

Kolektiv

**Lékařská chemie, biochemie a
molekulární biologie
Praktická cvičení I**

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Ústav biochemie a experimentální onkologie

Vedoucí ústavu: Prof. MUDr. Aleksi Šedo, Dr.Sc.

Autorský kolektiv:

RNDr. Eva Bubnová, CSc.

RNDr. Alena Buděšínská, CSc.

Doc.MUDr. Petr Bušek, Ph.D.

Doc. MUDr. Jaromír Křemen, CSc.

Doc. MUDr. Evžen Křepela, CSc.

Prof.. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

RNDr. Jana Soukupová, Ph.D.

MUDr. Jana Stříbrná, CSc.

Mgr. Lucie Stollinová Šromová, Ph.D.

Prof.. MUDr. Michal Zikán, Ph.D.

Obsah

Pomůcky na praktika	9
PRÁCE S AUTOMATICKÝMI PIPETAMI A SPEKTROFOTOMETREM.....	10
Stanovení koncentrace roztoku chloridu železitého	13
pH, PUFRY	15
1. Měření pH roztoků silné kyseliny a silné zásady	16
2. Závislost pH acetátového pufru na poměru látkové koncentrace acetátu a kyseliny octové.....	17
3. Změna pH acetátového pufru po přidání kyseliny.....	18
VLASTNOSTI A REAKCE BIOLOGICKY A TOXIKOLOGICKY	19
VÝZNAMNÝCH PRVKŮ A JEJICH SLOUČENIN.....	19
Rozpustnost anorganických látek, srážecí reakce vybraných kationtů	21
Změna vlastností látek při vzniku komplexu.....	22
REAKCE BIOCHEMICKY VÝZNAMNÝCH ORGANICKÝCH SLOUČENIN.....	24
1. Oxidace alkoholů a aldehydů	24
1.1. Reakce aldehydů se Schiffovým činidlem	25
1.2. Příprava a redukce Fehlingova činidla	26
1.3. Redukční vlastnosti vybraných sacharidů	27
2. Rozpustnost organických kyselin a jejich solí.....	28
2.1. Kyselina šťavelová	28
3. Alkalická hydrolýza tuků - zmýdelnění tuků	29
4. Emulgační schopnost mýdel	30
5. Důkaz přítomnosti dvojných vazeb ve vyšších mastných kyselinách	31
AMINOKYSELINY A BÍLKOVINY	32
1.1. Ninhydrinová reakce	32
1.2. Reakce s koncentrovanou kyselinou dusičnou	34
1.3. Reakce s Millonovým činidlem.....	34
2.Reverzibilní redox systém cystein - cystin.....	35
3.Biuretová reakce	36
BÍLKOVINY	37
1. Emulgační schopnost bílkovin.....	38
2. Ireverzibilní srážení bílkovin.....	39
3. Stanovení koncentrace bílkovin v séru	41
4. Stanovení koncentrace albuminu v séru	43
ENZYMY	45
1. Aktivace a inhibice α -amylasy anorganickými ionty	45
2. Důkaz aktivity trypsinu in vitro (kvalitativně)	46

3. Vliv pH na aktivitu enzymu.....	47
BIOLOGICKÉ OXIDACE.....	48
Důkaz dehydrogenas citrátového cyklu.....	50
Důkaz peroxidasy	53
Důkaz katalasy a pseudoperoxidasová reakce.....	54
TRÁVENÍ ŠKROBU	55
Důkaz substrátové specifity glykosidas (sacharasy a α -amylasy).....	55
Kyselá hydrolýza škrobu	58
TRÁVENÍ A VSTŘEBÁVÁNÍ LIPIDŮ	59
Vliv solí žlučových kyselin na štěpení tuků katalyzované pankreatickou lipasou...	62
Emulgační schopnost žlučových kyselin.....	63
STANOVENÍ LIPIDŮ V PERIFERNÍ KRVÍ	64
Stanovení celkového cholesterolu (TC)	68
Stanovení HDL cholesterolu (HDL-C)	70
Stanovení triacylglycerolů (TAG).....	71
Výpočet LDL cholesterolu a HDL indexu podle Friedewalda.....	73
Stanovení TC a TAG ve vlastní kapilární krvi pomocí přístroje REFLOTRON® ...	74
DUSÍKOVÁ BILANCE	76
Stanovení koncentrace močoviny	78
Výpočet dusíkové bilance.....	81
TETRAPYRROLY.....	83
Vlastnosti hemoglobinu.....	83
1.1. Spektrální křivky derivátů hemoglobinu	83
1.2. Důkaz karbonylhemoglobinu zkouškou s Ajatinem.....	84
1.3. Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi	85
Vlastnosti tetrapyrrolů	88
2.1. Vlastnosti porfyrinů.....	88
2.2. Stanovení celkového bilirubinu v séru	88

Pravidla bezpečnosti práce v laboratoři

1. V laboratoři se pracuje v předepsaném pracovním ochranném oděvu: bílý laboratorní plášť by měl být celý zapnutý. Dlouhé vlasy je nutno mít sepnuté. V případě potřeby se doporučuje používat další ochranné pomůcky: gumové rukavice, brýle, ochranný štít nebo roušku.
2. Při práci s biologickým materiálem (krev, sérum, plazma, moč) je **nutno vždy používat gumové rukavice**.
3. V laboratoři je **zakázáno jíst, pít, kouřit**. Před odchodem z laboratoře je nutno vždy si umýt ruce mýdlem.
4. Při práci musí být zachován klid a udržována maximální čistota. Pracuje se s maximální pozorností a rozmyslem.
5. Každá kádinka, zkumavka, láhev na pracovním stole musí být čitelně a srozumitelně popsána (obsah - signatura).
6. S pevnými chemikáliemi se nikdy nemanipuluje rukou, neodsypávají se do dlaně apod. Používá se čistých laboratorních lžiček nebo špachtlí. V případě znečištění chemickou látkou se ruce ihned opláchnou a umyjí mýdlem a vodou.
7. Malé zátky se při práci přidrží v ruce a **neodkládají se na pracovní stůl**. Zátky větších lahví je nutno položit tak, aby obsah lahve na nich ulpěl **nekontaminoval pracovní plochu**. Láhve a jiné obaly je po odebrání potřebného množství chemikálie třeba **ihned uzavřít**.
8. Reagenční roztoky se odlévají z reagenčních lahví na straně odvrácené od signatury tak, aby se nepoškodil štítek na lahvi. Nečitelný nápis a s tím spojená případná záměna může mít nebezpečné následky.
9. Pipetování jedovatých, leptavých, dráždivých a potenciálně infekčních (biologických) kapalin je nutno provádět bezpečnostními pipetami nebo pomocí balonku. Nikdy ne přímo ústy!
10. Při manipulacích s látkami ve zkumavkách a jiných nádobách musí ústí nádoby vždy směřovat od vlastní osoby i od jiných pracovníků.
11. Tekutiny ve zkumavce při zahřívání na otevřeném ohni se zahřívají opatrně a pomalu od hladiny ke dnu. Zkumavkou se přitom pohybuje, aby se obsah rovnoměrně prohříval a nedošlo k náhlému varu a vystříknutí vroucí kapaliny.
12. Pachy látek se nezjišťují přímým přičicháváním; výpary se přivánou mávnutím dlaně. **Chemikálie se nikdy nesmí ochutnávat!**
13. Koncentrované kyseliny, zvláště kyselina sírová, se **ředí vléváním kyseliny do vody**. Kyselina se přilévá tenkým proudem, po částech a za stálého promíchávání roztoku skleněnou tyčinkou. **Obrácený postup**, tj. přilévání vody do kyseliny **je nepřípustný**.
14. Při rozpouštění pevného hydroxidu sodného nebo draselného se sype hydroxid po malých částech za stálého míchání do vody; vždy se vyčká, až je předchozí podíl rozpuštěn. Pokud se roztok více ohřívá, ochladí se nádoba vodou ve větší nádobě.
15. Rozlité koncentrované kyseliny se nejprve ředí opatrně vodou a pak neutralizují zředěným roztokem sody nebo alkalického hydroxidu. Rozlité roztoky louhů se ředí vodou.

Kontaminované plochy se pak omyjí vodou. Tyto operace se provádějí v ochranných rukavicích. Drobné kapky kyselin, louhů a jiných nebezpečných látek se nasají do filtračního papíru a potřísněné místo se pak omyje vodou.

16. Roztoky chemikálií se vylévají do odpadu jen za současného ředění nadbytkem vody z vodovodu.
17. Je třeba se vyhnout vdechnutí i minimálních kvant chemických látek. Některé látky, např. kyanovodík, sirovodík, chlor, fosgen aj. mohou usmrtit už po jediném nadechnutí. Jiné, např. rtuť, benzen, tetrachlormethan a 2-naftylamin, mohou způsobit těžká poškození zdraví až po delší době. Pro možnost infekce je třeba dbát úzkostlivé čistoty při práci s biologickým materiálem.
18. S látkami **dráždivými, páchnoucími a jedovatými**, např. s chlorem, fosgenem, chloroformem, tetrachlormethanem, sirouhlíkem aj., a s látkami snadno vznětlivými, např. s petroletherem, diethyletherem, benzinem, sirouhlíkem, benzenem, acetonem aj. se musí pracovat v dobře odsávané a zapojené digestoři. Při práci s hořlavinami se dbá na to, aby nemohlo dojít ke vznícení par od otevřeného ohně, tj. zejména od blízkých kahanů, ale i elektrických spotřebičů. V jedné digestoři nelze např. pracovat s hořlavým rozpouštědlem a zahřívát cokoli plynovým kahanem. Nebezpečným zdrojem par mohou být i chromatografické vany. Nebezpečnou věcí je postřík chromatogramů, kdy vzniká jemný aerosol činidla; detekci lze provádět jen v dobře odsávané digestoři nebo odsávaném boxu. Také žihání, spalování a mineralizace látek se **provádějí v digestoři**.
19. Při rozliti velkého množství hořlavin se ihned zhasnou všechny hořáky a vypnou elektrické spotřebiče v místnosti, intenzivně se vyvětrá a nezapínají se žádné elektrické spotřebiče, ani světlo. Nejvyšší přípustné množství hořlavin v laboratoři je stanoveno předpisy. Je třeba mít na paměti, že hoří všechny organické látky, které obsahují méně než 70 % halogenu.
20. Při nasazování hadiček na skleněné trubice a zasunování skleněných trubiček, kohoutů a teploměrů do zátek se postupuje opatrně a bez násilí, nejlépe v ochranných rukavicích nebo rukou chráněnou čistou utěrkou; sklo se drží u otvoru, do něhož se vsunuje. Vsunutí skleněných předmětů do otvorů v pryži se usnadní jejich potřením glycerolem.
21. Chemické sklo a skleněné součásti chemických aparatur je třeba před prací prohlédnout; i nepatrná prasklina může mít velmi vážné následky. Poškozené sklo je třeba ihned vyřadit, dát do opravy nebo uložit do zvláštní nádoby na skleněný odpad. Poškozené sklo nesmí přijít do umývárny s ostatním sklem. Střepy skla i drobné střípky na stolech je nutno opatrně a pečlivě odstranit.
22. Při zahřívání, např. destilaci kapalin s teplotou varu pod 100° C, se užívají elektricky vyhřívané vodní lázně, elektricky vyhřívaná topná hnízda a infrazářiče. Pokud k ohřevu slouží zahřívání olejové lázně, nesmí do oleje vniknout voda.
23. Utajenému varu, např. při destilaci, lze zabránit varnými kaménky nebo skleněnými kuličkami, vloženými do nádoby před začátkem zahřívání. Při podezření na utajený var se vypne zdroj tepla a kapalina se nechá bez otřesů zchladnout.
24. Tenkostěnné nádoby s plochým dnem nesmějí být vakuovány, hrozí exploze. Pro vakuovou destilaci se používají výlučně silnostěnné baňky s kulatým nebo oblým dnem.

25. **Ramena odstředivek musí být stejnoměrně zatížena.** Odstředivky musí být během centrifugace uzavřeny, víko nesmí být otevřeno, dokud přístroj není opět v klidu. Většina centrifug je chráněna proti předčasnému otevření pojistkou.

První pomoc v laboratoři

1. Vnikne-li chemická látka do úst, je třeba zamezit jejímu spolknutí; vyplivne se a ústa vyplachují vodou. Při požití jedovaté látky nebo roztoku se ústa opakovaně vypláchnou vodou, po vypití asi půl litru tekutiny se vyvolá zvracení (dráždění hrdla prstem) a vyhledá se lékařská pomoc.
2. Při poleptání kůže kyselinami a louhy se postižené místo ihned dostatečně opláchne proudem studené vody. Při větším potřísnění se pak vyhledá lékařská pomoc. Zvláště nebezpečná poleptání způsobují kyselina fluorovodíková, kyselina dusičná, kyselina sírová, alkalické hydroxidy, peroxid vodíku a fenol.
3. Zasažené oko se ihned vypláchne proudem studené vody, přiloží se sterilní obvaz a ihned se vyhledá lékařská pomoc.
4. Při popálení ohněm nebo horkými předměty je třeba postižená místa ihned ochladit ledovou vodou nebo přikládáním igelitových sáčků s vodou a ledem (ne samotný led). Části oděvu stmelené s popáleninami se zásadně neodstraňují. Při opaření je nutno co nejrychleji stáhnout nasáklý oděv, popálené plochy se kryjí jen sterilním obvazem (žádné masti nebo zásypy). Při těžších popáleninách nebo popálení většího rozsahu je třeba vyhledat lékařskou pomoc.
5. Při úrazu elektrickým proudem, je-li postižený pod napětím, je nutno nejprve přerušit přívod proudu nebo postiženého vyprostit tak, že je zachránce dostatečně izolován od země suchou dřevěnou, gumovou nebo skleněnou podložkou. Zabezpečí se dýchání, srdeční činnost a přivolá se lékařská pomoc.
6. Při vzniku řezných ran, např. laboratorním sklem, se krvácející rána omyje proudem vody, případně desinfikuje. K dezinfekci menších ran je možno použít Ajatin, Famosept, Septonex nebo roztok manganistanu draselného. Rána se přelepí rychloobvazem nebo ováže. Jsou-li v ráně cizí tělesa, např. střepiny skla, musí je vyjmout lékař. Při rozsáhlejším krváčení se přiloží kompresní obvaz a vyhledá lékařské ošetření.
7. Před zahájením praktik jsou studenti povinni se seznámit s teorií používané laboratorní metody a s postupem práce daného experimentu. Před začátkem každé úlohy je třeba se předem zamyslet nad možnými pracovními riziky.

PŘI JAKÉKOLI POCHYBNOSTI NEBO PODEZŘENÍ NA RIZIKO NEBEZPEČÍ SE NIKDY NEROZPAKUJTE DOTÁZAT ASISTENTA.

Pomůcky na praktika

1. Identifikační karta studenta
2. Přezutí
3. Bílý laboratorní plášť
4. Lihový popisovač na sklo
5. Návod na praktická cvičení
6. Psací potřeby
7. Kalkulačka
8. Zámeček na skříňku v šatně
9. Rukavice nesterilní
10. Protokoly

PRÁCE S AUTOMATICKÝMI PIPETAMI A SPEKTROFOTOMETREM

Práce s automatickými pipetami

Klíčová slova: převod – mililitry, mikrolitry, látková koncentrace, komplexní sloučeniny, spektrofotometrie, transmitance, absorbance, molární absorpční koeficient, měřený vzorek, standardní vzorek, slepý vzorek.

Reagencie:

1. roztok thiokyanatanu draselného 1 mol/l
2. roztok chloridu železitého 400 $\mu\text{mol/l}$
3. **standardní roztok** chloridu železitého **200 $\mu\text{mol/l}$**
4. roztok kyseliny sírové 1 mol/l **!ŽÍRAVINA!**

Pokyny pro práci s automatickými pipetami:

1. Před pipetováním nasadíte na pipetu špičku, jejíž barva obvykle odpovídá barvě tlačítka pístu.
2. **PIPETU DRŽTE VŽDY ŠPIČKOU DOLŮ!!!**
3. Při pipetování **stlačte píst k první zářážce**, ponořte pipetu do roztoku a **pomalým uvolňováním stlačeného pístu** nasajte kapalinu (pozor na vzduchové bubliny). **Pomalým stlačením pístu k druhé zářážce** vypustíte obsah špičky (špička nesmí být ponořena do kapaliny) do zkumavky. Špička se při tom dotýká stěny zkumavky.
4. Pro pipetování nového roztoku použijte vždy novou špičku.
5. **Pipety odkládejte svisle do stojánku** a nepokládejte je na pracovní desku stolu.

Nastavení zvoleného objemu:

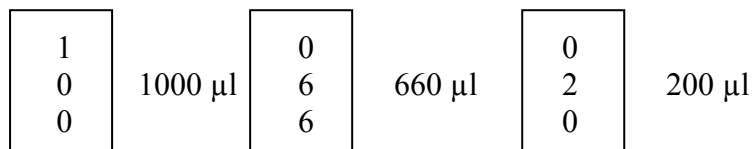
1. Podle požadovaného objemu roztoku zvolte pipetu s vhodným rozsahem uvedeným na barevném tlačítku pístu pipety!
2. Požadovaný objem nastavte na stupnici pipety otáčením šroubu.

Příklady:

rozsah pipety 200/1000 (údaj na barevném pístu):

nejmenší objem 200 μl

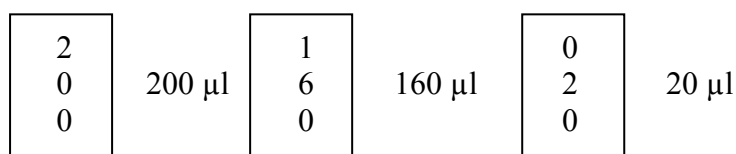
největší objem 1 000 μl



rozsah pipety 20/200 (údaj na barevném pístu):

nejmenší objem 20 μl

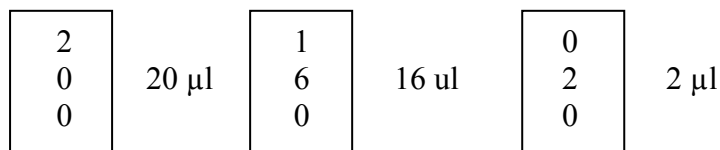
největší objem 200 μl



rozsah pipety 2/20 (údaj na barevném pístu):

nejmenší objem 2 μl

největší objem 20 μl



Spektrofotometrie:

Závislost absorbance roztoku na koncentraci rozpuštěné látky podle Lambertova-Beerova zákona umožňuje stanovit neznámou koncentraci látky z naměřené hodnoty absorbance příslušného roztoku:

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A = absorbance při zvolené vlnové délce

T = transmitance při zvolené vlnové délce

ε = molární absorpční koeficient při zvolené vlnové délce

c = látková koncentrace měřeného roztoku (mol/l)

l = tloušťka měřené vrstvy = 1 cm

Hodnotu koncentrace lze získat těmito způsoby:

- a) výpočtem z Lambertova-Beerova zákona, známe-li molární absorpční koeficient
- b) odečtením z kalibračního grafu
- c) výpočtem pomocí kalibračního faktoru
- d) **změřením absorbance standardního roztoku o známé koncentraci, absorbance roztoku vzorku a následným výpočtem ze vztahu:**

$$A_{st}/A_{vz} = c_{st}/c_{vz}$$

A_{st} = absorbance standardu

A_{vz} = absorbance vzorku

c_{st} = látková koncentrace standardu

c_{vz} = látková koncentrace vzorku

Stanovení koncentrace roztoku chloridu železitého

Při spektrofotometrickém stanovení koncentrace Fe^{3+} se využívá intenzivně červeně zbarveného komplexu $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$, který vzniká reakcí Fe^{3+} s thiokyanatanovými anionty v kyselém prostředí (viz. Vlastnosti a reakce biologicky a toxikologicky významných prvků, (úloha 1.3.).

