.

Ve zkumavce převrstvíme opatrně koncentrovanou kyselinu sírovou močí v níž je rozpuštěno malé množství sacharosy. V přítomnosti žlučových kyselin vznikne purpurový prstenec.

MOČOVÝ INDIKÁN (bez modelového vzorku)

Činností symbiotické bakteriální mikroflóry vzniká ve střevě z tryptofanu mimo jiné produkty indol (tryptofan bez postranního řetězce). Indol je oxidován na indoxyl (3-hydroxyindol), který po resorpci je v játrech konjugován s kyselinou sírovou (koenzym PAPS donor aktivního sulfátu) a jako netoxický produkt je vyloučen močí (např. u psa 0,010 – 0,030 g/l moči, u koně 0,12 – 0,300 g/l moči).

Zvýšení exkrece indikánu: neprůchodnost střev (kolika u koně, cizí těleso, vysoký stupeň naplnění žaludku).

Úkol : Proved'te důkaz patologických součástí moči pomocí diagnostických proužků- příklad suché chemie pomocí přístroje PocketChem™UA . Nastudujte močový sediment pomocí mikroskopických obrazů a doprovodných textů k močovému sedimentu.

PocketChem™ UA (PU-4010)

přístroj pro objektivní vyhodnocování diagnostických proužků 10EA pro analýzu moči.


Charakteristika přístroje:

Přístroj PocketChem™ UA (PU-4010) je určen pro objektivní vyhodnocování diagnostických proužků 10EA pro analýzu moči.

Příprava vzorku a diagnostického proužku:

- Do vyšší zkumavky si připravte tolik moči, aby do ní bylo možné ponořit všechna reagenční pole diagnostického proužku – **černý proužek musí zůstat suchý!!**
- Z obalu vyjměte jen tolik proužků, kolik budete potřebovat a obal ihned uzavřete víčkem. Nedotýkejte se reagenčních polí proužku.

Zásady správného měření na přístroji:

- Přístroj zapnete stiskem a podržením tlačítka 
 - Na displeji se objeví na chvíli ukazatel verze, datum a čas a vyjede kolejnička pro proužek.

Jakmile se na displeji objeví číslo pokusu (No..... a typ 10EA) je přístroj připraven.

Pořádně promíchejte moč ve zkumavce (na třepačce).

Stiskněte na přístroji  tlačítko pro zahájení měření.

Na displeji běží odpočet 3s, který je provázen krátkým pípáním.

Po tomto čase přístroj dlouze pípne (2s) – v této době ihned ponořte proužek do vzorku moče a po skončení zvuku jej vytáhněte a položte opatrně bokem na připravenou buničinu.

Na displeji běží odpočet 60s. Po krátkém okapání a otření **boku** diagnostického proužku jej položte na černou kolejničku černým proužkem směrem nahoru. Musíte tak učinit **nejpozději do 18s před koncem** odpočtu, protože poté zajede kolejnička do přístroje a začne měření.

Informace o kontrole přístroje:

Před vlastním měření je možné provést kontrolu (kalibraci) přístroje dodaným testovým proužkem, který má přesně daný výsledek měření. Pracuje se s ním stejně jako diagnostickým proužkem a po změření je možné výsledek ověřit s výsledky atestu, které jsou uvedeny na plastové zkumavce od testového proužku.

Nastudování součástí močového sedimentu

Úkol: Součásti močového sedimentu nastudujete pomocí vytištěných obrázků a textů. Do protokolu zakreslete nejčastěji se vyskytující součásti močového sedimentu.

Na cvičení se připravte prohlédnutím skvělých webových stránek:

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

Vyšetření močového sedimentu z nekonzervované moči je nutno provést do 1 hodiny po odběru, jinak dochází k výraznému nebo úplnému rozpadu elementů. Močové válce lze přesně analyzovat jen v čerstvé moči do 30 min.

13 POUŽITÉ ZDROJE

- Doubek, J. a kol.: Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. Noviko, 2007.
- Garrett, R. H., Grisham, Ch. M.: Biochemistry. 4th Edition. Boston, USA: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2010, 1184s.
- Hofírek B., Pechová A., Doležel R., Pavlata L., Dvořák R., Fleischer P.: Produkční a preventivní medicína v chovech mléčného skotu. VFU Brno, 2004.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L.: Clinical biochemistry of domestic animals. Academic Press, 1997.
- Koolman, J., Röhm, K.H. Barevný atlas biochemie. Praha: Grada, 2012.
- Kopřiva, V., Hostovský, M., Nekvapil, T., Boudný, V., Malota, L. Vybrané instrumentální metody v biochemických cvičeních. Inovované úlohy. Brno: VFU FVHE Ústav biochemie, chemie a biofyziky, 2012.
- Kopřiva, V., Hostovský, M., Nekvapil, T., Malota, L., Laboratorní vyšetřování vzorků I – Biochemie. Učební text a návody pro studenty bakalářského studijního programu oboru Ochrana zvířat a welfare. Brno: VFU FVHE Ústav biochemie, chemie a biofyziky, 2013
- Kopřiva, V., Malota, L., Nekvapil, T., Hostovský, M. Praktická cvičení z veterinární biochemie. Inovované úlohy. Brno: VFU FVHE Ústav biochemie, chemie a biofyziky, 2012.
- Kraft W., Dürri U. M.: Klinická laboratorna diagnostika vo veterinárnej medicíne. H&H, 2001.
- Murray, RK. et al. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th ed. NY: The McGraw-Hill Companies, 2009, 693 pp. ISBN 978-0-07-162591-3
- Murray, RK. et al. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th ed. NY: The McGraw-Hill Companies, 2009.
- Murray, RK. et al. Harperova Biochemie. 2.vyd. Jinočany: H&H, 1998, 872 s. ISBN 80-85787-38-5
- Smutná M, Halamíčková A, Kopřiva V, Šalplachta J, Baranyiova E: Praktická cvičení z biochemie pro posluchače VFU fakulty veterinárního lékařství a fakulty veterinární hygieny a ekologie, VFUB, FVHE, 1997, 40 p
- Svoboda M., Drábek J.: Veterinární péče v chovech prasat. VFU Brno, 2005.
- Thrall M. A., Weiser G., Allison R. W., Campbell T.W, Veterinary Hematology and Clinical Chemistry 2nd ed. Wiley-Blackwell (Verlag), 2012.
- Toro J., Rodrigo R. Oxidative stress: Basic Overview. In: Rodrigo R, editor. Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009. pp. 1-24. ISBN 978-1607415541

PODĚKOVÁNÍ

Tato výuková opora byla financována

Interní vzdělávací agenturou VFU Brno IVA

Identifikační číslo projektu 2016FVHE/2390/67