Složení zadaných vzorků:

vzorek	A	B	C	D	slepý vzorek
Fe^{3+} 400 $\mu\text{mol/l}$ (μl)	250	750	200	800	–
destilovaná voda (μl)	750	250	800	200	1000

Pracovní postup:

- Každý student připravuje jeden ze vzorků A – D podle zadání.
- Připravte a očísľujte sedm zkumavek.
- Do zkumavek 1 – 3 připravte vždy 1 ml zadaného vzorku. Tímto způsobem připravíte tři identické vzorky (triplet).
- Do zkumavek 4 – 6 napipetujte vždy 1000 μl standardního roztoku chloridu železitého 200 $\mu\text{mol/l}$.
- Do sedmé zkumavky připravte slepý vzorek (1000 μl destilované vody).
- Do všech sedmi zkumavek odměřte dávkovačem 0,5 ml roztoku kyseliny sírové (1 mol/l), protřepejte a přidejte 0,5 ml roztoku thiokyanatanu draselného (celkový objem v každé zkumavce bude 2 ml). Obsah zkumavek dobře promíchejte.
- Po 10 min změřte absorbanci vzorku (A_{vz}) i standardu (A_{st}) při 530 nm proti slepému vzorku.
- Naměřené hodnoty zaznamenejte do tabulky 1. a 2.

Tabulka 1.

vzorek:	absorbance			průměr
standard				
vzorek				

- Z průměrné hodnoty absorbance vzorku a z průměrné hodnoty absorbance standardu vypočítejte koncentraci Fe^{3+} (exp.).
- Ze zadaného složení vzorku (A-D) spočítejte teoretickou koncentraci a porovnejte obě hodnoty.
- Všechny údaje zapište do tabulky 2.

Tabulka 2.

vzorek	Fe^{3+} (μl)	voda (μl)	průměr A_{st}	průměr A_{vz}	cFe^{3+} ($\mu\text{mol/l}$) teoret.	cFe^{3+} ($\mu\text{mol/l}$) exp.

Poznámky:

pH, PUFRY

Klíčová slova: pH silných a slabých kyselin a zásad, Hendersonova - Hasselbalchova rovnice, pH pufru, funkce pufru, koncentrace pufru.

Reagencie:

1. roztok kyseliny octové 1 mol/l
2. roztok kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l
3. roztok hydroxidu sodného 1 mol/l
4. roztok hydroxidu sodného 0,1 mol/l
5. vodný roztok HCl o neznámé koncentraci
6. vodný roztok NaOH o neznámé koncentraci

1. Měření pH roztoků silné kyseliny a silné zásady

Pracovní postup

Do označených nádobek připravte ředěním s destilovanou vodou pět různě koncentrovaných vodných roztoků HCl a pět různě koncentrovaných roztoků NaOH. Roztoky HCl a NaOH nařeďte pipetováním dle **Tabulek 1 a 2 (!před přenesením 1ml do další kádinky roztok vždy důkladně promíchejte!)**, запиšte jejich koncentraci (v mol/l), změřte jejich pH, a hodnoty pH запиšte do příslušné Tabulky.

Poté změřte hodnoty pH roztoků o neznámé látkové koncentraci HCl a NaOH. Naměřené hodnoty pH запиšte do **Tabulky 3** a současně určete koncentraci HCl a NaOH v těchto roztocích dle následujících vztahů: $[HCl] \text{ (mol/l)} = 10^{-pH}$, $[NaOH] \text{ (mol/l)} = 10^{-pOH}$, kde $pOH = 14 - pH$

Tabulka 1

Kádinka č. →	1a	2a	3a	4a	5a
0,1 mol/l HCl	10 ml	---	---	---	---
Destilovaná voda	---	9 ml	9 ml	9 ml	9 ml
Přenos objemu dovedlejší kádinky	1 ml →	1 ml →	1 ml →	1 ml →	---
Výsledná koncentrace HCl (mol/L)	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
Změřené pH					

Tabulka 2

Kádinka č. →	1b	2b	3b	4b	5b
0,1 mol/l NaOH	10 ml	---	---	---	---
Destilovaná voda	---	9 ml	9 ml	9 ml	9 ml
Přenos objemu dovedlejší kádinky	1 ml →	1 ml →	1 ml →	1 ml →	---
Výsledná koncentrace NaOH (mol/l)	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
Změřené pH					

Tabulka 3: Roztoky o neznámé koncentraci

	Naměřené pH	c [mol/l]
HCl		
NaOH		

2. Závislost pH acetátového pufru na poměru látkové koncentrace acetátu a kyseliny octové

Acetátový pufr je tvořen slabou kyselinou octovou ($pK_A = 4,75$) a její silnou konjugovanou bází, tj. acetátovým aniontem. Podle Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice je pH pufru závislé na poměru látkových koncentrací obou složek konjugovaného páru. Příslušné hodnoty poměru $[A^-]/[HA]$ získáte různým přidavkem roztoku hydroxidu sodného k roztoku kyseliny octové.

Pracovní postup:

- Do kádinek napipetujte roztoky kyseliny octové 1 mol/l, hydroxidu sodného **1 mol/l** a destilovanou vodu podle tabulky 4.

Tabulka 4.

kádinka	1	2	3
$[A^-]/[HA]$	1:3	1:1	3:1
CH ₃ COOH 1 mol/l (ml)	10	10	10
NaOH 1 mol/l (ml)	2,5	5	7,5
destilovaná voda (ml)	7,5	5	2,5
		ZACHOVAT	
pH naměřené			
pH vypočtené			
[pufr] (mol/l)			

- Roztoky zamíchejte skleněnou tyčinkou.
- pH-metrem změřte pH připravených pufrů.
- Naměřené hodnoty porovnejte s vypočítanými hodnotami pH.
- Vypočítejte látkovou koncentraci připravených pufrů.
- Výsledky запиšte do tabulky 3.

!POZOR! Pufr připravený v kádince 2 (poměr složek 1:1) budete používat v dalších úlohách.

Poznámky:

3. Změna pH acetátového pufru po přidání kyseliny

Při přidání malého množství silné kyseliny se pH **pufru** změní jenom málo, díky rezervě, kterou v acetátovém pufru představují acetátové anionty.

Pracovní postup:

- Do kádinek napipetujte **připravený acetátový pufr (poměr složek 1:1)**, destilovanou vodu a přidejte roztok kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l podle tabulky 5.
- Roztoky zamíchejte skleněnou tyčinkou a změřte pH.
- Porovnejte naměřenou hodnotu pH s hodnotou vypočítanou.
- Zjistěte, o kolik jednotek se změnilo pH po přidání kyseliny k acetátovému pufru a k destilované vodě.
- Výsledky запиšte do tabulky 5.

Tabulka 5.

kádinka	1	2
acetátový pufr (ml)	5	–
destilovaná voda (ml)	–	5
HCl 0,1 mol/l (ml)	5	5
pH naměřené („před přidáním HCl“)		
pH naměřené („po přidání HCl“)		
změna pH (na základě naměřených hodnot)		
pH vypočítané („před přidáním HCl“)		
pH vypočítané („po přidání HCl“)		
změna pH (na základě vypočítaných hodnot).		

Poznámky:

VLASTNOSTI A REAKCE BIOLOGICKY A TOXIKOLOGICKY VÝZNAMNÝCH PRVKŮ A JEJICH SLOUČENIN

Klíčová slova: rozpustnost solí ve vodě, disociace, srážecí reakce, součin rozpustnosti, iontový zápis, iontová rovnice, komplexní sloučeniny, toxicita prvků a jejich sloučenin.

Reagencie:

1. zředěná kyselina chlorovodíková 1:1
2. nasycený vodný roztok sulfidu amonného
3. roztok uhličitanu amonného 1 mol/l
4. zředěná kyselina sírová 1:1
5. koncentrovaný vodný roztok amoniaku
6. roztok hydroxidu sodného 2 mol/l !ŽÍRAVINA!
7. roztok chromanu draselného 0,25 mol/l
8. roztok chloridu amonného 1 mol/l
9. roztok ferrikyanidu draselného 0,01 mol/l
10. roztok thiokyanatanu draselného 0,3 mol/l
11. roztok hydrogenfosforečnanu sodného 0,3 mol/l
12. roztoky vzorků obsahující zkoumané ionty
13. roztoky vzorků neznámých sloučenin
14. roztok chloridu sodného 1mol/l
15. roztok sodné soli EDTA

Základní pravidla pro rozpustnost solí ve vodě:

Rozpustné soli:

- a) obsahují anionty NO_3^- , Cl^- (mimo Ag^+ , Pb^{2+} , Hg_2^{2+} , Bi^{3+}), SO_4^{2-} (mimo kovů alkalických zemin např. Ca^{2+} , Ba^{2+} a dále Pb^{2+}).
- b) obsahují kationty Na^+ , K^+ , NH_4^+ .

Ner rozpustné soli:

obsahují anionty S^{2-} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} a PO_4^{3-} (mimo Na^+ , K^+ , NH_4^+).

Sloučeniny obsahující hydrogenanionty jsou rozpustnější.

Soli slabých kyselin jsou rozpustné v roztocích silnějších kyselin, uvolní se původní slabá kyselina.

Soli slabých bází jsou rozpustné v roztocích silnějších bází, uvolní se původní slabá báze.

Anorganické látky při rozpouštění ve vodě zpravidla disociují na kationty a anionty. Tyto ionty obalené molekulami vody (solvatační obal) vystupují v roztoku jako nezávislé částice, tj. bez ohledu na původní rozpouštěnou látku. Pokud je následně do roztoku přidána sloučenina, která disociuje na ionty tvořící s některým z přítomných iontů nerozpustnou sloučeninu, dojde **při překročení součinu rozpustnosti ke vzniku sraženiny**. Na tomto principu jsou založeny **srážecí reakce**, které mohou být použity pro kvalitativní analýzu roztoků (orientační průkaz některých iontů) a pro poznání vlastností biologicky a toxikologicky významných prvků a jejich sloučenin. Kationty a anionty jsou pro účely této kvalitativní analýzy rozděleny do skupin podle reakce s vhodně zvolenou látkou (tzv. **skupinovým činidlem**). Toto činidlo tvoří sraženiny vždy jen s ionty příslušné skupiny. Jednotlivé kationty a anionty ve skupinách se pak dokazují **speciálními reakcemi, které vedou ke vzniku charakteristické sraženiny**, ke změně zbarvení nebo uvolnění charakteristického plynu.

Z medicinského hlediska je rozpustnost anorganických látek ve vodném prostředí zásadní pro jejich biologické či toxické působení na organismus. Obecně platí, že anorganické látky nerozpustné ve vodě (a v případě perorálního požití nerozpustné v kyselině chlorovodíkové) jsou pro organismus omezeně toxické. Tento fakt umožňuje např. využití ve vodě nerozpustného BaSO_4 jako rentgenkontrastní látky, přestože barnaté kationty jsou silně toxické. Naopak u chloridů rtuti rozdíl v rozpustnosti vysvětluje výrazně vyšší toxicitu sublimátu (HgCl_2) ve srovnání s kalomelem (Hg_2Cl_2). Omezená rozpustnost některých vápenatých solí se podílí na vzniku např. močových a žlučových konkrementů.

ÚLOHA 1.

Rozpustnost anorganických látek, srážecí reakce vybraných kationtů

POZOR! Pro jednotlivé reakce používejte **maximálně 0,5 ml** roztoku vzorků i činidel. Protože jde pouze o kvalitativní reakce, není třeba objemy roztoků odměřovat!

K uvedeným reakcím použijte připravené roztoky, které obsahují příslušný kation. Ke každé reakci použijte nový roztok vzorku. **Všechny reakce zapište iontovým zápisem!**

Soli obsahující chloridový aniont jsou ve vodě dobře rozpustné

Výjimkou jsou chloridy obsahující kationty Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , jejichž součiny rozpustnosti (K_s) jsou extrémně nízké:

$$K_s: \quad \text{AgCl} = 1,8 \cdot 10^{-10} \quad \text{PbCl}_2 = 1,7 \cdot 10^{-5} \quad \text{Hg}_2\text{Cl}_2 = 1,3 \cdot 10^{-18}$$

Proveďte a iontovým zápisem zapište reakce vybraných kationtů s HCl

1. Ag^+ bílá sraženina rozpustná v NH_3 (vzniklou sraženinu uchovejte pro úlohu 2)
2. Hg_2^{2+} bílá sraženina
3. Pb^{2+} bílá sraženina

Na nerozpustnosti halogenidů stříbra je založena argentometrie (kvantitativní analytická metoda sloužící ke stanovení koncentrace např. chloridových aniontů), stříbrné halogenidy byly základní složkou fotografických filmů. Stříbrné kationty vykazují antimikrobiální účinky.

Hydroxidy a sulfidy jsou nerozpustné s výjimkou sulfidů alkalických kovů a kovů alkalických zemin a sulfidu amonného.

$$K_s: \quad \text{CuS} = 8,5 \cdot 10^{-45} \quad \text{FeS} = 3,7 \cdot 10^{-19} \quad \text{ZnS} = 6,9 \cdot 10^{-26} \\ \text{Cu}(\text{OH})_2 = 2 \cdot 10^{-20} \quad \text{Fe}(\text{OH})_2 = 4,8 \cdot 10^{-16} \quad \text{Fe}(\text{OH})_3 = 3,8 \cdot 10^{-38}$$

Proveďte a iontovým zápisem zapište reakce vybraných kationtů s $(\text{NH}_4)_2\text{S}$

4. Cu^{2+} hnědočerná sraženina
5. Fe^{2+} černá sraženina
6. Zn^{2+} bílá sraženina

Proveďte a iontovým zápisem zapište reakce vybraných kationtů s NaOH

7. Cu^{2+} bleděmodrá sraženina (vzniklou sraženinu uchovejte pro úlohu 2)
8. Fe^{2+} bílá sraženina, barví se modrozeleně a hnědne oxidací na $\text{Fe}(\text{OH})_3$
9. Fe^{3+} hnědá sraženina

Uhličitany a fosforečnany jsou špatně rozpustné (s výjimkou solí amonných a solí alkalických kovů)- viz níže.

Vlastnosti solí vápníku a barya

Vápník a baryum patří mezi kovy alkalických zemin. Vápenaté kationty jsou spolu s fosforečnanovými anionty hlavní součástí anorganické složky kostní matrix (hydroxyapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), hrají významnou úlohu v buněčné signalizaci a řízení svalové kontrakce. Hemihydrát síranu vápenatého je v medicíně používán pro výrobu sádrových ob vazů (tuhnutí sádry probíhá jako hydratace dle rovnice $2\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Baryum se v přírodě vyskytuje převážně ve formě síranu a uhličitanu barnatého. Obě tyto sloučeniny jsou ve vodě nerozpustné, BaSO_4 může díky tomu být (i navzdory vysoké toxicitě iontů Ba^{2+}) používán jako rentgenkontrastní látka. Rozpustné soli barya (např. chloridy, dusičnany) jsou vysoce toxické.

Proveďte a iontovým zápisem запиšte reakce Ca^{2+}

10. s Na_2HPO_4 bílá sraženina (podobným mechanismem probíhá mineralizace kostní tkáně)

11. s H_2SO_4 bílá sraženina

Proveďte a iontovým zápisem запиšte reakce Ba^{2+}

12. s $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ bílá sraženina (uchovat pro další reakce)

13. s H_2SO_4 bílá sraženina

Proveďte, popište a v případě probíhající chemické reakce запиšte iontovým zápisem

Bílou sraženinu vzniklou v reakci Ba^{2+} s $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (úloha 1, reakce 12) rozdělte na dvě části

14.a) K jedné části přidejte malé množství zředěné HCl , k druhé srovnatelného množství H_2O . Porovnejte chování sraženiny v obou zkumavkách.

14.b) Ke směsi vzniklé v bodě 14.a) po přidání HCl opatrně přidejte zředěnou H_2SO_4

ÚLOHA 2.

Změna vlastností látek při vzniku komplexu

Vznik koordinačních (koordinačně-komplexních) sloučenin je často provázen výraznou změnou vlastností centrálních iontů, např. změnou rozpustnosti, reaktivity a zbarvení. Z toxikologického hlediska je důležitá schopnost některých látek (především **chelátů**) vytvářet stabilní komplexní sloučeniny s ionty těžkých kovů a tím omezit jejich toxicitu. Na tomto principu je založeno použití chelatačních činidel jako antidot při intoxikacích.

Stabilní komplexy iontů stříbra a mědi jsou užívány jako analytická činidla (např. Tollensovo a Fehlingovo činidlo k průkazu redukčních vlastností sacharidů).

Sraženinu vzniklou v úloze 1 v reakci 1. a 7. (reakcí Ag^+ s HCl resp. Cu^{2+} s NaOH) rozpustíte přidáním malého množství (cca 2 ml) roztoku amoniaku.

1. $\text{AgCl} + \text{NH}_4^+$ rozpustění sraženiny
2. $\text{Cu}(\text{OH})_2 + \text{NH}_4^+$ rozpustění sraženiny (zvýraznění modrého zbarvení)

Pojmenujte vzniklé **komplexní kationty** $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ a $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ a zapište koordinační číslo centrálních atomů v těchto kationtech!

Proveďte a iontovým zápisem zapište reakci

3. $\text{Fe}^{3+} + \text{KSCN}$ vzniká červeně zbarvený **komplexní kation** $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{SCN})]^{2+}$

Cheláty

4. K roztoku s Pb^{2+} přidejte roztok NaCl bílá sraženina

Iontovým zápisem zapište probíhající reakci.

Vzniklou směs rozdělte na 2 části.

5. K první části přidejte roztok sodné soli EDTA, k druhé části přidejte stejné množství destilované vody. Vysvětlete rozdíl mezi zkumavkami.

Doplňující otázky:

1. Na čem je založeno snížení toxicity barnatých kationtů v přítomnosti Glauberovy soli ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (Glauberova sůl se používá jako osmotické projímadlo)?
2. Proč nemůže být jako rentgenkontrastní látka použit ve vodě nerozpustný uhličitán barnatý?
3. Přidání NaCl do roztoku $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ bude mít za následek snížení toxicity tohoto roztoku. Vysvětlete.
4. Jaká je látková koncentrace Ba^{2+} iontů v nasyceném roztoku BaSO_4 ?
 $K_s = 1,1 \cdot 10^{-10} \text{ mol}^2/\text{dm}^6$

REAKCE BIOCHEMICKY VÝZNAMNÝCH ORGANICKÝCH SLOUČENIN

Klíčová slova: hydroxysloučeniny, oxosloučeniny, alkoholy, aldehydy, ketony, adiční reakce oxoskupiny, organické kyseliny a báze, fenoly, aminy, soli, estery, amidy, komplexní sloučeniny. monosacharidy, disacharidy, polysacharidy, hemiacetaly, acetaly, glykosidy, jednoduché lipidy, složené lipidy, mýdla, tenzidy ionogenní a neionogenní, dehydratace, hydrolýza, rozpustnost a disociace solí, emulgace, oxidace, redukce, adiční reakce.

Reagencie:

1. methanol !JED!
2. ethanol
3. kyselina šťavelová
4. dichroman draselný
5. koncentrovaná kyselina sírová !ŽÍRAVINA!
6. Schiffovo činidlo (roztok fialového barviva fuchsinu odbarveného hydrogensířičitanem sodným)
7. roztok hydroxidu sodného 2 mol/l !ŽÍRAVINA! fehling
8. koncentrovaný roztok amoniaku
9. roztok chloridu vápenatého 0,1 mol/l
10. roztok síranu měďnatého 0,02 mol/l fehling
11. kyselina vinná
12. roztok fruktosy 0,05 mol/l
13. roztok ribosy 0,05 mol/l
14. roztok kyseliny glukuronové 0,05 mol/l
15. roztok maltosy 0,03 mol/l
16. roztok sacharosy 0,02 mol/l
17. roztok škrobu 10 g/l
18. slunečnicový olej
19. olivový olej
20. kyselina olejová
21. kyselina palmitová
22. roztok hydroxidu draselného 1 mol/l v ethanolu !ŽÍRAVINA!
23. zředěný roztok Ajatinu 1:1
24. zředěný roztok Jaru 1:50
25. roztok manganistanu draselného 0,01 mol/l
26. 4% formaldehyd
27. kyselina šťavelová.

1. Oxidace alkoholů a aldehydů

Primární alkoholy se oxidují na karbonylové sloučeniny – aldehydy. V praxi se této reakce využívalo např. při detekci ethanolu v dechu (oranžový dichroman draselný v prostředí kyseliny sírové se v přítomnosti alkoholu redukuje na zelený síran chromitý, zatímco ethanol se oxiduje na acetaldehyd). K průkazu aldehydů lze dále použít tzv. Schiffova činidla (úloha

1.). Toto činidlo poskytuje reakcí s aldehydy barevnou sloučeninu za vzniku tzv. Schiffovy báze (aldiminu, úloha 5.).

Aldehydová skupina je přítomna v celém spektru biologicky významných organických molekul včetně sacharidů. K jejímu funkčnímu průkazu se používá zpravidla tzv. Fehlingovy zkoušky. Vinan měďnatý v alkalickém roztoku reaguje s aldehydem za vzniku příslušné kyseliny, oxidu měďného a vinanu sodného (úloha 1.2.). Fehlingovo činidlo se připravuje vždy těsně před použitím smícháním roztoků Fehling I (síran měďnatý) a Fehling II (hydroxid sodný a vinan sodnodraselný) v poměru 1:1.

1.1. Reakce aldehydů se Schiffovým činidlem

Pracovní postup:

- Reakci proveďte s methylalkoholem i ethylalkoholem.
- Do zkumavky dejte malé množství dichromanu draselného a velice opatrně přidejte plastikovým kapátkem 5 kapek koncentrované kyseliny sírové.
- Přilijte 1 ml alkoholu a opatrně promíchejte.
- Zkumavku zahřívejte ve vroucí vodní lázni.
- Na ústřížek filtračního papíru kápněte 1 kapku Schiffova činidla.
- Nad ústím zkumavky přidržujte filtrační papír se Schiffovým činidlem, které se vznikajícím aldehydem barví červenofialově.
- Zapište chemickými rovnicemi oxidaci methanolu a ethanolu:

a)

b)

Poznámky:

1.2. Příprava a redukce Fehlingova činidla

Kyselina vinná, alifatická hydroxykyselina, tvoří velmi snadno komplexy s ionty kovů. Nerozpustný hydroxid měďnatý přejde po přidání kyseliny vinné do roztoku, protože vznikající komplexní sloučenina zabrání reakci Cu^{2+} s hydroxidovými anionty.

Komplexně vázaný Cu^{2+} se snadno redukuje na Cu^+ , který již komplexní ion netvoří. Aldehydy, které se velmi snadno oxidují, vyredukuje z tohoto roztoku nerozpustný červený oxid měďný. Tato reakce je principem tzv. Fehlingova činidla.

Pracovní postup:

- V jedné zkumavce si připravte asi 2 ml vodného roztoku kyseliny vinné.
- Ve druhé zkumavce smíchejte 0,5 ml síranu měďnatého s 0,5 ml roztoku hydroxidu sodného. Vznikne modrá sraženina hydroxidu měďnatého.
- Potom přikapávejte roztok kyseliny vinné, dokud se sraženina nerozpustí.

Pozn. Vzhledem k nestabilitě vzniklého komplexu se Fehlingovo činidlo připravuje krátce před použitím a to smícháním roztoků Fehling I (roztok síranu měďnatého 70g/l) a Fehling II (250g hydroxidu sodného a 350g vinanu sodnodraselného v 1 litru vody) v poměru 1:1 a důsledně se směs protřepe.

- Přidejte 2 kapky formaldehydu a krátce zahřejte ve vroucí vodní lázni.
- V přítomnosti aldehydu dojde k vyredukování červeného oxidu měďného.

Poznámky:

1.3. Redukční vlastnosti vybraných sacharidů

Sacharidy, které mají ve své molekule volný hemiacetálový hydroxyl, vykazují redukční vlastnosti podobně jako glukosa. V alkalickém prostředí tedy redukují komplexní kation měďnatý na kation měďný, který komplexní ion netvoří a vyloučí se jako nerozpustný oxid měďný.

Pracovní postup:

- Podle postupu uvedeného v 1.2 ověřte redukční vlastnosti fruktosy (Fru), ribosy (Rib), kyseliny glukuronové (GlcUA), maltosy, sacharosy a škrobu.
- Pro každou analýzu použijte vždy 1ml zkoumaného sacharidu a 1 ml čerstvě připraveného Fehlingova činidla
- Výsledky запиšte do tabulky 1.

Tabulka 1.

sacharid	Fru	Rib	GlcUA	maltosa	sacharosa	škrob
redukce						

2. Rozpustnost organických kyselin a jejich solí

2.1. Kyselina šťavelová

Ze solí kyseliny šťavelové je významný oxalát vápenatý, který je nerozpustný ve vodě, ale rozpouští se ve zředěných silných kyselinách. Tvorba nerozpustného oxalátu vápenatého je příčinou toxicity kyseliny šťavelové. Oxalát (šťavelan) vápenatý se může vyskytovat v moči, kde tvoří snadno močové kameny.

Pracovní postup:

- Ve zkumavce rozpustíte ve vodě několik krystalů kyseliny šťavelové.
- Vzniklý roztok zalkalizujete koncentrovaným roztokem amoniaku (použijte plastickou pipetku). Zkontrolujte indikátorovým papírem pH (a).
- Přidávejte po kapkách roztok chloridu vápenatého a pozorujte vznik bílé sraženiny (b).
- Sraženinu oxalátu vápenatého rozpustíte přidáním zředěné kyseliny chlorovodíkové, reakce probíhá kolem pH = 5 (c).
- Všechny tři reakce označené a), b), c), vyjádřete formou iontového zápisu:
 - a)
 - b)
 - c)

Poznámky:

3. Alkalická hydrolýza tuků - zmýdelnění tuků

Mýdla jsou soli mastných kyselin a vznikají alkalickou hydrolýzou triacylglycerolů. Proces se nazývá zmýdelnění.

Mýdla také vznikají z tuků v duodenu hydrolytickým působením alkalické střevní šťávy a napomáhají tak emulgaci dalších molekul esterifikovaných lipidů bezprostředně po vstupu žaludečního obsahu.

Pracovní postup:

- Do kádinky odměřte pasterkou 2 ml oleje a přidejte 10 ml alkoholického roztoku KOH.
- Za stálého míchání zvolna zahřívejte, zmýdelnění proběhne asi za 5 – 10 min.
- Obsah kádinky přelijte do 25 ml horké destilované vody
- Takto získáte roztok alkalického mýdla. Pomocí indikátorového papírku ověřte jeho pH.

Poznámky:

4. Emulgační schopnost mýdel

Mýdla, soli mastných kyselin, patří podle své struktury mezi **anionaktivní** tenzidy. K anionaktivním tenzidům patří i sodné soli alkylsírových či alkylsulfonových kyselin, např. dodecylsulfát sodný (SDS), který se často používá biochemické laboratoři i jako detergent v čistících prostředcích. Patří k nim také soli žlučových kyselin, které jsou součástí žluče a přispívají k emulgaci tuků.

Běžný desinfekční prostředek Ajatin, kvartérní amoniová sůl s alkylem C8 – C18 jako substituentem, patří mezi velmi účinné **kation-aktivní** tenzidy, stejně jako další desinfekční prostředek Septonex.

Vedle obou výše uvedených skupin **ionogenních tenzidů**, existuje velká skupina **neionogenních tenzidů**, které se díky své zanedbatelné toxicitě používají např. v prostředcích na mytí nádobí. Polární část jejich molekuly tvoří větší počet atomů kyslíku, které jsou součástí etherových a esterových vazeb v molekulách těchto typů tenzidů. Příkladem jsou vyšší estery a ethery polyethylenglykolu s komerčními názvy např. Triton a Tween. K neionogenním emulgátorům lze počítat i ethanol.

Pracovní postup:

- Ve zkumavce protřepejte kapku oleje s vodou a vzniklou emulzi ponechte stát. Po chvíli se opět obě složky oddělí.
- Přidejte malé množství mýdlového roztoku a dobře protřepejte. Vznikne jemná emulze.
- Stejným způsobem vyzkoušejte emulgační schopnost zředěných roztoků Ajatinu a Jaru.

Poznámky:

5. Důkaz přítomnosti dvojných vazeb ve vyšších mastných kyselinách

Sloučeniny, obsahující jednu nebo více násobných vazeb, jsou velmi citlivé k oxidaci, čímž se liší od sloučenin nasycených. Použijeme-li jako oxidační činidlo roztok manganistanu draselného v kyselém prostředí, dojde k hydroxylaci dvojně vazby a k redukci manganistanu.

Triglyceridy s krátkým řetězcem a vyšším počtem násobných vazeb jsou oleje. S prodlužující se délkou řetězce mastných kyselin a klesajícím počtem násobných vazeb stoupá jejich konzistence (mazlavé až pevné tuky).

Pracovní postup:

- Do zkumavky odlijte 0,5 ml slunečnicového oleje, 0,5 ml roztoku manganistanu draselného a plastikovou pipetkou přidejte **1! kapku** koncentrované kyseliny sírové (nadbytek koncentrované H_2SO_4 způsobuje ztmavnutí organické sloučeniny, protože dochází k její mineralizaci).
- Obsah zkumavky dobře, ale opatrně protřepejte. Pozorujte změnu zbarvení.
- Tutéž reakci proveďte i s olivovým olejem, a také s kyselinou olejovou a několika krystaly kyseliny palmitové.
- Stupeň nenasycenosti zapište do tabulky 2. Použijte znamének +, ++ atd.

Tabulka 2.

sloučenina	zbarvení	stupeň nenasycenosti
slunečnicový olej		
olivový olej		
kyselina olejová		
kyselina palmitová		

Poznámky:

AMINOKYSELINY A BÍLKOVINY

Klíčová slova: struktura geneticky kódovaných aminokyselin, izoelektrický bod, tvorba komplexních sloučenin, nitrace, oxidace, redukce, hydrolýza bílkovin, biuret, peptidová vazba, koloidní roztok, amfionty, amfolyty.

Reagencie:

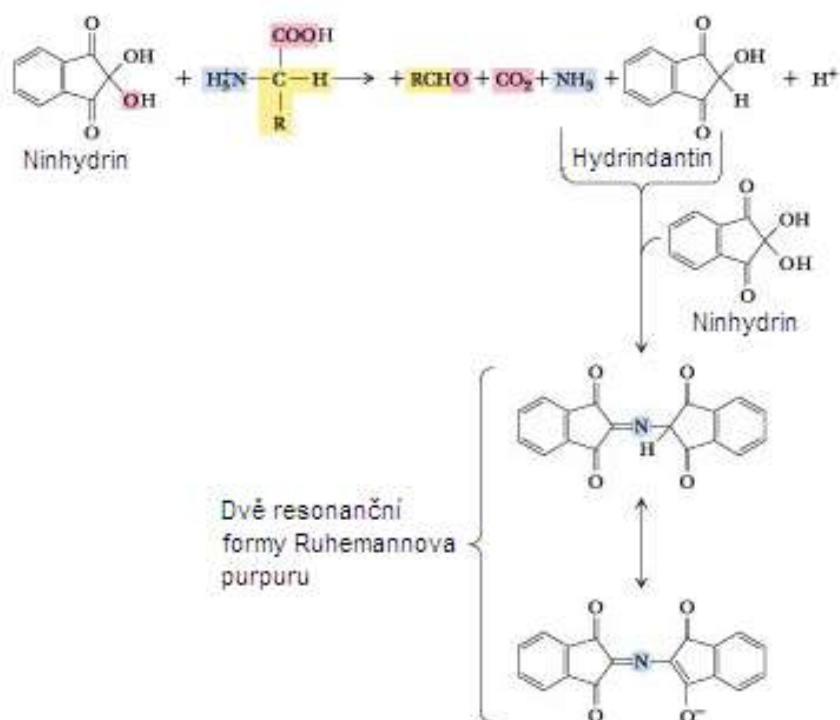
1. roztok tyrosinu 1,25 mmol/l
2. roztok tryptofanu 1,25 mmol/l
3. roztok kaseinu 10 g/l ve fyziologickém roztoku
4. roztok kyselého hydrolyzátu kaseinu 5 g/l
5. roztok želatiny 5 g/l
6. roztok hydroxidu sodného 2 mol/l, !ŽÍRAVINA!
7. roztok ninhydrinu v butanolu 2 g/l
8. Millonovo činidlo (40 g rtuti v 57 ml koncentrované kyselině dusičné, po zahřátí zředěno 2 objemy vody), !JED!
9. koncentrovaná kyselina dusičná, !ŽÍRAVINA!
- 10.
11. roztok cysteinu 0,008 mol/l v HCl 1 mol/l
12. roztok cystinu 0,004 mol/l v HCl 1 mol/l
13. nitroprussid sodný
14. koncentrovaný vodný roztok amoniaku
15. nasycený vodný roztok sulfanu
16. síran amonný
17. roztok vaječného bílku ve fyziologickém roztoku (1:10)
18. roztok síranu měďnatého 0,02 mol/l

1. Barevné reakce aminokyselin

Tyto reakce se používají k důkazu aminokyselin. Velmi citlivá ninhydrinová reakce je pro aminokyseliny obecná (s výjimkou prolinu) a využívá se nejen k jejich důkazu (detekce aminokyselin při chromatografii), ale i k jejich fotometrickému stanovení. Ostatní reakce jsou specifické pouze pro aminokyseliny určité struktury.

1.1. Ninhydrinová reakce

Kondenzací aminokyselin se dvěma molekulami ninhydrinu (hydrát indantrionu) vzniká modrofialově zbarvený produkt.



Pracovní postup:

- Připravte si vroucí vodní lázeň.
- K 1 ml roztoku tyrosinu přidejte 0,5 ml roztoku ninhydrinu v butanolu, promíchejte.
- Reakční směs zahřívějte asi 5 min ve **vroucí** vodní lázni. Po chvíli se objeví v horní organické vrstvě růžové až modrofialové zbarvení.
- Tutéž reakci vyzkoušejte i s kyselým hydrolyzátem kaseinu.

Poznámky:

Následující reakce, proveďte s tyrosinem, tryptofanem, kyselým hydrolyzátem kaseinu (indolové jádro je v kyselém prostředí nestabilní!), kaseinem a želatinou. Všechny výsledky provedených reakcí запиšte do tabulky 1.

1.2. Reakce s koncentrovanou kyselinou dusičnou

Aromatické aminokyseliny poskytují reakci s kyselinou dusičnou žlutě zbarvené nitrosloučeniny. Tyrosin a tryptofan se za těchto podmínek nitrují zvlášť snadno. V alkalickém prostředí se zbarvení změní na oranžové, protože vznikne alkalická sůl tautomerní formy nitrosloučeniny. Stejnou reakci poskytují i bílkoviny, obsahující tyto aminokyseliny s aromatickým jádrem (xanthoproteinová reakce).

Pracovní postup:

- Do zkumavky odlijte 1 ml zkoumaného roztoku a z dávkovače přidejte 0,5 ml koncentrované kyseliny dusičné.
- Zahřívejte ve **vroucí** vodní lázni (případně vzniklá sraženina se rozpustí) do vzniku žlutého zbarvení.
- Zkumavku ochlaďte pod tekoucí vodou.
- Opatrně přikapávejte plastikovou pipetkou roztok hydroxidu sodného až do vytvoření oranžového zbarvení.

1.3. Reakce s Millonovým činidlem

Sloučeniny, obsahující v molekule hydroxyskupinu vázanou na aromatické jádro, poskytují s Millonovým činidlem komplexní rtuťnatou sůl svých nitroderivátů.

Pracovní postup:

- K 1 ml zkoumaného roztoku přidejte plastikovou pipetkou 5 kapek Millonova činidla.
- Vzniklou bílou sraženinu zahřívejte ve **vroucí** vodní lázni do objevení červeného zbarvení komplexní rtuťnaté soli.

Tabulka 1.

AMK	HNO ₃	Millon
tyrosin		
tryptofan		
hydrolyzát kaseinu		
kasein		
želatina		

Poznámky:

2.Reverzibilní redox systém cystein - cystin

Sloučeniny obsahující -SH skupinu tvoří v alkalickém prostředí s nitroprussidem sodným (pentakyanonitrosylželezitan sodný) červenofialově zbarvenou komplexní sloučeninu.

Pracovní postup:

- Ve zkumavce si připravte asi 3 ml roztoku nitroprussidu sodného rozpuštěním velmi malého množství látky ve vodě.
- Dále si připravte tři zkumavky.
- Do první zkumavky odlijte 1 ml vodného roztoku sulfanu.
- Do druhé zkumavky odlijte 1 ml roztoku cysteinu.
- Do třetí zkumavky odlijte 1 ml roztoku cystinu.
- Do všech třech zkumavek přidejte 1 ml roztoku nitroprussidu sodného.
- Za míchání roztok nasyt'íte síranem amonným.
- Roztoky ve všech třech zkumavkách pomalu alkalizujte amoniakem a pozorujte vznik barevné komplexní sloučeniny.
- Asi po 5 min porovnejte zbarvení ve všech třech zkumavkách a výsledky zaznamenejte do tabulky 2.
- Vysvětlete průběh jednotlivých reakcí.

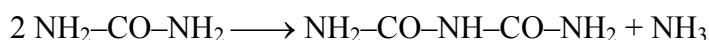
Tabulka 2.

sloučenina	sulfan	cystein	cystin
zbarvení			

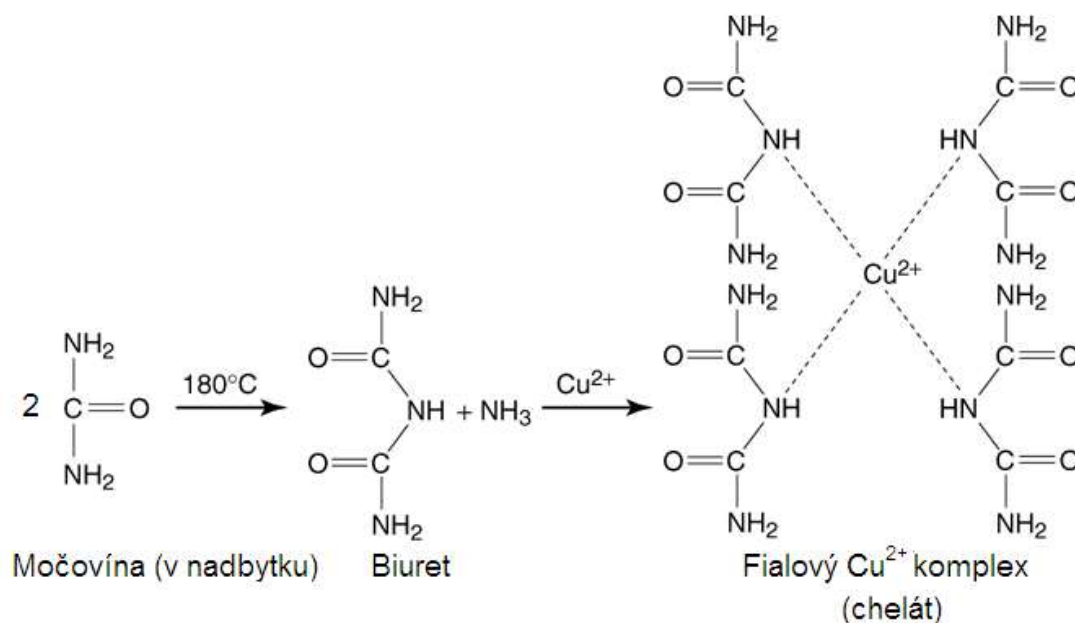
Poznámky:

3. Biuretová reakce

Biuret je látka vznikající tepelnou kondenzací dvou molekul močoviny za uvolnění amoniaku a vzniku vazby $-\text{CO}-\text{NH}-$.



Biuret, stejně jako ostatní sloučeniny, obsahující dvě nebo více peptidových (amidových) vazeb, tvoří s ionty Cu^{2+} fialově zbarvenou komplexní sloučeninu (chelát).



Biuretová reakce se používá k průkazu i kvantitativnímu stanovení látek ve kterých jsou přítomné vazby $-\text{CO}-\text{NH}-$, tedy i bílkovin.

V alkalickém prostředí tvoří bílkoviny s měďnatými kationty komplexní sole, které jsou fialově zbarveny. Volné elektronové páry pro tvorbu komplexu poskytují elektronegativní atomy peptidové vazby $-\text{CO}-\text{NH}-$. Název reakce je odvozen od biuretu.

POZOR! Při nadbytku Cu^{2+} je fialové zbarvení překryto modrou sraženinou hydroxidu měďnatého.

Pracovní postup:

- Do jedné zkumavky odlijte 1 ml roztoku kaseinu (před upotřebením zásobní roztok protřepejte), do druhé 1 ml roztoku vaječného bílku.
- Ke každému roztoku bílkoviny přilijte 1 ml roztoku hydroxidu sodného 2 mol/l.
- Do obou zkumavek přidávejte po kapkách roztok síranu měďnatého až do vzniku fialového zbarvení.

Poznámky

BÍLKOVINY

Klíčová slova: biuret, peptidová vazba, koloidní roztok, izoelektrický bod, amfionty, amfolyty, vliv pH na ionizaci bílkovin, hydrofilní a hydrofobní skupiny, emulgace, reverzibilní a irreverzibilní srážení bílkovin. elektroforéza, krevní plazma, krevní sérum, bílkoviny krevní plazmy, hypoproteinemie, hyperproteinemie, onkotický tlak, transportní proteiny, iontová síla.

Reagencie:

1. roztok vaječného bílku ve fyziologickém roztoku (1:10)
2. slunečnicový olej
3. roztok octanu olovnatého 0,01 mol/l !JED!
4. roztok kyseliny sulfosalicylové 0,8 mol/l
5. roztok Ajatinu zředěný 1:4
6. roztok kyseliny octové 0,15 mol/l
7. roztok kyseliny octové 1,5 mol/l
8. roztok hydroxidu sodného 2 mol/l !ŽIRAVINA!
9. chlorid sodný
10. vzorky krevního séra
11. souprava Celkové bílkoviny, BioSystems:

biuretové činidlo:

síran mědnatý 0,015 mol/l

hydroxid sodný 1,0 mol/l

Chelaton III 0,018 mol/l

standardní roztok bílkoviny (koncentrace standardu podle aktuálního zadání)

12. souprava Albumin, Biosystems:

pracovní roztok pro stanovení albuminu:

bromkresolová zeleň 0,27 mmol/l

citrátový pufr 0,1 mol/l, pH 4,1

standardní roztok albuminu (koncentrace standardu podle aktuálního zadání)

1. Emulgační schopnost bílkovin

Protože bílkoviny obsahují hydrofilní i hydrofobní skupiny, mají emulgační schopnosti podobně jako jiné tenzidy. Tenzidy, které jsou součástí detergentů, snižují povrchové napětí na rozhraní hydrofilní a hydrofobní fáze. Jejich účinkem vzniká poměrně stabilní emulze tuků ve vodě. Tato vlastnost bílkovin, především albuminu, se uplatňuje při transportu hydrofobních látek krví (např. mastných kyselin, steroidních hormonů, bilirubínu). Přirozenou emulzí tuků ve vodě je mléko, v němž bílkoviny působí jako emulgátor.

Pracovní postup:

- Do zkumavky odlijte 1 ml roztoku bílku a 1 kapku slunečnicového oleje. Po protřepání se vytvoří emulze.
- Do druhé zkumavky odlijte 1 ml destilované vody a 1 kapku slunečnicového oleje. Po protřepání se obě vrstvy opět oddělí.

Poznámky:

2. Ireverzibilní srážení bílkovin

Denaturace je změna konformace nativní molekuly bílkoviny, která tím přechází na méně uspořádanou formu a ztrácí svou biologickou funkci. Denaturačně působí všechny vlivy, které porušují nekovalentní interakce vytvářející sekundární a terciární strukturu bílkovin.

Mezi fyzikální vlivy patří především rozptýlení bílkoviny na velkém povrchu (pěněním roztoků) a zvýšená teplota. Srážení varem nastává nejrychleji v okolí pI bílkovin. K chemické denaturaci dochází např. působením silných kyselin, které ruší iontové interakce změnou náboje, naproti tomu organická rozpouštědla a tenzidy narušují nepolární interakce. Primárním účinkem všech denaturačních činidel je rozvinutí peptidového řetězce, snížení solvatace molekuly a tím i rozpustnosti bílkoviny.

Srážení bílkovin, při kterém dochází k denaturaci bílkovin, může být vyvoláno např. i ionty těžkých kovů, které s bílkovinami vytvářejí sole nebo komplexní sloučeniny. Díky této schopnosti se mohou bílkoviny používat jako antidotum při otravách těžkými kovy.

Denaturace bílkovin koncentrovanou kyselinou dusičnou se využívala jako Hellerova zkouška pro důkaz bílkovin v moči. V současné době se používá reakce s kyselinou sulfosalicylovou, která je nejcitlivější. Podobný účinek na bílkoviny jako kyselina sulfosalicylová mají i další silné organické kyseliny např. kyselina trichloroctová nebo pikrová, které slouží jako deproteinační činidla.

Denuraci způsobují i kvartérní alkylamoniové sole, které vytvářejí s negativně nabitými ionty bílkovin těžce rozpustné soli. Na tomto jevu jsou založeny desinfekční účinky Ajatinu (kvartérní amoniové sole s alkylem C₈–C₁₈ jako substituentem). Podobnou strukturu a tedy i vlastnosti má i další desinfekční prostředek Septonex. Kationty těchto tenzidů se adsorbují na buněčné stěny mikrobů, denaturují jejich životně důležité bílkoviny a tím blokují transportní funkci membrány mikrobů.

Ajatin, Benzododecinií bromidum:



POZOR! V následujících úlohách používejte jako bílkovinu roztok vaječného bílku.

2.1. Srážení těžkými kovy

Pracovní postup:

- Do zkumavky odlijte 1 ml bílkoviny a po kapkách přidávejte roztok octanu olovnatého, dokud nevznikne sraženina. V nadbytku soli se sraženina rozpustí.

2.2. Srážení kyselinami

Pracovní postup:

- Do zkumavky odlijte 1 ml bílkoviny a přidejte několik kapek roztoku kyseliny sulfosalicylové, vytvoří se bílá sraženina.

2.3. Srážení Ajatinem

Pracovní postup:

- Do zkumavky odlijte 1 ml bílkoviny a po kapkách přidávejte roztok Ajatinu, dokud nevznikne sraženina.

2.4. Srážení varem

Pracovní postup:

- Do 5 zkumavek odlijte 1 ml bílkoviny a další reagenty dle návodu:
zkumavka 1 – pouze bílkovina
zkumavka 2 – přidejte kapku kyseliny octové 0,15 mol/l
zkumavka 3 – přidejte několik kapek kyseliny octové 1,5 mol/l
zkumavka 4 – přidejte několik kapek kyseliny octové 1,5 mol/l a malé množství chloridu sodného
zkumavka 5 – přidejte několik kapek roztoku hydroxidu sodného 2 mol/l
- Zkumavky povařte ve vodní lázni.
- Výsledky запиšte do tabulky 1., vznik sraženiny označte +.

Tabulka 1.

zkumavka	1	2	3	4	5
sraženina					

Poznámky:

3. Stanovení koncentrace bílkovin v séru

Krevní plazma obsahuje asi 100 různých proteinů, podle jejich elektroforetických vlastností jsou obvykle rozdělovány do 5 různých skupin - albumin a α_1 , α_2 -, β - a γ -globuliny. Bílkoviny krevní plazmy kromě svých specifických funkcí zajišťují koloidně osmotický (onkotický) tlak, který má význam pro udržení normálního objemu krve. Dále se podílejí na udržování acidobazické rovnováhy a transportu lipofilních látek a iontů kovů.

Většina plazmatických bílkovin je syntetizována v játrech (mimo imunoglobuliny a proteohormony). S výjimkou albuminu jsou bílkoviny krevní plazmy glykoproteiny.

Za fyziologického stavu jsou plazmatické proteiny ve vzájemné rovnováze a neustále se obnovují. Za patologických stavů dochází k porušení této rovnováhy, a tím i ke změnám jejich koncentrace a vzájemného zastoupení jednotlivých frakcí (dysproteinemie) (viz úloha 1.). Koncentrace celkových bílkovin je snížena (hypoproteinemie) při jejich nedostatku v potravě, nedostatečném vstřebávání nebo syntéze, při jejich zvýšené spotřebě (např. u dlouhodobých infekčních onemocnění nebo u nádorových procesů) nebo ztrátě (u nefrotického syndromu, u popálenin, při silném krvácení). Zvýšená koncentrace bílkovin (hyperproteinemie) bývá např. při dehydrataci nebo paraproteinemii.

Koncentrace celkové bílkoviny se stanovuje v krevním séru, jednou z používaných metod je biuretová reakce. Intenzita modrofialového zbarvení komplexu se stanovuje spektrofotometricky a je přímo úměrná počtu peptidových vazeb. Jinou možností je UV spektroskopie, využívající absorbanci peptidové vazby při 280 nm.

Pracovní postup:

- Vzorek séra i standard zpracujte v tripletu, slepý vzorek jednou.
- Do zkumavek napipetujte reagentie podle tabulky 2., malé objemy pipetujte ke dnu zkumavky!

Tabulka 2.

reagentie (ml)	vzorek	standard	slepý vzorek
sérum	0,02	–	–
standardní roztok bílkoviny	–	0,02	–
destilovaná voda	–	–	0,02
biuretové činidlo	1,5	1,5	1,5

- Každou zkumavku dobře promíchejte.
- Přesně po 12 min změřte absorbanci při 540 nm proti slepému vzorku.
- Naměřené hodnoty запиšte do tabulky 2.
- Z průměrných hodnot absorbance vzorku (A_{vz}) a standardu (A_{st}) vypočítejte koncentraci celkové bílkoviny (g/l) v určeném séru.
- Výsledek запиšte do tabulky 3.

Tabulka 3.

vzorek č.:	absorbance			průměr	c (g/l)
standard PROT					
sérum					

Normální hodnoty spektra sérových bílkovin

Elektroforéza proteinů (kapilární krev)	S	prealbumin		120 - 420 mg/L
		albumin	56 – 65,7 %	35 -53 g/L
		alfa-1	3,1 – 5,6 %	1 - 4 g/L
		alfa-2	8,0 – 12,7 %	3 - 9 g/L
		beta 1	4,9 – 7,2 %	7 - 15 g/L
		beta 2	3,1 – 6,1 %	
		gama	10,3 – 18,2 %	5 - 14 g/L

Frakce serových proteinů a stavy spojené se zvýšením nebo snížením jejich hladiny

Frakce sérového proteinu	Zvýšená hladina	Snížená hladina
Albumin	Těžká dehydratace	Malnutrice, kachexie, choroba jater, nefrotický syndrom, enteropatie se ztrátou proteinů, těžké spáleniny
Alfa-1	Zánětlivé stavy, těhotenství	Alfa-1 antitrypsinová deficience
Alfa-2	Zánětlivé stavy, nefrotický syndrom, užívání perorálních kontraceptiv, užívání steroidů, hyperthyroidismus	Hemolýza, choroba jater
Beta	Hyperlipidemie, hypochromní anémie (z nedostatku Fe)	Hypo-B-lipoproteinemie, malnutrice
Gama	Polyklonální a monoklonální gamopatie	Agamaglobulinemie, hypogamaglobulinemie

Poznámky:

4. Stanovení koncentrace albuminu v séru

Nejdůležitějším proteinem v krvi je z kvantitativního pohledu albumin (tvoří 60 % všech bílkovin krevní plazmy). Fyziologická funkce albuminu spočívá v regulaci plazmatického objemu, dále plní transportní funkci (přenáší např. mastné kyseliny, lipidy, bilirubin, některé hormony, vitaminy, ionty kovů, léky i toxické látky). Má i funkci rezervní bílkoviny a při zátěži organismu slouží jako bohatá rezerva aminokyselin, zvláště esenciálních.

Zvýšená koncentrace albuminu v krvi (hyperalbuminemie) bývá obvykle jen sekundární následek dehydratace. Hypoalbuminemie doprovází mnoho onemocnění (např. infekce, choroby jater, nefrotický syndrom), biochemickou příčinou je buď snížení jeho syntézy nebo zvýšení jeho odbourávání.

Albumin se řadí mezi tzv. negativní proteiny akutní fáze podobně jako transferrin, glykoprotein přenášející krevní plazmou železo jako Fe^{3+} . V akutní fázi je jejich koncentrace v plazmě nižší, protože na jejich úkor připadá zvýšená syntéza pozitivních proteinů akutní fáze (např. C-reaktivní protein).

Ke stanovení albuminu je také vhodné sérum. Běžná metoda využívá reakce albuminu s bromkresolovou zelení, která tvoří s albuminem, v slabě kyselém prostředí a za přítomnosti povrchově aktivních látek, barevný komplex vhodný k fotometrování (s globuliny nereaguje).

Pracovní postup:

- Stanovení albuminu proved'te ve **stejném** séru, ve kterém jste stanovovali koncentraci bílkovin.
- Vzorek séra i standard zpracujte v tripletu, slepý vzorek jednou.
- Do zkumavek napipetujte reagentie podle tabulky 4., malé objemy pipetujte ke dnu zkumavky!

Tabulka 4.

reagencie (ml)	vzorek	standard	slepý vzorek
sérum	0,01	–	–
standardní roztok albuminu	–	0,01	–
destilovaná voda	–	–	0,01
pracovní roztok	1,0	1,0	1,0

- Každou zkumavku dobře promíchejte.
- Nechte inkubovat 10 min při pokojové teplotě.
- Změřte absorbanci vzorku i standardu při vlnové délce 630 nm proti slepému vzorku.
- Naměřené hodnoty запиšte do tabulky 5.
- Z průměrných hodnot absorbance vzorku (A_{vz}) a standardu (A_{st}) vypočítejte koncentraci albuminu (g/l) v určeném séru.
- Výsledek запиšte do tabulky 5.

Tabulka 5.

vzorek č.:	absorbance			průměr	c (g/l)
standard _{ALB}					
sérum					

VYHODNOCENÍ:**Tabulka 6.****vzorek séra č.:**

stanovovaná bílkovina	REFERENČNÍ HODNOTY	NAMĚŘENÉ HODNOTY
celková bílkovina (g/l)	65 - 85	
albumin (g/l)	35 - 53	

ENZYMY

Klíčová slova: biokatalýza, aktivita enzymu, holoenzym, apoenzym, koenzym, substrátová a reakční specifita enzymu, pH-optimum, teplotní optimum, iontová síla. α -amylasa (EC 3.2.1.1.), pepsin (EC 3.4.23.1), trypsin (EC 3.4.21.4).

Reagencie:

1. roztok trypsinu (z Pancreolanu, směs glycerol:voda 1:1)
2. roztok kaseinu 40g/l v uhličitanu sodném 0,01 mol/l
3. konc. kyselina dusičná **!ŽIRAVINA!**
4. kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l
5. suspenze vaječného bílku ve fyziologickém roztoku 300g/l
6. roztok pepsinu
7. roztok α -amylázy (sliny ředěné 10x destilovanou vodou a přefiltrované přes gázu)
8. roztok chloridu sodného 0,1 mol/l
9. roztok chloridu měďnatého 0,1 mol/l
10. roztok chloridu vápenatého 0,1 mol/l
11. roztok chloridu rtuťnatého 0,1 mol/ **!JED!**
12. tablety zesíťovaného chromogenního škrobu
13. zastavovací roztok (uhličitan sodný 10 g/l ve směsi voda : aceton 9:1)

1. Aktivace a inhibice α -amylasy anorganickými ionty

Některé kationty s oxidačním číslem +II (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) působí jako aktivátory enzymů tvorbou komplexů s enzymem nebo substrátem. Kationty s oxidačním číslem +I a anionty mohou působit jako nespecifické efekторы změnou iontové síly. Kationty některých těžkých kovů enzymy zpravidla inhibují.

Jako α -amylasu použijte sliny 10x zředěné destilovanou vodou a přefiltrované přes gázu, jako substrát se bude používat nerozpustný zesíťovaný škrob s kovalentně navázaným modrým barvivem. Enzymovou hydrolýzou vznikají barevné rozpustné oligosacharidy. Intenzita vzniklého zbarvení, která je úměrná aktivitě přítomné α -amylasy, se stanoví fotometricky.

Pracovní postup:

- Do pěti označených zkumavek připravte inkubační směs podle tabulky 1.

Tabulka 1.

zkumavka	1	2	3	4	5
NaCl (ml)	–	0,1	–	–	–
CuCl ₂ (ml)	–	–	0,1	–	–
CaCl ₂ (ml)	–	–	–	0,1	–
HgCl ₂ (ml)	–	–	–	–	0,1
destilovaná voda (ml)	2,0	1,9	1,9	1,9	1,9
α -amylasa (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
absorbance 620 nm					
katal. akt. ($\mu\text{kat/l}$)					

- Obsah zkumavek promíchejte a preinkubujte 30 min v termoblokuo teplotě 37° C (účinek iontů se projeví výrazněji, jsou-li ponechány v přítomnosti enzymu určitou dobu před začátkem vlastní enzymové reakce).
- Po preinkubaci dejte do každé zkumavky pinzetou 1 tabletu škrobu (**NEMÍCHAT!**), zkumavky přitom nevyndávejte z termobloku.
- Inkubujte dalších 15 min.
- Přesně po 15 min vyjměte zkumavky z termobloku a ihned přidejte do každé zkumavky z dávkovače 2 ml zastavovacího roztoku pro ukončení enzymové reakce.
- Obsah zkumavek dobře promíchejte a nechte stát 5 min.
- Potom zfiltrujte do suchých zkumavek.
- Změřte absorbanci při 620 nm a naměřené hodnoty absorbance zapište do tabulky 2.
- Jako porovnávací vzorek použijte destilovanou vodu.
- K naměřeným hodnotám absorbance vyhledejte v přiložené kalibrační tabulce hodnoty katalytické aktivity (μkat/l) a zapište je do tabulky 3.
- Vzorek, jehož hodnota absorbance bude větší než 1,00, zřed'te 5x destilovanou vodou (pro ředění odpipetujte 0,5 ml roztoku) a znovu změřte. Vyhledanou hodnotu katalytické aktivity enzymu 5x vynásobte.

2. Důkaz aktivity trypsinu in vitro (kvalitativně)

Trypsin je serinová endopeptidasa, která hydrolyticky štěpí peptidové vazby, na nichž se podílí svým C-koncem arginin a lysin. Vzniklé štěpy na rozdíl od původní bílkoviny netvoří s koncentrovanou kyselinou dusičnou sraženinu.

Pracovní postup:

- Do velké zkumavky nalijte 3ml roztoku kaseinu (před použitím protřepat) a přidejte 1 ml roztoku trypsinu
- Promíchejte, uzavřete hliníkovou folií a vložte do termobloku 37°C
- **Během celého pokusu NEVYNDÁVEJTE zkumavku z termobloku!**
- Pro porovnání reakce hydrolyzátů s reakcí nativního kaseinu si připravte „slepý vzorek“ (odpovídá času 0 min): do zkumavky dejte 0,5 ml roztoku kaseinu a z dávkovače přidejte 0,5 ml koncentrované kyseliny dusičné.
- Každých 15 minut odeberte plastikovou pipetkou vzorek (asi 0,5 ml) inkubační - směsi do nové zkumavky.
- Ke každému odebranému vzorku přidejte dávkovače 0,5ml koncentrované kyseliny dusičné a podle množství vzniklé sraženiny sledujte jak postupuje hydrolýza kaseinu.
- Výsledky zapište do tabulky 2., použijte znamének + a –

Tabulka 2.

Čas (min)	0	15	30	45	60
Sraženina					

3. Vliv pH na aktivitu enzymu

Pracovní postup:

- Do 4 zkumavek napipetujte reagenty dle následující tabulky

Tabulka 3.

Výsledné pH	1,2	1,5	2,5	kontrola
Roztok pepsinu (ml)	1,0	1,0	1,0	0
) 0,1 mol/l HCl (ml)	2,0	1,0	0,1	1,0
Deionizovaná H ₂ O (ml)	-	1,0	1,9	2,0
Suspenze vaječného bílku (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5

- Inkubujte 20 min. při 37 °C v termobloku
- Po skončení inkubace vyhodnoťte projasnění obsahu zkumavek natrávením bílkovin vaječného bílku a výsledky zapište do tabulky v protokolu.
- Výsledky: projasněné úplné (+), částečné (±) a neprojasnění (-). Optimální pH je ve zkumavce s úplným projasněním obsahu.

Poznámky:

BIOLOGICKÉ OXIDACE

Klíčová slova: oxidace, redukce, redox potenciál, citrátový cyklus, dýchací řetězec, sukcinátdehydrogenasa (EC 1.3.99.1), katalasa (EC 1.11.1.6), peroxidasa (POD - EC 1.11.1.7), superoxidový radikál, pseudoperoxidasová reakce.

Reagencie:

1. čerstvé hovězí srdce – enzymový extrakt
2. fosfátový pufr 0,1 mol/l, pH 7,4
3. roztok methylenové modře 0,1 g/l
4. roztok jantaranu sodného 0,1 mol/l ve fosfátovém pufru
5. roztok malonanu sodného 1 mol/l ve fosfátovém pufru
6. extrakt z brambor
7. roztok o-tolidinu (3,3'-dimethylbenzidinu) v ledové kyselině octové 0,01 mol/l **!JED!**
8. peroxid vodíku 1 mol/l
9. krev zředěná vodou 1:300
- 10.
11. parafínový olej
12. roztok kyanidu draselného 0,02 mol/l **!JED!**

Oxidoredukční (redoxní) reakce jsou spojeny s přesunem elektronů a mohou být pro organismy zdrojem volné energie. Mezi oxidoreduktasy řadíme enzymy, které svoji reakci uskutečňují jako přenos elektronů (oxidasy), celých atomů vodíku (hydrogenasy, dehydrogenasy) a nebo kyslíku (oxygenasy) a tzv. hydroperoxidasy zajišťující degradaci toxického peroxidu vodíku.

Biologické oxidace I – Citrátový cyklus, dýchací řetězec a oxidativní fosforylace

Citrátový cyklus je universální metabolický mlýn, ve kterém se spojuje katabolismus sacharidů, tuků a aminokyselin a jeho cílem je zejména produkce redukovaných koenzymů pro energetické využití. Je lokalizovaný v matrix a vnitřní membráně mitochondrií. V jednom běhu citrátového cyklu (zpracování 1 molekuly acetylkoenzymuA) vznikají 3 molekuly NADH, 1 FADH₂, molekula GTP, následně přeměněná na ATP a 2 CO₂.

Bylo popsáno velmi málo abnormalit enzymů citrátového cyklu, defekty metabolismu tohoto charakteru jsou pravděpodobně neslučitelné se životem.

Oxidativní fosforylace je proces tvorby ATP, při využití protonového gradientu vzniklého během přenosu elektronů z NADH a FADH₂ na O₂ přes řadu přenašečů (dýchací řetězec). Elektronový transportní řetězec je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a tvoří ho systém membránových komplexů oxidoreduktas (I. NADH – ubichinon oxidoreduktasa, II. sukcinát-ubichinonreduktasa, III. ubichinon-cytochrom c-oxidoreduktasa a IV. cytochrom c-oxidasa) a mobilních přenašečů elektronů (ubichinon, Fe-S proteiny a cytochromy). Společně přenášejí protony a elektrony. Tok protonů pohání uvolňování nasyntetizovaného ATP z ATP syntasy. Elektrony redukují O₂ na O²⁻ reagující s protony v mitochondriální matrix na konečný produkt této metabolické dráhy – H₂O (tzv. metabolická voda).

Rychlost oxidativní fosforylace je určena potřebou ATP. Podmínkou je dostatečná nabídka redukovaných koenzymů, O₂, ADP a P_i.

Mezi respirační inhibitory patří například barbituráty a insekticid a pesticid rotenon, které blokují přenos elektronů mezi komplexem I a ubichinonem, dále pak antibiotikum antimycin A inhibující řetězec v místě přenosu mezi cytochromem c₁ a komplexem III. Oxid uhelnatý, sulfan, azidy a kyanidy blokují přenos elektronů na kyslík na úrovni cytochromoxidasy. Mezi rozpojovače dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace se řadí například 2,4-dinitrofenol, nebo ve zvýšených dávkách hormon thyroxin. Tyto látky způsobí, že dochází k přenosu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu jiným způsobem než přes ATP syntasu. Nedochází tedy k syntéze ATP a chemiosmotický gradient je přeměněn na teplo. Organismus pociťující nedostatek ATP začne ve zvýšené míře metabolizovat živiny. Hypertyreóza, spojená s nadprodukcí thyroxinu se klinicky projevuje hubnutím a zvýšením tělesné teploty. Podobné příznaky má intoxikace 2,4-dinitrofenolem.

Vrozené metabolické vady oxidativní fosforylace a dýchacího řetězce se projevují postižením orgánů s vysokým energetickým obrátem, jako jsou svaly (myopatie), mozek (encefalopatie) a oční nerv (slepota) – Leberova hereditární optická neuropatie. Biochemicky často nalézáme laktacidózu jako důsledek posunu k anaerobnímu metabolismu.

Důkaz dehydrogenas citrátového cyklu

Oxidační reakce citrátového cyklu, katalyzované isocitrátdehydrogenasou, 2-oxoglutarátdehydrogenasou, sukcinátdehydrogenasou a malátdehydrogenasou, jsou zdrojem redukovaných koenzymů NADH a FADH₂, které přenášejí atomy vodíku do dýchacího řetězce. Ty jsou dále přenášeny jednotlivými články dýchacího řetězce jako protony a elektrony až na konečný akceptor - molekulový kyslík.

Jako substrát je v tomto modelovém pokusu používán sukcinát, jako akceptor atomů vodíku slouží methylenová modř:

Ox / Red	E ₀ '(V)
fumarát / sukcinát	+0,03
methylenová modř / leukoforma	+0,01
O ₂ / H ₂ O ₂	+0,68

Dehydrogenace v tomto uspořádání probíhá spontánně, přestože standardní redox potenciál soustavy fumarát/sukcinát je vyšší (+0,03 V) než redox potenciál soustavy methylenová modř/leukoforma (+0,01 V). Aktuální potenciál redox soustavy záleží podle Nernstovy-Petersovy rovnice i na koncentracích redukované a oxidované složky obou soustav. V tomto uspořádání je vyšší koncentrace redukované formy (sukcinát) jedné redox soustavy a současně je vyšší koncentrace oxidované formy (methylenová modř) druhé soustavy. To ovlivní hodnoty aktuálních redox potenciálů tak, že redukce methylenové modře sukcinátem probíhá samovolně.

V tomto modelovém pokusu je také demonstrována inhibice sukcinátdehydrogenasy malonátem, který je kompetitivním inhibitorem tohoto enzymu díky své strukturní podobnosti se sukcinátem.

Pracovní postup:

- Do 4 zkumavek, napipetujte 1 ml enzymového extraktu.
- Do zkumavky č. 3 napipetujte 0,5 ml roztoku malonanu sodného a nechte inkubovat 10 min při laboratorní teplotě (viz tabulka 1.).
- Zkumavku č. 4. vložte do vroucí vodní lázně a 2 min povařte.
- Dále postupujte dle tabulky 1. (jednotlivé reagentie přidávejte do všech zkumavek v pořadí určeném řádky v tabulce).
- Po přidání každé reagentie obsah zkumavek protřepejte.

Tabulka 1.

zkumavka	1	2	3	4
enzymový extrakt (ml)	1	1	1	1
malonan sodný (ml)	–	–	0,5	–
inkubace 10 min. při laboratorní teplotě	–	–	ano	–
povařit 2 min. ve vroucí vodní lázni	–	–	–	ano
pufr (ml)	1,0	0,5	–	0,5
jantaran sodný (ml)	–	0,5	0,5	0,5
methylenová modř (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Zbarvení po inkubaci				
Zbarvení po protřepání				

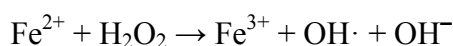
- Do každé zkumavky přidejte pomalu po její stěně parafrinový olej tak, aby vytvořil přibližně 5 mm vysokou vrstvu pro zachování anaerobních podmínek.
- Inkubujte 30 min při 37° C a průběžně sledujte postupné odbarvování methylenové modři.
- Po odbarvení příslušnou zkumavku protřepejte a nechte znovu reagovat.
- Výsledné zbarvení zapište do tabulky.

Poznámky:

Biologické oxidace II - Reaktivní formy kyslíku

Mezi reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) patří především volné kyslíkové radikály, tedy atomy nebo molekuly s volným nepárovým elektronem, který sloučenině propůjčuje vysokou reaktivitu. Kromě volných radikálů sem řadíme i další vysoce reaktivní sloučeniny, například peroxid vodíku. Důležití zástupci ROS jsou superoxid O_2^- , hydroxylový radikál $OH\cdot$ a peroxid vodíku H_2O_2 . Podobnou charakteristiku a význam jako ROS mají také sloučeniny označované jako RNS, reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species).

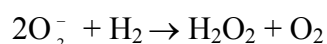
Hlavním místem vzniku ROS v organismu za fyziologických okolností je dýchací řetězec, ve kterém tyto sloučeniny vznikají jako vedlejší produkt při nedokonalé redukci kyslíku. Mimo to mohou kyslíkové radikály vznikat tzv. Fentonovou reakcí. Kovový iont (železo, méně často měď) zde reaguje s peroxidem vodíku za vzniku volného radikálu:



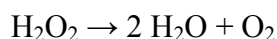
ROS jsou velmi reaktivní sloučeniny poškozující biologické makromolekuly. Mohou být například příčinou zlomů a mutací DNA, snižují aktivitu enzymů, poškozují iontové kanály v buněčných membránách a peroxidací membránových lipidů mohou měnit propustnost membrán a poškozovat je. S působením ROS je také spojován vznik celé řady onemocnění a patologických stavů, jako je ateroskleróza, reperfuční poškození ischemické tkáně a v neposlední řadě také neurodegenerativní procesy (Alzheimerova choroba). ROS a především RNS mají však i své významné fyziologické funkce (např. v buněčné imunitě a mezibuněčné signalizaci).

Nadbytek ROS je z organismu odstraňován pomocí několika enzymů, mezi něž patří superoxiddismutasa, katalasa a peroxidasa.

Superoxiddismutasa katalyzuje přeměnu volného radikálu superoxidu na peroxid vodíku, který je dále rozkládán katalasou a peroxidasou.



Katalasa rozkládá peroxid vodíku přímo na kyslík a vodu, jak je znázorněno v této reakci:



Peroxidasa potřebuje pro svoji činnost další molekulu, donor elektronů, pomocí kterých redukuje peroxid na vodu a tento donor tedy vystupuje z reakce ve své oxidované formě. Typickým příkladem sloučenin, které poskytují peroxidase elektrony pro redukci H_2O_2 , je glutathion, který je oxidován enzymem glutathionperoxidasou.

Důkaz peroxidasy

Peroxidasa (POD) katalyzuje redukci peroxidu vodíku na vodu za současné oxidace vhodného reaktantu, v tomto případě o-tolidinu. Jeho oxidační produkt je zbarven modrozeleně:



Podobné reakce jsou využívány při spektrofotometrickém stanovení koncentrace různých metabolitů (např. glukosy, kyseliny močové, cholesterolu) v séru nebo moči, kde peroxid vodíku vzniká jako vedlejší produkt v příslušné enzymové reakci. Jeho množství, přímo úměrné koncentraci stanovované látky, se zjišťuje v následné peroxidasové reakci. Přidaný chromogen (AH_2) se v jejím průběhu oxidační na barevnou sloučeninu vhodnou k fotometrickému stanovení.

Pracovní postup:

- Do čtyř zkumavek připravte inkubační směs, postupujte v pořadí daném řádky v tabulce 2.
- Extrakt ve zkumavce 2 povařte asi 2 min ve vroucí vodní lázni.
- Výsledné zbarvení v jednotlivých zkumavkách запиšte do tabulky 3.

Tabulka 2.

zkumavka	1	2	3	4
extrakt z brambor (ml)	1	1	1	–
povařit 2 min ve vroucí vodní lázni	–	ano	–	–
o-tolidin v kyselině octové	4 kapky	4 kapky	4 kapky	4 kapky
peroxid vodíku (ml)	0,5	0,5	–	0,5
destilovaná voda (ml)	–	–	0,5	1
Zbarvení				

Poznámky:

Důkaz katalasy a pseudoperoxidasové reakce

Katalasa je hemový enzym, přítomný ve většině aerobních buněk. V lidském organismu je její aktivita nejvyšší v hepatocytech a erythrocytech. Na subcelulární úrovni je lokalizována převážně v peroxisomech (obsahují enzymy, produkující peroxid vodíku).

Odstraňování peroxidu vodíku peroxidasou a katalasou má význam např. v prevenci Fentonovy reakce.

V této úloze je demonstrována katalasová aktivita krve, která se projeví vývojem kyslíku. Katalasa je inhibována kyanidem, podobně jako cytochromoxidasa.

V krvi lze kromě aktivity katalasy a peroxidasy prokázat také pseudoperoxidasovou aktivitu. Ta je vázána na přítomnost železnatého iontu v krevním barvivu hemoglobinu. Fe^{2+} katalyzuje rozklad peroxidu vodíku. Výsledkem je opět redukce peroxidu na vodu a oxidace o-tolidinu na zelenomodrý oxidační produkt. Protože tato reakce není enzymově katalyzovaná, nedá se, na rozdíl od reakce katalyzované peroxidasou, inaktivovat varem. Pseudoperoxidasová reakce se používá k důkazu krve v moči.

Pracovní postup:

- Do tří zkumavek odměřte po 1 ml zředěné krve.
- Krev ve zkumavce 2 povařte asi 2 min ve vroucí vodní lázni a následně ochlaďte pod tekoucí vodou.
- Do všech zkumavek odměřte reagentie v pořadí daném řádky v tabulce 3.
- Roztok kyanidu draselného přidejte z dávkovače!

Tabulka 3.

zkumavka	1	2	3
zředěná krev (ml)	1	1	1
povařit 2 min ve vroucí vodní lázni	–	ano	–
kyanid draselný (ml)	–	–	0,2
peroxid vodíku (ml)	0,2	0,2	0,2
vývoj kyslíku			
o-tolidin v k. octové	2 kapky	2 kapky	2 kapky
Zbarvení			

Poznámky:

TRÁVENÍ ŠKROBU

Klíčová slova: biokatalýza, aktivita enzymu, substrátová a reakční specifita enzymu, kyselá hydrolýza škrobu, složení a struktura škrobu., sacharasa (EC 3.2.1.26), α -amylasa (EC 3.2.1.1.).

Reagencie:

1. roztok sacharasy (50 g kvasnic ve 100 ml ethanolu 500 g/l)
2. roztok α -amylasy (sliny 10x zředěné destilovanou vodou a přefiltrované přes gázu)
3. roztok škrobu 10 g/l
4. suspenze celulosy 2,5 g/l
5. roztok sacharosy 5 g/l
6. Fehlingův roztok I (síran měďnatý 70 g/l)
7. Fehlingův roztok II (125 g hydroxidu sodného a 175 g vinanu sodnodraselného v 1 l vody)
8. Lugolův roztok (roztok jodu 20 g/l v roztoku jodidu draselného 40 g/l) 50x zředěný
9. Konc. Kyselina chlorovodíková **!ŽIRAVINA!!**

Důkaz substrátové specifity glykosidas (sacharasy a α -amylasy)

α -amylasy (α -1,4-glukan-4-glukan-hydrolasy, EC 3.2.1.1) patří mezi glykosidasy. Glykosidasy náleží mezi hydrolytické enzymy, které jsou specifické vůči typu glykosidové vazby (α -glykosidasy nebo β -glykosidasy) a molekuly sacharidu. Jsou to kalcium metaloenzymy. Hydrolyzují škrob, ale i glykogen z potravy na trisacharidy a disacharidy, které jsou dále konvertovány dalšími enzymy na glukosu. Pomalu a nespecificky štěpí také polyfruktan inulin.

Elektroforetická analýza krevního séra ukázala přítomnost dvou hlavních typů α -amylasy. Jedná se o dva izoenzymy kódované dvěma geny ležícími ve stejném lokusu (Chr 1: 103.66 – 103.66 Mb), α -amylasu P (pankreatickou), gen *AMY-2* a S (slinnou – salivary), gen *AMY-1*. Obě α -amylasy jsou α -glykosidasy a štěpí α -1,4-D-glykosidové vazby v substrátech obsahujících tři a více D-glykosových zbytků spojených vazbou α -1,4. S-amylasa se podílí na natrávení škrobu, částečně již v ústní dutině a P-amylasa pak především v duodenu. α -amylasa štěpí dlouhé řetězce polysacharidů tvořených α -1,4-D-glukosidovými vazbami až na maltotriosu a maltosu v případě amylosy, nebo maltosu, glukosu a "limitní dextrin" u amylopektinu.

U zdravých jedinců, jsou pankreas a slinné žlázy zdrojem téměř veškeré sérové amylasy, 40 - 45 % pochází z pankreatu a 55 – 60 % ze slinných žláz.

Hladina celkové α -amylasy je zvýšena u onemocnění akutní pankreatitidou, ale i u většiny případů bolestí břicha. Pro diagnostiku pankreatitidy má vyšší diagnostický přínos stanovení pankreatického izoenzymu (P-amylasy). Protože je molekula α -amylasy relativně malá, přestupuje do moči a můžeme její patologické zvýšení u akutní pankreatitidy detekovat i v moči. Toto zvýšení přetrvává déle a nastupuje později než zvýšení hladiny v séru. S-amylasa je zvýšena u onemocnění slinných žláz.

Hladina sérových α -amylas je snižována ledvinovou clearance a proto poškození funkce ledvin může vést k arteficiálnímu zvýšení jejich hladiny, resp. aktivity obou enzymů.

K arteficiálnímu zvýšení amylasy může také vést i porucha jaterní funkce při zánětu jater (hepatitidě) nebo cirhóze.

Příčinou zcela benigního zvýšení aktivity sérové α -amylasy může být tzv. “makroamylasemie”, kdy se molekuly amylasy vážou s velkou komplexní molekulou, např. imunoglobulinem nebo polysacharidem. Tato makromolekula je příčinou snížení ledvinové clearance enzymu a prodloužením jeho poločasu. Asi 2 – 5 % pacientů s hyperamylasemií má makroamylasemii.

Sacharasa z kvasnic štěpí β -fruktosidovou vazbu mezi fruktosou a glukosou v sacharose, která je α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid.

Cílem této úlohy je prokázat přítomnost produktů štěpení slinnou α -amylasou a sacharosou. Produkty hydrolytické reakce budou mít volné anomerní hydroxylové skupiny, a tudíž budou redukovat Fehlingovo činidlo. Škrob můžeme prokázat reakcí s Lugolovým činidlem (roztok jodu), zatímco produkty enzymatické hydrolýzy tuto reakci neposkytují.

Pracovní postup:

- Jako α -amylasu použijte sliny 5x zředěné destilovanou vodou a přefiltrované přes gázu.
 - Do označených zkumavek připravte směs substrát - enzym podle tabulky 1.
 - Nechte 30 min inkubovat při 37 °C, potom reakci ukončete vyndáním z termobloku.
 - S polovičním množstvím inkubační směsi z každé zkumavky proveďte reakci s Fehlingovým činidlem (poměr činidlo : inkubační směs = 1:1).
 - Ve zkumavkách, ve kterých byl jako substrát polysacharid, proveďte také reakci s jodem.
- (Stejnou reakci s jodem proveďte i s nativními polysacharidy a porovnejte zbarvení)
- Výsledky zanepte do tabulky 1. pomocí symbolů + a –.

Tabulka 1.

zkumavka	1	2	3	4	5	6
škrob (ml)	1	–	–	1	–	–
celulosa (ml)	–	1	–	–	1	–
sacharosa (ml)	–	–	1	–	–	1
sacharasa (ml)	0,25	0,25	0,25	–	–	–
α -amylasa (ml)	–	–	–	0,25	0,25	0,25
Fehlingova reakce						
reakce s jodem						

Amylasa	Sérum/moč	μ kat/l
celková	S	0,30 – 1,67
	moč	< 7,67
pankreatická	S	0,22 – 0,88
	moč	< 5,83

Poznámky:

Kyselá hydrolýza škrobu

Molekuly glukosy jsou ve škrobu vázány α -D-(1 $\rightarrow$ 4) glykosidovými vazbami, které nejsou stálé v kyselém prostředí. Proto se kyselou hydrolýzou polysacharidy postupně štěpí na polysacharidy s kratším řetězcem, oligosacharidy, maltosu a nakonec D-glukosu. Průběh hydrolýzy se projevuje postupnou změnou zbarvení hydrolyzátu s jodem, protože zkracování šroubovice amylosy mění barvu komplexu škrobu s jodem.

Pracovní postup:

- Připravte 8 zkumavek a do každé odlejte asi 1 ml zředěného Lugolova roztoku.
- Do malé Erlenmeyerovy baňky odměřte válečkem 15 ml škrobového mazu a zahřejte na ploténce k varu.
- Z dávkovače odměřte do další zkumavky 0,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a opatrně ji přilijte k vroucí směsi.
- Okamžitě odeberte pomocí plastické pipetky malý vzorek reakční směsi a přidejte do první zkumavky s Lugolovým roztokem. Baňku přikryjte hliníkovou folií a udržujte mírný var.
- Tento postup opakujte každou minutu a pozorujte změnu zbarvení.
- Jestliže se již Lugolův roztok hydrolyzátem nebarví, povařte reakční směs ještě 3 min, aby hydrolýza proběhla úplně.
- Se vzorkem hydrolyzátu proveďte Fehlingovu zkoušku.
- Zbarvení jednotlivých frakcí zapište do tabulky 2.

Tabulka 2.

zkumavka	1	2	3	4	5	6	7	8
zbarvení								

Poznámky:

TRÁVENÍ A VSTŘEBÁVÁNÍ LIPIDŮ

Klíčová slova: lipidy, triacylglyceroly, 2-monoacylglyceroly, mastné kyseliny, esterová vazba, hydrolytické štěpení tuků, pankreatická lipasa (EC 3.1.1.3), tenzidy, soli žlučových kyselin, volné radikály, řetězová reakce, buněčné membrány, peroxidy, reakce aldehydů s aminoskupinami, antioxidanty, cheláty.

Reagencie:

1. extrakt pankreatické lipasy
(obsah Pancreolanu ZENTIVA, rozpustit ve 400 ml směsi voda - glycerol 1:1, zfiltrovat)
2. olivový olej
3. ethanol
4. roztok hydroxidu sodného 0,01 mol/l
5. roztok fenolftaleinu v ethanolu 2 g/l.
6. fosfátový pufr 0,05 mol/l, pH 7
7. fosfátový pufr 0,05 mol/l, pH 9
8. roztok solí žlučových kyselin o koncentraci 100g/l
9. roztok kyseliny olejové 10g/ v ethanolu

Tuky by měly ve vyvážené stravě dospělého člověka představovat přibližně 25 - 30 % energetického příjmu. Jedná se především o triacylglyceroly, tj. estery glycerolu a mastných kyselin, které slouží jako hlavní energetická zásoba u většiny živočichů. Při jejich trávení v tenkém střevě dochází nejprve k hydrolyze esterových vazeb za vzniku 2-monoacylglycerolů a mastných kyselin (pouze 20 % triacylglycerolů je rozloženo až na glycerol poté co dojde ke spontánní izomerizaci 2-monoacylglycerolu na 1- či 3-monoacylglycerol). Volné mastné kyseliny podléhají zmýdelnění a také fungují jako přídatné detergenty, resp. emulgátory. Po vstřebání do enterocyty dochází k resyntéze triacylglycerolů, které jsou následně uvolněny do krevního oběhu ve formě chylomiker.

Význam žlučových kyselin

Triacylglyceroly jsou ve střevě vzhledem ke své hydrofobii přítomny ve formě tukových kapének, pro jejich efektivní trávení musí nejprve dojít k emulgaci na menší částice. Tomu napomáhá peristaltika trávicího traktu a zejména přítomnost žlučových kyselin a fosfolipidů žluči. Žlučové kyseliny jsou syntetizovány v hepatocytech z cholesterolu (primární žlučové kyseliny cholová a chenodeoxycholová) a secernovány do žluče. Působí jako detergenty, hydrofobní část představuje cyklopentanoperhydrofenantrenové jádro, za hydrofilii jsou zodpovědné hydroxylové skupiny a karboxylová skupina, na kterou může být amidovou vazbou navázán glycin či taurin (konjugované žlučové kyseliny). 90 – 95 % žlučových kyselin je v terminálním ileu zpětně resorbováno a prodělává tzv. enterohepatální oběh. Působením střevních bakterií může u části primárních žlučových kyselin dojít k dekonjugaci a k odstranění hydroxylové skupiny v poloze 7 za vzniku sekundárních žlučových kyselin (kyselina deoxycholová a lithocholová).

Pankreatická lipasa

Hlavním enzymem zodpovědným za hydrolyzu triacylglycerolů je pankreatická lipasa, část lipidů obsahujících mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem (do 12 atomů uhlíku, obsažené především v kravském mléku) je rozkládána působením lingvální a žaludeční lipasy. U novorozenců je sekrece pankreatické lipasy nedostatečná, na štěpení tuků se podílí lipasa přítomná v mateřském mléce, která je odolná k působení nízkého žaludečního

pH a vyžaduje nižší množství žlučových kyselin. Pankreatická lipasa je do duodena uvolňována společně s proteinovým kofaktorem (kolipázou), který tvoří s lipázou komplex a zvyšuje její aktivitu. Ke štěpení triacylglycerolů dochází na povrchu emulze tukových kapének o velikosti 200 – 500 nm. Vznikající monoacylglyceroly, diacylglyceroly a mastné kyseliny vytvářejí společně se žlučovými kyselinami, molekulami cholesterolu, kyselinou lysofosfatidovou a v tukách rozpustnými vitamíny směsné micely o velikosti 3 – 10 nm. Následně dochází pasivní difuzí či pomocí přenašečů ke vstřebání jednotlivých součástí směsných micel do enterocytů. V hladkém endoplazmatickém retikulu enterocytu dochází k reesterifikaci monoacylglycerolů a mastných kyselin s dlouhým řetězcem na triacylglyceroly, které jsou ve formě chylomiker uvolňovány do lymfatického oběhu. Mastné kyseliny s kratším řetězcem (do C10 event. C12) jsou transportovány cestou portálního oběhu bez reesterifikace.

Cílem praktika je demonstrovat emulgační schopnosti žlučových kyselin a jejich význam pro funkci pankreatické lipasy.

Klinické poznámky:

- * Při onemocněních pankreatu dochází ke zvýšení hladiny pankreatické lipasy v plazmě. Stanovení pankreatické lipasy společně s pankreatickým izoenzymem α -amylasy se využívá při diagnostice akutní pankreatitidy.
- * Orlistat (tetrahydrolipstatin) je irreverzibilní inhibitor žaludeční a pankreatické lipasy. Spolu s režimovými opatřeními může být použit k léčbě obezity. Snižuje absorpci přijatého tuku ve stravě až o 30 %, z mechanismu účinku vyplývá nežádoucí účinek, steatorhea.
- * Při závažných chronických onemocněních slinivky břišní (nejčastěji chronická pankreatitida, ale též cystická fibróza - mukoviscidóza) může dojít k projevům nedostatečné zevně sekreторické funkce pankreatu, na níž se největší měrou podílí nedostatek pankreatické lipasy. Dochází k poruše trávení a vstřebávání tuků a v tucích rozpustných vitamínů, onemocnění se projevuje váhovým úbytkem, průjmy a steatoreou. V diagnostice lze využít např. dechový test, kterým se stanoví schopnost organismu rozložit triacylglyceroly značené izotopem uhlíku ^{13}C . Nedostatek trávicích enzymů lze nahradit podáváním výtažku vepřového pankreatu ve formě enterosolventních tablet.
- * Abetalipoproteinemie (Bassen-Kornzweigův syndrom) je vzácné vrozené onemocnění způsobené poruchou funkce proteinu přenášejícího triacylglyceroly do lumen endoplazmatického retikula v enterocytech a hepatocytech (microsomal triglyceride transfer protein, MTP). Je porušena tvorba chylomikrů a VLDL, onemocnění se projevuje malabsorpcí lipidů a steatorheou, komplikací je postižení nervového systému.

Vliv solí žlučových kyselin na štěpení tuků katalyzované pankreatickou lipasou

Pankreatická lipasa katalyzuje štěpení esterové vazby triacylglycerolů především v poloze 1 a 3. Produktem tohoto štěpení jsou 2-monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny. Soli žlučových kyselin, působící jako anionaktivní tenzidy emulgují v tenkém střevě tuky a tím usnadňují interakci mezi tuky a pankreatickou lipasou. Enzym je v tucích nerozpustný a proto může projevovat svoji katalytickou účinnost pouze na povrchu tukových kapének, jejichž celkový povrch se zvyšuje právě emulgací. Lipasa je tímto způsobem aktivována nepřímo.

Pracovní postup:

- Do tří zkumavek napipetujte po 1 ml extraktu lipasy.
- Obsah zkumavky 1 povařte 3 min ve vroucí vodní lázni. Ochlaďte pod tekoucí vodou (slepý vzorek).
- Pokračujte v přípravě inkubačních směsí podle tabulky 1. současně ve všech třech zkumavkách.

Tabulka 1.

zkumavka	1	2	3
extrakt lipasy (ml)	1	1	1
povařit 3 min ve vroucí vodní lázni	ano	–	–
destilovaná voda (ml)	0,5	0,5	–
roztok soli žlučových kyselin (ml)	–	–	0,5
olivový olej (ml)	0,25	0,25	0,25
spotřeba NaOH (ml)			
skutečná spotřeba NaOH (ml)	-		
volné mastné kyseliny (mmol)	-		

- Obsah zkumavek promíchejte a inkubujte 30 min při 37° C.
- Po skončení inkubace přelijte obsah zkumavek do titračních baněk, zkumavky vypláchněte 2 x 1 ml ethanolu a ethanol přilijte do odpovídajících baněk.
- Hydrolyzáty, obsahující volné mastné kyseliny, ke kterým přidáte několika kapek fenolftaleinu, titrujte roztokem hydroxidu sodného až do růžového zbarvení.
- Spotřeby hydroxidu sodného запиšte do tabulky 1.
- Spotřebu hydroxidu sodného v první bance (slepý pokus, odpovídá množství volných mastných kyselin přítomných v olivovém oleji před lipolýzou) odečtete od spotřeby v titračních bankách 2 a 3. Získané skutečné spotřeby запиšte do tabulky 1.
- Ze skutečné spotřeby vypočítejte množství volných mastných kyselin (mmol), vzniklých štěpením olivového oleje.
- Výsledky запиšte do tabulky 1.

Poznámky:

Emulgační schopnost žlučových kyselin

Štěpení tuků v tenkém střevě lipasou a vstřebávání monoacylglycerolů a mastných kyselin závisí na jejich rozptýlení ve vodní fázi. Tomu napomáhají soli žlučových kyselin, které jsou součástí žluče. Snižují povrchové napětí na rozhraní obou fází jako anionaktivní tenzidy.

Pracovní postup:

- Do zkumavek napipetujte reagentie dle tabulky:

zkumavka č.	1	2	3	4
pufr pH 7 (ml)	1,0	1,0	1,0	–
pufr pH 9 (ml)	–	–	–	1,0
destilovaná H ₂ O (ml)	0,5	–	–	0,5
roztok solí žluč. kyselin (ml)	–	0,5	–	–
ethanol (ml)	–	–	0,5	–
roztok kyseliny olejové (kapky)	2	2	2	2
Vyhodnocení				

- Zkumavky dobře protřepejte a inkubujte 10 min v termobloku při 37° C
- Porovnejte emulgační schopnost solí žlučových kyselin, ethanolu a vyššího pH podle projasnění obsahu zkumavek.
- K hodnocení výsledků použijte znamének +, –

STANOVENÍ LIPIDŮ V PERIFERNÍ KRVÍ

Klíčová slova: cholesterol, estery cholesterolu, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triacylglyceroly, lipoproteiny, cholesterolesterasa (CHES - EC 3.1.1.13), cholesteroxidasa CHOD - EC 1.1.3.6), lipoproteinová lipasa (LPL - EC 3.1.1.34), glycerolkinasa (GYK – EC 2.7.1.30), glycerolfosfát oxidasa (G30 - EC 1.1.99.5).

Reagencie:

1. vzorek séra
2. souprava Cholesterol (BioSystems):
 - a) pracovní roztok TC:
PIPES 35 mmol/l, pH 7,0
cholát sodný 0,5 mmol/l
fenol 28 mmol/l
4-aminoantipyrin 0,5 mmol/l
chlorid sodný 20,0 mmol/l
cholesterolesterasa > 0,2 U/l
cholesteroxidasa > 0,1 U/l
peroxidasa > 0,8 U/l
 - b) standard TC, koncentrace dle údaje výrobce
3. souprava HDL-Cholesterol, (Biosystems):
 - a) srážecí roztok HDLc:
fosfowolframan 0,4 mmol/l
chlorid hořečnatý 20,0 mmol/l
4. souprava Triglyceridy (Biosystems):
 - a) pracovní roztok TAG:
PIPES 45mmol/l, pH 7
chlorid hořečnatý 5 mmol/l
ATP 0,9mmol/l
4-aminoantipyrin 0,75 mmol/l
4-chlorfenol 6 mmol/l
L-glycerol-3-fosfát oxidasa > 4 U/l
glycerolkinasa > 1,5 U/l
peroxidasa > 0,8 U/l
lipasa > 100 U/l
 - b) standard TAG, koncentrace dle údaje výrobce

Lipidy stanovené v séru při rutinním vyšetření v laboratoři klinické biochemie zahrnují celkový cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDL_c) a triacylglyceroly (TAG).

Lipidy jako hydrofobní látky jsou v krevním řečišti transportovány ve formě hydrofilních lipoproteinových částic složených z apoproteinů, triacylglycerolů (TAG), cholesterolu, esterů cholesterolu a fosfolipidů. Volné mastné kyseliny jsou transportovány vázané na albumin. Podle fyzikálních vlastností a chemického složení jsou lipoproteinové částice děleny do 4 základních tříd (viz tabulka):

Tabulka 1. Základní rozdělení a charakteristika lipoproteinových částic

dělení dle hustoty (ultracentrifugace)	chylomikra	VLDL	LDL	HDL
elektroforetická pohyblivost	zůstanou na startu	pre-beta	beta	alfa
hustota (g/ml)	0,98	1,006	1,019 – 1,063	1,063 – 1,21
velikost	100 – 1 000 nm	30 – 70 nm	15 – 25 nm	7,5 – 10 nm
typický apoprotein	B-48	B-100	B-100	A-I
% zastoupení proteinu	1	10	20	50
% zastoupení cholesterolu	5,5	19	45	15
% zastoupení TAG	90	50	10	5
% zastoupení PL	3,5	20	25	30
základní funkce	transport TAG přijatých v potravě k periferním tkáním	transport TAG z jater k periferním tkáním	transport cholesterolu k periferním tkáním	reverzní transport cholesterolu z tkání do jater

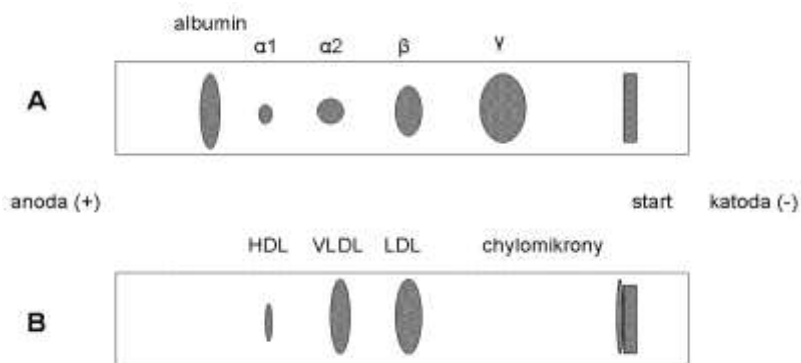
Lipoproteinové částice jsou produkovány v játrech (VLDL, HDL), v tenkém střevě (chylomikra, HDL), LDL a IDL vznikají katabolismem VLDL v krevním řečišti. Jednotlivé apoproteiny jsou důležitou strukturní součástí lipoproteinové částice zodpovědnou za její hydrofilitu (apoB-48, apoB-100, apoA), slouží jako vazebné molekuly pro buněčné receptory (apoB-100, apoE) a jako kofaktory enzymů (apoC-II, apoC-III, apoA-I).

Dalším lipoproteinem je lipoprotein (a) [Lp(a)]. Je to částice, která se skládá z molekuly LDL, jejíž apolipoprotein apo-B-100 se váže disulfidovou vazbou se specifickým glykoproteinem apo(a). Lp(a) může mít různé velikosti v závislosti na izoformách. Ukazuje se, že apolipoprotein (a) může vzhledem k strukturální podobnosti s plazminogenem inhibovat fibrinolýzu. Tento efekt není možno pozorovat u LDL bez apolipoproteinu (a). Gen kódující apo(a) se nachází na dlouhém raménku chromosomu 6 poblíž genu pro plazminogen. Lp(a) je považován za aterogenní rizikový faktor, který je nezávislý na dalších lipidových parametrech a na exogenních faktorech, jako je např. dieta. Jeho hladina je většinou geneticky determinována. Zvýšené hladiny Lp(a) mají vysokou prediktivní hodnotu pro koronární srdeční onemocnění, zejména v kombinaci se zvýšenými hladinami LDL cholesterolu. Zatímco stanovení celkového cholesterolu a triacylglycerolů se používá pro účely skrínungu, měření Lp(a) je, kromě LDL cholesterolu, HDL cholesterolu, apolipoproteinu A I a apolipoproteinu B, cenným nástrojem pro diferenciální diagnózu koronárních srdečních onemocnění. Normální hodnota koncentrace Lp(a) je <0,3 g/l.

V periferních tkáních jsou z částic bohatých na TAG (chylomikra, VLDL) působením lipoproteinové lipasy (LPL) uvolňovány volné mastné kyseliny, které jsou v buňkách využity jako zdroj energie nebo uloženy ve formě triacylglycerolů. HDL částice mají schopnost odebírat cholesterol z buněčných membrán a hrají klíčovou úlohu v reverzním transportu cholesterolu.

Biochemické vyšetření lipidového metabolismu obvykle zahrnuje stanovení hladiny TAG a celkového cholesterolu a ev. jeho HDL a LDL frakce. Spíše než přímým stanovením je LDL cholesterol dopočítán podle tzv. Friedewaldova vzorce ($\text{LDL-cholesterol} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL-cholesterol} - \text{TAG}/2,2$). Výpočet je založen na odhadu obsahu cholesterolu ve VLDL částicích na základě sérové koncentrace TAG, nelze ho však použít při hladině TAG vyšší než 4 - 4,5 mmol/l.

Alternativou stanovení cholesterolu v jednotlivých frakcích lipoproteinů je přímé stanovení jednotlivých apoproteinů reprezentujících aterogenní částice (apo B-100) a HDL (apo A-I) částice. Poměr apoB-100/apoA-I může v některých případech (diabetici, pacienti s metabolickým syndromem či s hypertriacylglycerolemií) přesněji přispívat k odhadu rizika kardiovaskulární příhody. Elektroforéza lipoproteinů (Obr. 1.) je v běžné lékařské praxi využívána jen málo, byla však základem pro dříve používanou klasifikaci hyperlipoproteinemií dle Fredricksona.



Obr. 1. Srovnání elektroforeogramu séra obarveného na proteiny (A) a lipidy (B)

Klinické poznámky:

- * Dyslipidemie (dyslipoproteinemie) jsou charakterizovány zvýšenou hladinou a/nebo nevhodným zastoupením jednotlivých lipoproteinových částic (nejčastěji snížením HDL). Hladina lipidů v krvi představuje jeden z významných rizikových faktorů aterosklerózy a jejích komplikací (ischemická choroba srdeční, cévní mozkové příhody, ischemická choroba dolních končetin). Kromě znalosti celkové hladiny cholesterolu v plazmě je však k odhadu kardiovaskulárního rizika důležitá též znalost zastoupení cholesterolu v jednotlivých typech lipoproteinových částic. Vysoká hladina HDL cholesterolu představuje protektivní faktor, zatímco LDL cholesterol a především malé denzní LDL částice jsou vysoce aterogenní.
- * Dyslipidemie dělíme na
 - 1) izolovanou hypercholesterolemii
 - 2) kombinovanou hyperlipidemii
 - 3) izolovanou hypertriacylglycerolemii

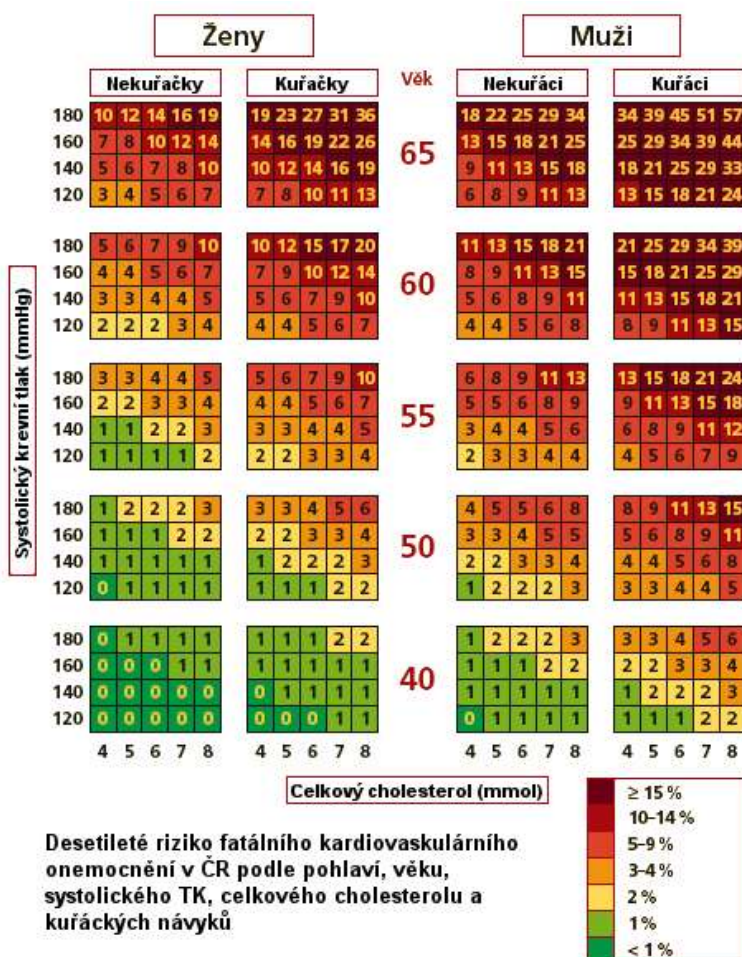
Toto dělení nahradilo vzhledem ke své praktičnosti dříve používanou klasifikaci dle Fredricksona. Hranice, pod kterou jsou koncentrace celkového, LDL cholesterolu a TAG považovány za normální, se neustále snižuje a závisí mj. na dalších rizikových faktorech kardiovaskulárních onemocnění. Doporučené hodnoty pro běžnou populaci v ČR uvádí tabulka 2.

Před rozhodnutím o zahájení léčby dyslipidemie mají být provedeny alespoň 2 odběry v rozmezí 1 – 8 týdnů ve stejné laboratoři (pacient má v té době dodržovat svůj obvyklý životní styl, způsob stravování a výrazněji neměnit svou tělesnou hmotnost). Při větším než 15 – 20% rozdílu výsledků obou vyšetření je vhodné třetí stanovení. 10leté riziko fatálního kardiovaskulárního onemocnění lze odhadnout na základě pohlaví, věku, systolického TK, celkového cholesterolu a kuřáckých návyků z tabulek SCORE. Za osoby s vysokým kardiovaskulárním rizikem považujeme všechny osoby s 10letým rizikem úmrtí na kardiovaskulární příhodu ve výši $\geq 5\%$.

Tabulka 2. Cílové hodnoty pro běžnou populaci ČR (Česká společnost pro aterosklerózu 2007)

celkový cholesterol	< 5 mmol/l
LDL cholesterol	< 3 mmol/l
HDL cholesterol	muži > 1,0 mmol/l , ženy > 1,2 mmol/l
TAG	< 1,7 mmol/l

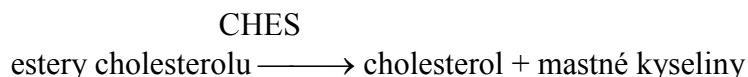
Obr. 2. Tabulky SCORE pro českou republiku



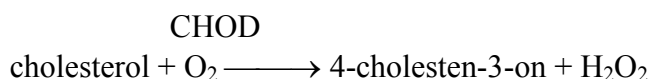
Stanovení celkového cholesterolu (TC)

Pro stanovení celkového cholesterolu se používá enzymová metoda, která zahrnuje tyto tři enzymové reakce:

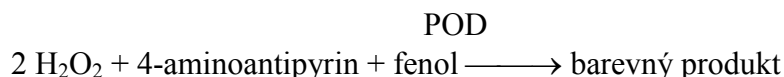
1. Hydrolýzu esterů cholesterolu cholesterolesterasou (CHES):



2. Oxidaci cholesterolu cholesteroloxidasou (CHOD) za současné tvorby peroxidu vodíku:



3. Oxidativní kopulaci 4-aminoantipyrinu s fenolem a peroxidem vodíku katalyzovanou peroxidasou (POD) za tvorby barevného produktu:



Pracovní postup:

- Vzorek séra i standard zpracujte v tripletu, slepý vzorek jednou.
- Do zkumavek napipetujte roztoky podle tabulky 3. Malé objemy pipetujte ke dnu zkumavek.

Tabulka 3.

reagencie (ml)	vzorek	standard	slepý vzorek
sérum	0,01	–	–
standard TC	–	0,01	–
destilovaná voda	–	–	0,01
pracovní roztok TC	1,0	1,0	1,0

- Reakční směs nechte inkubovat 10 min při pokojové teplotě.
- Do **10 min** po skončení inkubace změřte absorbanci vzorků séra (A_{vz}) i standardu (A_{st}) při 500 nm, výsledek запиšte do tabulky 4.
- Z průměru naměřených hodnot absorbance vzorku a standardu a z koncentrace standardního roztoku TC vypočítejte koncentraci celkového cholesterolu.
- Výsledky запиšte do tabulky 4.

Tabulka 4.

vzorek č.:	absorbance			průměr	c (mmol/l)
sérum					
standard					

Poznámky:

Stanovení HDL cholesterolu (HDL-C)

Lipoproteiny VLDL a LDL jsou selektivně vysráženy účinkem fosfowolframanu a hořečnatých iontů Mg^{2+} . Po odstranění sraženiny centrifugací je následně v supernatantu (obsahuje nevysrážené HDL částice) stanovena koncentrace cholesterolu podobně jako v případě stanovení celkového cholesterolu.

Pracovní postup:

- Do mikrozkušavky s připravenými 0,2 ml séra přidejte 0,5 ml srážecího roztoku a opatrně protřepejte převrácením zkušavky.
- Nechte stát 10 min při laboratorní teplotě a potom centrifugujte 10 min při 4000 ot./min.
- Supernatant opatrně odlijte do nové mikrozkušavky použijte k přípravě vzorku pro stanovení HDL_C.
- Vzorek séra (supernatant) a standard zpracujte v tripletu, slepý vzorek jednou.
- Do zkumavek napipetujte roztoky podle tabulky 5. Malé objemy pipetujte ke dnu zkumavek.

Tabulka 5.

reagencie (ml)	vzorek	standard	slepý vzorek
supernatant	0,05	–	–
standard TC	–	POZOR! 0,01	–
destilovaná voda	–	0,05	0,05
pracovní roztok TC	1,0	1,0	1,0

- Reakční směs nechte inkubovat 30 min při pokojové teplotě.
- Do 10 min po skončení inkubace změřte absorbanci vzorků séra (A_{vz}) i standardu (A_{st}) při 500 nm, výsledek запиšte do tabulky 6.
- Z průměru naměřených hodnot absorbance vzorku a standardu a z koncentrace standardního roztoku TC vypočítejte koncentraci HDL cholesterolu.
- Výsledky запиšte do tabulky 6.

Tabulka 6.

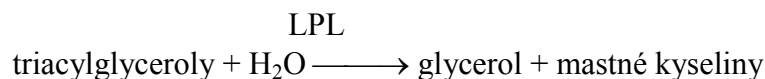
vzorek č.:	absorbance			průměr	c (mmol/l)
sérum					
standard					

Poznámky:

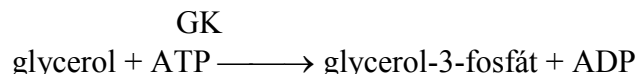
Stanovení triacylglycerolů (TAG)

Enzymové stanovení triacylglycerolů zahrnuje tyto reakce:

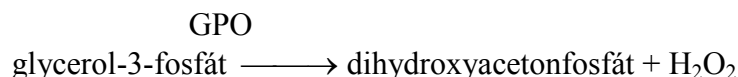
1. Hydrolýzu triacylglycerolů katalyzovanou lipoproteinovou lipasou (LPL):



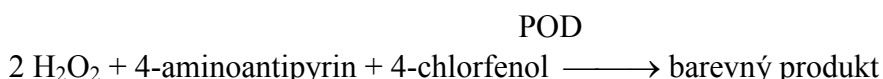
2. Fosforylaci uvolněného glycerolu katalyzovanou glycerolkinasou (GK):



3. Oxidaci glycerol-3-fosfátu na dihydroxyacetonfosfát katalyzovanou enzymem glycerolfosfátoxidase (GPO):



4. Vzniklý peroxid vodíku se využívá k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu s 4-chlorfenolem na barevný produkt. Reakce je katalyzovaná peroxidase (POD):



Pracovní postup:

- Vzorek séra (používaný v úloze 1.) i standard TAG zpracujte v tripletu, slepý vzorek jednou.
- Do zkumavek napipetujte roztoky podle tabulky 7. Malé objemy pipetujte ke dnu zkumavek.

Tabulka 7.

reagencie (ml)	vzorek	standard	slepý vzorek
sérum	0,01	–	–
standard TAG	–	0,01	–
destilovaná voda	–	–	0,01
inkubační směs TAG	1,0	1,0	1,0

- Reakční směs nechte inkubovat 15 min při pokojové teplotě.
- Do 60 min po skončení inkubace změřte absorbanci vzorků (A_{vz}) i standardu (A_{st}) při 500 nm, výsledek запиšte do tabulky 8.
- Z průměru naměřených hodnot absorbance vzorku a standardu a koncentrace standardního roztoku TAG vypočítejte koncentraci triacylglycerolů.
- Výsledky запиšte do tabulky 8.

Tabulka 8.

vzorek č.:	absorbance		průměr	c (mmol/l)
sérum				
standard				

Poznámky:

Výpočet LDL cholesterolu a HDL indexu podle Friedewalda

Distribuci cholesterolu v krevní plazmě lze vyjádřit vztahem:

$$\text{celkový cholesterol} = c_1 + c_2 + c_3$$

c_1 = HDL cholesterol

c_2 = LDL cholesterol

c_3 = VLDL cholesterol

Frakce VLDL obsahuje všechny typy triacylglycerolů, jejichž molární frakce je konstantní. Koncentraci VLDL cholesterolu je možno nahradit přibližně jednou polovinou koncentrace TAG ve vzorku séra (TAG/2,2). Pro výpočet distribuce cholesterolu mezi lipoproteiny stačí tedy stanovit celkový cholesterol, HDL cholesterol a triacylglyceroly ve vzorku séra.

$$\text{LDL}_c \text{ (mmol/l)} = \text{TC} - \text{HDL}_c - \text{VLDL} = \text{TC} - \text{HDL}_c - \text{TAG}/2,2$$

$$\text{HDL index} = \frac{\text{TC}}{\text{HDL}_c}$$

K výpočtu použijte naměřené hodnoty a výsledky zapište do tabulky 9.

VYHODNOCENÍ:

Tabulka 9.

	Naměřené hodnoty	Referenční rozmezí
TC (mmol/l)		<5
HDL _c (mmol/l)		Muži >1,0 Ženy > 1,2
LDL _c (mmol/l)		<3
TAG (mmol/l)		<1,7
HDL index		<4

Stanovení TC a TAG ve vlastní kapilární krvi pomocí přístroje REFLOTTRON®

Analyzátor Reflotron® Roche (obr. 3.) využívá ke stanovení analytů principu tzv. suché chemie. Vlastní měření je založeno na technice reflexní fotometrie, při níž se měří intenzita odraženého záření od homogenně zbarvené podložky.



Obr. 3. Reflotron® Plus (Roche). 1 – tiskárna, 2 – displej, 3 – indikační LED diody, 4 – podavač a komora pro měření reagenčního proužku, 5 – stojánek na reagenty

Reakce probíhají na pevném nosiči (reagenční zóna proužku), který obsahuje suchá činidla, aktivovatelná vodou obsaženou v naneseném vyšetřovaném vzorku. Reagencie potřebné pro reakci jsou nanesené až pod vrstvou skleněných vláken, na kterých se zachytí krvinky. Reflotron může analyzovat plnou krev, plazmu nebo sérum.

Připojený počítač umožňuje ze stanovených hodnot spočítat koncentraci LDL_C dle Friedewalda a vyhodnotit kardiální riziko pacientů.

Pracovní postup:

- Zapněte přístroj - na displeji se objeví datum a čas.
- Vyčkejte, až se zobrazí zpráva PŘIPRAVEN K MĚŘENÍ
- Vyjměte testovací proužek z tuby a ihned ji uzavřete. Neuzavření tuby má za následek znehodnocení hygroskopického činidla uloženého v zátce, a tím znehodnocení testovacích proužků.
- Promasírujte lehce špičku prstu, abyste zvýšili prokrvení a tak usnadnili odběr. Nezapomeňte na dezinfekci! Použijte zařízení pro vpich do prstu (lanceta a Autoclix). Optimální místo vpichu u dospělých je střed bříška prstu (ze strany).
- Kapilární krev nechte volně vzlínat (pouze vlivem kapilárních sil) po barevnou rysku do heparinizovaných kapilár. Přebytkovou krev otřete na vnějším povrchu kapiláry čtverečkem buničiny.

- Odtrhněte krycí folii z reagenčního proužku.
- Pomocí aplikátoru naneste 32 µl krve z kapiláry na příslušný reagenční proužek.
- Reagenční proužek umístěte vodorovně do podavače přístroje, na displeji se objeví zpráva **ZAVŘETE DVÍŘKA**.
- Po zavření dvířek probíhá čtení magnetického kódu a na displeji se objeví název zadaného analytu.
- Po ukončení měření přístroj zobrazí stanovenou koncentraci.
- Získané hodnoty запиšte do tabulky 10.
- Naměřené hodnoty TC a TAG použijte k výpočtu LDL_C (klávesa F3).
- Při výpočtech zadávejte příslušné parametry podle požadavků počítače, každou odpověď potvrďte klávesou ENTER.

Poznámka: Přístroj odhaduje kardiální riziko a výsledky zobrazí v následující formě:

výskyt – pravděpodobnost infarktu v průběhu 4 let v %

faktor – kolikrát je rizikový faktor pacienta vyšší ve srovnání s lidmi stejné věkové skupiny

Tabulka 10.

celkový cholesterol (mmol/l)	
HDL cholesterol (mmol/l) (nutno zadat, nestanovuje se)	
triacylglyceroly (mmol/l)	
LDL cholesterol (mmol/l)	
HDL index	

DUSÍKOVÁ BILANCE

Klíčová slova: močovina, kreatinin, kyselina močová, esenciální aminokyseliny, metabolismus bílkovin, katabolismus, anabolismus.

Reagencie:

1. vzorky séra S1 a S2
2. vzorek moče
3. standardní roztok močoviny, koncentrace dle údajů výrobce
4. souprava Močovina BUN-color (BioSystems):
 - a) pracovní roztok A:
 - salicylát sodný 62 mmol/l
 - nitroprusid sodný 3,4 mmol/l
 - fosfátový pufr 20 mmol/l, pH 6,9
 - ureasa 500 U/ml
 - b) pracovní roztok B:
 - chlornan sodný 7 mmol/l
 - hydroxid sodný 150 mmol/l

Dusíková bilance je rozdíl mezi množstvím dusíku do organismu přijatého a množstvím dusíku z organismu vyloučeného. Hlavní zdroj přísunu dusíku představuje dusík obsažený v aminokyselinách bílkovin. Rovná-li se množství dusíku do organismu dodaného množství dusíku z organismu vyloučeného, hovoříme o vyrovnané dusíkové bilanci. **Kladná dusíková bilance** nastává v případech, kdy je množství přijatého dusíku vyšší, než množství dusíku z organismu vyloučeného. Naopak, **záporná dusíková bilance** nastává v situacích, kdy je množství vylučovaného dusíku vyšší, než množství dusíku dodaného.

V klinické praxi se **dusíková bilance využívá pro monitorování nutričního stavu pacienta**, zejména tam, kde hrozí vznik stavu malnutrice. Malnutrici z klinického hlediska dělíme na dva typy, a to na **prosté hladovění** a **stresové hladovění**. **Prosté hladovění** vzniká při omezení přísunu živin. Ke **stresovému hladovění** dochází při stresové reakci organismu, která spouští proteokatabolismus i v případech, kdy je vyvážený přísun živin zajištěn. Stavy stresového hladovění vznikají při těžkých úrazech, např. při rozsáhlých popáleninách. Výpočet dusíkové bilance je zde vhodnou metodou pro monitorování metabolismu bílkovin.

Pro stanovení dusíkové bilance je třeba připomenout, že vylučování dusíku se neděje pouze ve formě močoviny, ale určitý podíl je také vylučován v moči ve formě kreatininu, NH_4^+ , kyseliny močové, dále ve stolici a kůži.

Stanovení koncentrace močoviny

Močovina je konečný produkt detoxikace amoniaku, který je hlavním produktem metabolismu bílkovin. Dále vzniká jako produkt bakteriálního metabolismu ve střevě, kde dochází k jeho vstřebávání do portálního řečiště a zpracování na močovinu v játrech.

Protože koncentrace močoviny v krvi závisí na metabolickém obratu bílkovin, funkci jater, funkci ledvin, kterými je vylučována a hydrataci organismu, údaje o koncentraci močoviny v krvi představují cennou informaci pro klinické hodnocení řady parametrů. Pohybuje se v rozmezí 2,0 – 8,0 mmol/l.

Metabolismus bílkovin je úzce propojen s metabolismem sacharidů a mastných kyselin. Při určitém zjednodušení je možné konstatovat, že u zdravého dospělého jedince je při vyváženém a dostatečném přísunu energetických zdrojů v podobě sacharidů a mastných kyselin metabolismus bílkovin v rovnováze, intenzita proteokatabolických a proteoanabolických dějů je vyrovnaná. Za určitých situací, jako je růst dětského organismu, růst plodu v těhotenství nebo reparace poškozených tkání, dochází k převaze dějů proteoanabolických. Zvýšená syntéza bílkovin poskytuje stavební materiál potřebný pro růst a reparaci tkání. Naproti tomu v situacích, kdy je přísun energetických zdrojů a bílkovin omezen nebo dochází k intenzivním stresovým reakcím v důsledku závažného poškození organismu, proteokatabolické děje převáží. V případě proteokatabolismu jsou strukturální bílkoviny organismu degradovány a jejich štěpné produkty aminokyseliny jsou spotřebovávány za účelem syntézy glukosy v reakcích glukoneogeneze.

Jelikož jsou při syntéze glukosy využívány pouze uhlíkové skelety aminokyselin, jejich aminoskupiny musí být odštěpeny. To se děje prostřednictvím transaminačních procesů nebo za vzniku amoniaku. Aby mohly být aminoskupiny a toxický amoniak vyloučeny z organismu, jsou v ornitinovém cyklu zpracovány tak, že vzniká netoxická močovina, která je následně v moči vyloučena z organismu. Z popsaného principu vyplývá, že v situacích, kdy dochází k posunu metabolismu bílkovin ve smyslu jejich degradace, dochází zároveň i ke zvýšené produkci močoviny. Stanovení močoviny v moči společně s dalšími údaji poskytuje cenné informace pro posuzování metabolického stavu organismu. Močoviny se denně močí vyloučí 167 – 583 mmol/24 hod, tj. 10,03 – 35,015 g/24 hod.

Pro stanovení dusíkaté bilance obdržíte tři vzorky od jednoho pacienta:

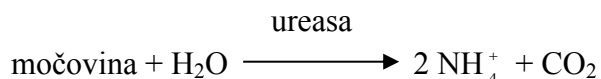
S1 = první odběr séra

S2 = sérum odebrané po 24 hod

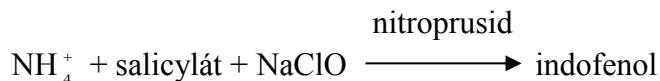
U = vzorek moče z 24 hod sběru

POZOR! MOČ JE ZŘEDĚNA 50x, VÝSLEDEK VYNÁSOBTE ŘEDĚNÍM.

Stanovení je založeno na hydrolytickém štěpení močoviny, katalyzovaném ureasou, na amoniak a oxid uhličitý:



Vzniklý amoniak se stanovuje barevnou reakcí se salicylátem sodným a alkalickým roztokem chlornanu sodného:



Pracovní postup:

- Vzorky séra, moče a standard zpracujte v dubletu, slepý vzorek pouze jednou.
- Napipetujte reagentie do zkumavek podle tabulky 1.

Tabulka 1

reagentie (ml)	sérum (S)	moč (U)	standard	blank
sérum	0.01	–	–	–
moč (zředěná 50x)	–	0.01	–	–
standard	–	–	0.01	–
destil.voda	–	–	–	0.01
pracovní roztok A	1	1	1	1
promíchat a inkubovat 10 min při pokojové teplotě				
pracovní roztok B	1	1	1	1

- Promíchejte a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě.
- Změřte absorbanci standardu a vzorku proti slepému vzorku při 600 nm. Zbarvení je stabilní nejméně 2 hodiny.
- Vypočítanou koncentraci moči vynásobte ředěním (50x), výsledky napište do tabulky 2.

Tabulka 2

vzorek	absorbance		průměrná hodnota	c (mmol/l)
standard				
S1				
S2				
U				

Výpočet dusíkové bilance

Dusíková bilance je určována metabolismem proteinů. Za normálních okolností se organismus nachází v dusíkové rovnováze, tzn. přívod dusíku v potravě je stejný jako jeho ztráty v exkretech. Minimální příjem bílkovin pro udržení vyvážené dusíkové bilance je 30 g/24 hod. Když příjem dusíku převyšuje jeho výdej, jde o pozitivní dusíkovou bilanci. Negativní dusíková bilance je charakterizována převahou ztrát.

Má-li být dusíková bilance vyvážená, musí bílkoviny v potravě obsahovat aminokyseliny postradatelné i nepostradatelné v průměrném množství a poměru. Nedostatek jediné esenciální aminokyseliny změni dusíkovou bilanci na negativní a ani velký přebytek postradatelných aminokyselin tento stav nezlepší.

Pro výpočet dusíkové bilance uvedených pacientů použijte hodnoty získané v úloze 1.

pacient	A muž	B žena	C muž	D žena
hmotnost (kg)	70	60	60	70
příjem bílkovin (g)	150	150	150	150
diuréza (1/24 hod)*				
teplota (°C)	38,2	36,4	37,1	36,7

* bude zadána

Příjem (g N/24 hod):

definovaná výživa:

- příjem dusíku vypočítejte z uvedeného příjmu bílkovin, výsledek запиšte do tabulky 4.

Výdej (g N/24 hod):

ztráty N močí:

- 80 % se vylučuje formou močoviny (vypočítejte z hodnot získaných v úloze 1.)
- 20 % se vylučuje formou kreatininu, NH_4^+ a kyseliny močové (vypočítejte z hodnoty N vyloučeného močovinou)
- vypočítejte celkový dusík vyloučený močí – výsledky запиšte do tabulky 3.

ztráty N kůží a stolicí:

- jsou přibližně stabilní, mění se podle tělesné teploty:
- do 37° C 1,0 g
- 37 – 38° C 1,3 g
- 38 – 39° C 1,5 g
- 39 – 40° C 1,8 g
- ztráty vypočítejte podle zadané teploty pacienta
- výsledek запиšte do tabulky 3.

zadržený N v tělesné vodě:

- stoupne-li během 24 hod koncentrace močoviny v séru, znamená to, že část vytvořené močoviny nebyla vyloučena. Vzhledem ke své dokonalé rozpustnosti je močovina distribuována v celkové tělesné vodě. Zvýšení koncentrace močoviny v séru o 1 mmol/l během 24 hod znamená u 100 kg muže zadržení 60 mmol urey (celková tělesná voda u muže = 0,6 tělesné hmotnosti, u ženy = 0,55 tělesné hmotnosti).
- zádrž vypočítejte z rozdílu koncentrací v séru (viz tabulka 2), výsledek запиšte do tabulky 3.

Tabulka 3.

N vyloučený močovinou/24h (g)	celkový N vyloučený močí (g)	ztráty N kůží a stolicí (g)	N zadržený v tělesné vodě (g)

celkový N vyloučený močí (g/24 hod) = c_u (mmol/24 hod) · 0,028 · 1,25 · diuréza

celkový N zadržený v tělesné vodě = $(c_{S2} - c_{S1}) \cdot 0,028 \cdot t.hm. \cdot \text{faktor } t.hm.$

přepočet mmol močoviny na g N = 0,028

výpočet ztráty celkového N močí = 1,25

VYHODNOCENÍ:

Příjem větší než výdej: anabolismus, efektivní zpracovávání bílkovin potravy (růst, hojení ran).

Výdej větší než příjem: katabolismus, nedostatečná výživa, odbourávání bílkovin těla.

Tabulka 4.

vzorek č.	příjem N (g)	výdej N (g)	N balance

TETRAPYRROLY

Klíčová slova: komplexní sloučeniny, pyrrol, porfyriny, hem, myoglobin, hemoglobin, hemoproteiny, metaloproteiny, prosthetická skupina, bilirubin, konjugovaný bilirubin, glukuronosid.

Reagencie:

1. nesrážlivá krev
2. krev nasycená oxidem uhelnatým
3. Ajatin
4. vzorek nesrážlivé krve pro stanovení hemoglobinu
5. Drabkinovo činidlo (roztok 50 mg kyanidu draselného a 200 mg ferrikyanidu draselného v 1 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného 140 mg/l) **!JED!**
6. vzorek krevního séra pro stanovení bilirubinu
7. standard bilirubinu
8. činidlo diazo I (roztok kyseliny sulfanilové 5 g/l v kyselině chlorovodíkové 0,6 mol/l)
9. pracovní reagent (Dusitan sodný 11,6 mmol/l. 1 ml + AT)

Vlastnosti hemoglobinu

Mezi tetrapyrroly, tj. sloučeniny obsahující ve své struktuře čtyři pyrrolová jádra spojená methylenovými nebo methinovými můstky, náleží hem – prostetická skupina hemoglobinu a dalších hemoproteinů (myoglobin, některé oxidoreduktasy).

Pyrrolová jádra spojená methylenovými můstky se nazývají **porfyrinogeny**, kdežto pyrroly spojené methinovými můstky jsou **porfyriny** k nimž náleží **hem**.

Hlavní funkcí hemoglobinu je transport O_2 a CO_2 , mezi plícemi a tkáněmi. Podílí se rovněž na udržování acidobazické rovnováhy vnitřního prostředí (transport H^+ a CO_2).

Oxid uhelnatý se váže na hem asi 230 – 270krát pevněji než O_2 a tak blokuje transport kyslíku. Kromě toho je hem schopen přenášet CN^- a SH^- k cytochromům dýchacího řetězce, kde v důsledku pevné vazby na Fe^{3+} cytochromoxidasy blokují přenos elektronů na O^{2-} .

Při první pomoci u intoxikací kyanidy musí být terapie nasazena během několika minut: čicháním amylnitritu se hemoglobin oxiduje na methemoglobin, který pevně naváže CN^- za vzniku kyanomethemoglobinu. Dále se podá i.v. roztok Na_2SO_3 , kterým se působením enzymu kyanidsulfurtransferasy neboli rhodanasy převedou volné CN^- na netoxický thiokyanát (SCN^-) a ten se snadno vyloučí močí. Takto se zabrání vazbě CN^- na hemové proteiny včetně cytochromu P_{450} . Místo amylnitritu lze v první fázi podat i.v. kobalamin (vitamin B_{12}) který rovněž vyváže volné CN^- za vzniku kyanokobalaminu.

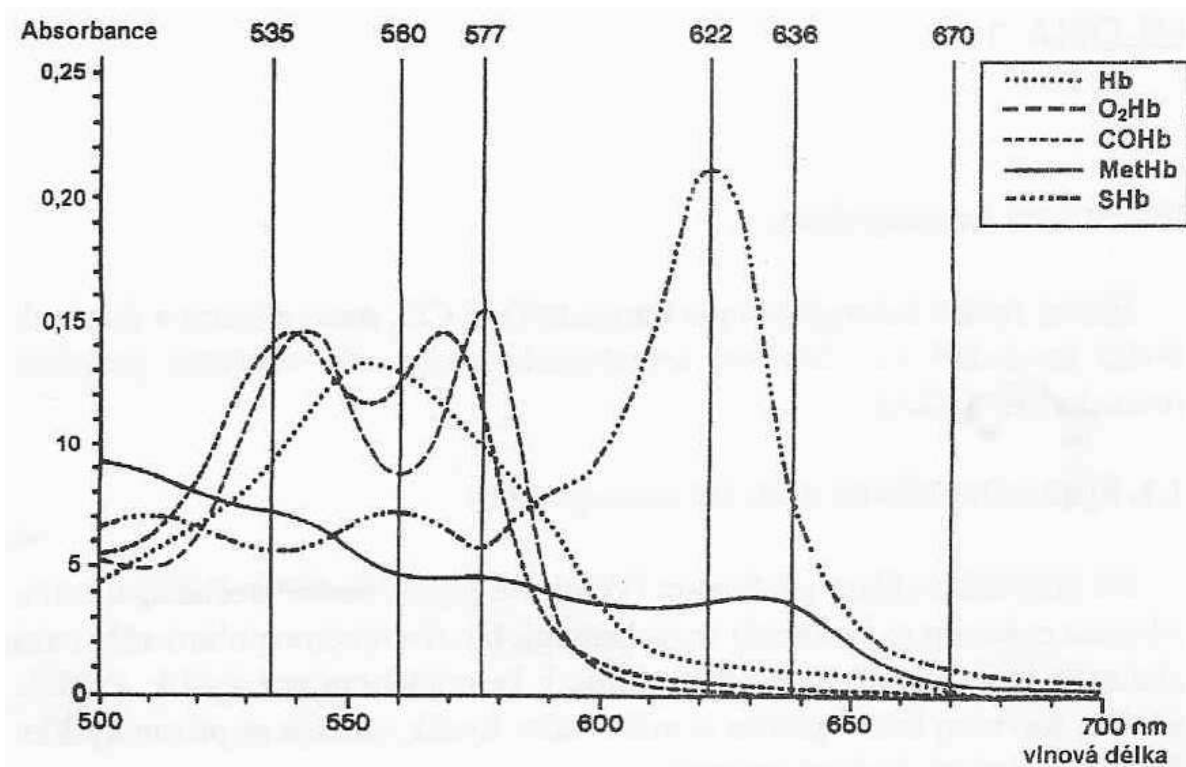
Produktem katabolismu hemu je bilirubin a tzv. žlučová barviva.

1.1. Spektrální křivky derivátů hemoglobinu

Při otravách oxidem uhelnatým (výfukové plyny, nedostatečné spalování, zdrojem expozice je i kouření) se na hemoglobin (ferrohemoglobin) váže oxid uhelnatý. Vzniklý **karbonylhemoglobin** nemůže vázat kyslík, tím se snižuje přísun kyslíku do tkání a vzniká tkáňová hypoxie.

Účinkem oxidačních činidel dochází k oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} , vzniká **hemin** (methemoglobin, ferrihemoglobin) a je inhibován přenos kyslíku. K methemoglobinemii dochází například při otravách dusitany, chlorečnany, anilinem a anilinovými barvivy, nitrobenzenem i některými léky jako je např. fenacetin, antipyrin.

Pro rychlou identifikaci hemoglobinových derivátů lze využít jejich absorpční spektra. Absorpční spektrum **oxygenovaného hemoglobinu** (oxyhemoglobin, HbO_2) má dvě charakteristická maxima při 576 a 541 nm. Spektrum **deoxygenovaného hemoglobinu** (Hb) vykazuje pouze jedno absorpční maximum při 555 nm. Spektrum **karbonylhemoglobinu** (HbCO) má dva vrcholy při 572 a 539 nm, hlavní maximum **heminu** (MetHb) leží při 633 nm. **Sulfhemoglobin** (SHb), který vzniká při intoxikaci sulfanem (sirovodíkem), má výrazné absorpční maximum při 622 nm. Spektrální křivky HbO_2 a HbCO lze dále rozlišit redukcí (např. pomocí S^{2-}) HbO na Hb. Tato změna se odrazí ve změně příslušné spektrální křivky, v případě HbCO se poloha maxim ve spektru nezmění.



Obr. 1. Spektrální křivky

Pracovní postup:

- Porovnejte spektrální křivky deoxygenovaného hemoglobinu, oxyhemoglobinu, methemoglobinu a karbonylhemoglobinu.

1.2. Důkaz karbonylhemoglobinu zkouškou s Ajatinem

Pracovní postup:

- Nesrážlivou krev před použitím promíchejte.
- Do jedné malé zkumavky napipetujte 0,05 ml nesrážlivé krve, do druhé 0,05 ml krve obsahující karbonylhemoglobin (porovnejte zbarvení).
- Do obou zkumavek přidejte 0,25 ml Ajatinu a zkumavky lehce protřepejte (roztok nesmí příliš pěnit).
- Do každé zkumavky přidejte 5 ml destilované vody a promíchejte.

- Po 5 min porovnejte zbarvení v obou zkumavkách. Normální krev poskytuje hnědé zbarvení, které stáním přechází do zelena, v přítomnosti karbonylhemoglobinu je zbarvení jasně červené a stálé.

1.3. Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi

Tato metoda využívá měření absorbance stabilního kyanohemoglobinu. Jehož jediný absorpční pás při 540 nm má molární absorpční koeficient 44 000. Drapkinovo (kyanidové) činidlo, používané v tomto stanovení, obsahuje hexakynoželezitan draselný a kyanid draselný. Hexakynoželezitan draselný oxiduje hemoglobin v nesrážlivé krvi na hemoglobin, na jehož Fe^{3+} se následně váží kyanidové anionty.

Kyanidové anionty mají výrazně vyšší afinitu k železitému iontu než k železnatému; v organismu blokují ionty CN^- buněčné dýchání, protože vazbou na Fe^{3+} cytochromoxidasy dýchacího řetězce v mitochondriích je zablokován přenos elektronů na kyslík.

Pracovní postup:

- Vzorek krve zpracujte v tripлетu.
- Do každé zkumavky odměřte z dávkovače 2.5 ml Drapkinova činidla a automatickou pipetou přidejte 10 μl krve (krev **před pipetováním dobře promíchejte krouživým pohybem, pipetujte ode dna nádoby**).
- Špičku pipety vždy ještě 3x vypláchněte obsahem zkumavky (špičku pipety nevyndávejte z kapaliny).
- Připravené vzorky **dobře promíchejte** a nechte stát 10 min při laboratorní teplotě.
- Změřte absorbanci vzorků proti kyanidovému činidlu při 540 nm. Výsledky запиšte do tabulky 1.
- Z naměřených hodnot spočítejte průměrnou hodnotu absorbance, kterou použijete k výpočtu.
- Látkovou koncentraci hemoglobinu vypočítejte pomocí molárního absorpčního koeficientu (= 44 000) podle vztahu (viz Práce s automatickými pipetami a spektrofotometrem):

$$c_{\text{Hb}} (\text{mmol/l}) = \frac{A_{\text{vz}} \cdot 251}{44 \cdot 1} = A_{\text{vz}} \cdot 5,7$$

- Výsledek запиšte do tabulky 1.
- Hmotnostní koncentraci hemoglobinu ($M_r = 64\,458$) vypočítejte ze vztahu:

$$c_{\text{Hb}} (\text{g/l}) = A_{\text{vz}} \cdot 368$$

Tabulka 1.

vzorek :	absorbance			průměr	c (mmol/l)
krev					

VYHODNOCENÍ:

Zvýšené hodnoty koncentrace hemoglobinu se vyskytují u onemocnění s abnormální proliferací erythrocytů, při dehydrataci organismu, delším pobytu ve vyšších nadmořských výškách. Snížené hodnoty jsou běžné u anemií nebo po ztrátách krve.

Tabulka 2.

vzorek krve č.:

	REFERENČNÍ HODNOTY	NAMĚŘENÉ HODNOTY
koncentrace Hb (mmol/l)	muži 2,15 – 2,65 ženy 1,85 – 2,35	
koncentrace Hb (g/l)	muži 140 – 170 ženy 120 – 150	

Poznámky:

Vlastnosti tetrapyrrolů

2.1. Vlastnosti porfyrinů

Poruchy biosyntézy hemu jsou provázeny ukládáním hemových prekurzorů - porfyrinů v tkáních a jejich vylučováním do moči. Příčinou mohou být dědičné nebo získané defekty některých enzymů - porfyrie. Z nejčastějších příčin je to zejména toxické působení polyhalogenovaných uhlovodíků, olova, chronická infekce virem hepatitidy C (HCV) v kombinaci s abusem alkoholu u získané porphyria cutanea tarda..

K průkazu porfyrinů v moči i v krvi se využívá fluorescence hematoporfyrinu v UV světle. Hematoporfyrin vzniká reakcí krve s koncentrovanou kyselinou sírovou, při které se z hemoglobinu odštěpí globin i železnatý ion a hydratují se vinylové skupiny hemu. Tento test lze použít i při důkazu krevních skvrn.

Pracovní postup:

- Pozorujte červenou fluorescenci hematoporfyrinu v UV světle proti srovnávacím vzorkům kyseliny sírové bez krve a krve bez kyseliny sírové.

2.2. Stanovení celkového bilirubinu v séru

Hemoglobin je účinkem hemoxygenasy a biliverdinreduktasy degradován v buňkách retikuloendoteliálního systému na bilirubin. Další přeměna bilirubinu probíhá v játrech.

Protože je bilirubin v plazmě téměř nerozpustný, je při transportu do jater vázán na albumin. V hepatocytech se jeho rozpustnost zvyšuje konjugací s kyselinou glukuronovou. Vzniklý bilirubindiglukuronát je vyloučen žlučí do střeva.

Plazmatická koncentrace bilirubinu je výsledkem rovnováhy mezi produkcí bilirubinu z degradovaného hemoglobinu a schopností jater odstraňovat bilirubin z plazmy. Při hyperbilirubinémii přestupuje bilirubin z plazmy do periferních tkání a dodává jim charakteristické nažloutlé zbarvení. Vznik žloutenky (ikteru) může být podmíněn zvýšenou tvorbou bilirubinu způsobenou nadměrným rozpadem erythrocytů – **hemolytický ikterus**. Snížení exkrece bilirubinu v důsledku vrozených nebo získaných poruch jaterní funkce vede k **hepatocelulárnímu ikteru**. Blokáda jeho transportu žlučí do střeva způsobuje **obstrukční ikterus**. **Pouze konjugovaný bilirubin může být vylučován močí.**

Pro fotometrické stanovení bilirubinu se využívá jeho kopulace s diazotovanou kyselinou sulfanilovou na azobarvivo. Reakce nastupuje rychle u konjugovaného bilirubinu (tzv. přímá van der Berghova reakce – **přímý bilirubin**) a pomalu u nekonjugovaného bilirubinu. V tomto případě může být reakce urychlena alkoholem nebo purinovým derivátem, např. kofeinem (nepřímá van der Berghova reakce – **nepřímý bilirubin**).

Pracovní postup:

- **Každá skupina zpracuje celkem 1 vzorek séra.**
- **Ve skupině si připravte 7 zkumavek s reagensy podle tabulky 3.**
- **Zkumavky 1 a 3 (voda a blank reagensie) připravte pouze jednou**
- **Zkumavky 2, 4 a 5 připravte v doubletu**

Tabulka 3

	Destilovaná voda (1)	Blank vzorku doublet (2)	Blank reagencie (3)	Vzorek doublet (4)	Standard doublet (5)
Destilovaná voda	1,1 ml	-	100 µl	-	-
Vzorek	-	100 µl	-	100 µl	-
Standard (S)	-	-	-	-	100 µl
Diazo I (AT)	-	1,0 ml	-	-	-
Pracovní Reagent	-	-	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

- Promíchejte a nechejte stát **PŘESNĚ** 2 minuty při pokojové teplotě.
- Ihned změřte absorbanci blanku vzorku (2) při 540 nm proti destilované vodě (1).
- Ihned změřte absorbanci vzorků (4) a standardu (5) při 540 nm proti blanku reag. (3)
- Absorbance запиšte do tabulky 4.

Tabulka 4.

vzorek	absorbance (A)	průměr	koncentrace
blank vzorku			-
blank vzorku			-
standard			10 µmol/l
standard			10 µmol/l
vzorek			
vzorek			

- Doplňte do tabulky 4 koncentraci celkového bilirubinu ve vzorku, kterou vypočtete pomocí vzorce:

$$\frac{A \text{ vzorku } x - A \text{ blanku vzorku } x}{A \text{ standardu}} \times C \text{ standardu} = C \text{ vzorku } x$$

Vyhodnoťte výsledek proti referenčním hodnotám celkového bilirubinu v krvi (2 – 17 µmol/l). Zvýšené hodnoty nacházíme u ikterů, nádorů jater a žlučových cest.

Tabulka 5.

vzorek séra č.:

	REFERENČNÍ HODNOTY	NAMĚŘENÉ HODNOTY
koncentrace celkového bilirubinu (µmol/l)	2,0 – 17,0	

Fyziologické referenční rozmezí koncentrace konjugovaného bilirubinu je 0,0 – 5,1 $\mu\text{mol/l}$

Poznámky: