

Praktikum z patologické fyziologie

**kolektiv pracovníků Ústavu patologické
fyziologie LF MU**

odpovědná redaktorka:

MUDr. Julie Bienertová Vašků

Obsah

Úvod do metodologie experimentů na zvířatech

1. Etické zásady provádění experimentů na zvířatech. <i>Dana Bučková</i>	4
2. Bezpečnost práce v praktických cvičeních ústavu patologické fyziologie. <i>Šárka Kuchtičková</i>	7
3. Laboratorní zvířata používaná v experimentu. <i>Šárka Kuchtičková</i>	11
4. Práce s laboratorními zvířaty. Příprava zvířete k pokusu. <i>Dana Bučková</i>	13
5. Anestézie laboratorních zvířat. <i>Šárka Kuchtičková</i>	15
6. Průměrné hodnoty nejčastěji sledovaných parametrů u dospělých laboratorních zvířat. <i>Šárka Kuchtičková</i>	22
7. Pomůcky. <i>Šárka Kuchtičková</i>	24

Experimenty na zvířatech

8. Model peptické ulcerace žaludku na zvířeti. <i>Michal Jurajda</i>	29
9. Radiační poškození krevních buněk I. a II. <i>Lydie Izakovičová Hollá</i>	31
10. Ikterus u laboratorního potkana. <i>Lukáš Pácal</i>	37
11. Model venózní trombózy u laboratorního potkana. <i>Dana Bučková</i>	39
12. Experimentálně navozený diabetes mellitus u pokusného zvířete - diagnostický průkaz glukózovým tolerančním testem. <i>Kateřina Kaňková</i>	42
13. Experimentálně navozená ateroskleróza u pokusného zvířete. <i>Kateřina Kaňková</i> ...	45
14. EKG a arytmie na zvířecím modelu - změny EKG při adrenergní stimulaci, hypokalcemii a hyperkalemii. <i>Kateřina Kaňková</i>	51
15. Model peritoneální dialýzy na laboratorním potkanovi. <i>Julie Bienertová Vašků</i>	54
16. Stanovení kinetiky vylučování inulinu ledvinami. <i>Michal Jurajda</i>	56
17. Renální ischemie, vznik reninu v ledvině. <i>Julie Bienertová Vašků</i>	58

Měření u člověka

18. Spirometrické vyšetření. <i>Dana Bučková</i>	60
19. Hyperoxický test. Vyšetření transkutánním oxymetrem. <i>Michal Jurajda</i>	62
20. Vyšetření bariérové funkce kůže. Vyšetření kožní vodivosti. <i>Michal Jurajda</i>	64
21. Vyšetření periferních cév pomocí ultrazvuku. <i>Michal Jurajda</i>	66
22. Vyšetření krevního tlaku (TK). Ambulantní monitorování TK a tepové frekvence (SF). Změny TK a SF v důsledku změn polohy těla, izometrické zátěže a lehké fyzické	

zátěže. <i>Anna Vašků</i>	68
---------------------------------	----

Úvod do statistického zpracování dat

23. Statistika I. <i>Vladimír Znojil</i>	73
24. Statistika II. <i>Vladimír Znojil</i>	79

Laboratorní metody

25. Enzymové a jiné markery využívané v diagnostice vybraných patologických stavů. <i>Lukáš Pácal</i>	85
26. Hyperlipoproteinemie. <i>Julie Bienertová Vašků</i>	88

1. Etické zásady provádění experimentů na zvířatech

Dana Bučková

Užití zvířat v experimentu je úzce svázáno a rozvojem lékařské vědy. Již ve starověkém Řecku byly prováděny pokusy na zvířatech k objasnění některých fyziologických otázek (Corpus Hippocraticum, 400 let př.n.l). Výrazný rozvoj vědy přineslo ovšem až období renesance. Právě z této doby se zachovalo mnoho údajů o experimentální práci na zvířatech (Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus, Exercitatio, 1628).

V 18. století pak vzniká první hnutí proti pokusům na zvířatech (Introduction to the Principles of Moral and Legislation, 1789), které nabývá výrazných rozměrů ve Viktoriánské Anglii v 19. století a vede k založení první anti-vivisekcionistické organizace „The Victoria Street Society“. V roce 1876 je také v Anglii přijat první zákon na ochranu pokusných zvířat pod názvem „Cruelty to Animals Act“.

Objevení anestetik v první polovině 19. století přineslo velký pokrok v oblasti experimentů, neboť umožnilo provádět bolestivé zákroky na zvířatech až po znecitlivění. Význam pokusů na zvířatech zdůraznil v roce 1865 ve své knize „Úvod do studia experimentální medicíny“ Claude Bernard (1813-1878), profesor všeobecné experimentální fyziologie v College de France. V jeho knize je již popsán experiment v pravém slova smyslu, jak jej známe dnes.

Jestliže se koncem 19. století začíná objevovat pokusné zvíře jako zvíře „sui generis“, ve 20. století jsou již zakládány chovy laboratorních zvířat, tzn. zvířat chovaných pouze pro laboratorní účely. V období mezi I. a II. světovou válkou jsou odchovány inbrední kmeny myší, potkanů a morčat, které znamenají velký přínos pro experimentální práci, která byla do té doby prováděna na geneticky nehomogenních a nespecifikovaných zvířatech. V této době je již běžně používán termín „laboratorní zvíře“. S rozvojem experimentů a chovů pro tyto účely souvisí potřeba omezit nebo odstranit nehumánní aspekty práce se zvířaty.

V roce 1959 byla definována biologi Williamem Russellem a Rexem Burchem, v knize „Principy humánních experimentálních technik“ (Principles of Humane Experimental Technique) tzv. koncepce tří „R“, která dnes patří mezi hlavní zásady odpovědného a rozumného užití zvířat v pokuse. Tři „R“ jsou navíc přijímány řadou ochranných organizací. Tato přesná a srozumitelná formulace zásad pro užití zvířat v experimentu byla velkým přínosem při formulaci legislativy v celé řadě zemí, zákon ČNR 246/92 Sb. (v úplném znění 167/93) nevyjímaje.

Tři „R“ jsou počáteční písmena anglických slov: Reduction, Refinement, Replacement:

1. Reduction – Snižování

Jakýkoli postup, který vede k dosažení stejného množství informací za použití nižšího počtu zvířat nebo k maximalizování získaných informací z jednoho zvířete.

2. Refinement – Zmírňování

Výraz "zmírňování" znamená upravení všech procedur, které zasahují do života laboratorního zvířete od jeho narození až po jeho smrt. Tím se minimalizuje bolest a utrpení, které zvíře prožívá, a pozvedá úroveň jeho života.

3. Replacement – Nahrazování

Náhrada zvířat v pokusech technikami „in vitro“, videozáznamem, filmy, matematickými modely atd. Zvířata mohou být nahrazována těmito alternativami, pokud je dosažený výsledek na stejné nebo vyšší kvalitativní úrovni ve srovnání s pokusem na zvířeti.

Tři „R“ k naplnění svého obsahu vyžadují značný obsah znalostí a praktických zkušeností získaných odpovídajícím vzděláním a praxí. Tím jsou splněny podmínky nejen pro odpovídající kvalitu prováděného výzkumu, ale i pro odpovědné užití laboratorních zvířat. Odpovídající vzdělání je vyžadováno i Radou Evropy v konvenci na ochranu obratlovců užívaných pro experimentální a vědecké účely z roku 1985. Je zde uvedeno, že osoby provádějící experimenty, nebo se jich účastníci, musí mít odpovídající vzdělání a výcvik. Ve stejném smyslu hovoří i US Animal Welfare Act z roku 1986. Také zákon ČNR 167/93 vymezuje v §17 nutnost odpovídajícího vzdělání pro pracovníky, kteří řídí a kontrolují experimenty.

Podmínky použití zvířat k pokusným účelům v ČR upravuje zákon č.246/1992 na ochranu zvířat proti týrání (ve znění zákona 162/1993 Sb., 167/1993 Sb., 77/2004 Sb.) a vyhláška ministerstva zemědělství č.311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat. Tyto zákony stanovují podmínky pro ochranu zvířat v hospodářských a zájmových chovech, volně žijících a pokusných zvířat. V části zákona pojednávající o podmínkách chovu a ochrany pokusných zvířat jsou zahrnuty níže uvedené body (zkrácené znění):

Účel zákona

Účelem zákona je chránit zvířata, jež jsou živými tvory schopnými pociťovat bolest a utrpení, před týráním, poškozováním jejich zdraví a jejich usmrcením bez důvodu, pokud byly způsobeny buď i z nedbalosti člověkem.

Ochrana pokusných zvířat

Za pokusy na zvířatech se považují:

- ověření vědecké domněnky a získání nových poznatků
- stanovení diagnózy
- vývoj a ověření biologického produktu včetně zjištění jeho účinku a získání výrobku tohoto charakteru
- testování

- použití zvířete v rámci pokusného zkoumání jeho reakcí
- výuky

Pokusy se smějí provádět jen na pracovištích, kterým bylo Ústřední komisí pro ochranu zvířat uděleno oprávnění (akreditace), mají potřebné odborně způsobilé pracovníky a zařízení vyhovující pro příslušný druh a množství pokusných zvířat (zvířetník). Pokusy mohou být povoleny pouze po ověření, že při současném stavu nelze zajistit poznatky nebo jejich využití jinými metodami a způsob provedení musí být eticky opodstatněn.

Opodstatněné důvody experimentu na zvířeti:

- poznání, prevence a léčba nemocí, studium fyziologických stavů a funkcí člověka nebo zvířete
- studium poškození zevního prostředí
- základní a vyhledávací výzkum
- ověřování nezávadnosti látek
- výroba sér, očkovacích látek, diagnostických souprav, jiných biologických materiálů a léků
- zachování a rozmnožování živého materiálu pro vědecké účely
- výuka na středních a vysokých školách, v postgraduálním studiu především v oblasti medicíny a přírodních věd, pokud nelze účelu dosáhnout jinak.

Pokusy se musí provádět na zvířatech k těmto účelům chovaným, odpovídajících kvalitou, definovaných a standardizovaných z hlediska genetického, zdravotního stavu a podmínek jejich životního prostředí. Toulavá a zaběhlá domácí zvířata nesmějí být k pokusům používána. Osoby provádějící pokusy na zvířatech jsou povinny zabezpečit, aby nebyla zvířeti působena bolest většího rozsahu než je nevyhnutelné vzhledem k účelu pokusu, provádět pokusy v místním nebo celkovém znecitlivění (ledaže by účel pokusu anestézii vylučoval), používat zvířata k pokusům pouze jedenkrát, pokud není opakování součástí pokusu, zajistit přiměřenou péči o zvířata, připravovat a plánovat pokusy předem, snažit se minimalizovat množství potřebných zvířat a provádět usmrcování zvířat bez utrpení a bolesti (důvodem k usmrcení zvířete je ukončení pokusu na pokusném zvířeti). Řídit a kontrolovat pokusy na zvířatech jsou oprávněni lékaři, veterináři a osoby s jiným vysokoškolským vzděláním biologického směru, pokud k tomu mají potřebné zkušenosti a osvědčení příslušným orgánem ochrany zvířat.

Orgány ochrany zvířat

- ministerstvo
- ústřední komise (jmenuje ministr zemědělství po dohodě s ministrem životního prostředí)
- orgány veterinární správy (městské, krajské)
- ústřední orgány státní správy a Akademie věd České republiky
- odborné komise jednotlivých pracovišť.

V dalších částech zákona jsou specifikovány podmínky pro chovná a uživatelská zařízení,

podmínky péče o zvířata, podmínky využití zvířat, evidence zvířat, složení a činnost odborných komisí, atd.

2. Bezpečnost práce v praktických cvičeních ústavu patologické fyziologie

Šárka Kuchtíčková

1. Laboratorní řád

a) Obecná pravidla

Posluchači jsou povinni chodit na cvičení včas, podle rozvrhu praktických cvičení.

Posluchač je povinen dbát pokynů vyučujícího k bezpečné práci v laboratoři.

Během pobytu v laboratoři musí mít posluchač pracovní plášť, popřípadě vhodnou pracovní obuv. Pokud to vyžaduje charakter práce i ochranné brýle, štít a rukavice.

K práci používá posluchač vyhrazený prostor a přidělené pracovní pomůcky, za něž osobně odpovídá.

Z osobních věcí si do laboratoře posluchač přináší pouze pracovní deník, psací potřeby a skripta.

Po ukončení práce posluchač uvede své pracoviště do původního stavu, umyje a odevzdá svěřené pomůcky.

V laboratoři smí posluchač vykonávat jen práce související s náplní cvičení pod dohledem asistentů.

V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.

Každé poranění nahlásí posluchač vyučujícímu.

Posluchač je povinen třídit odpad podle pokynů vyučujícího.

b) Práce v chemické laboratoři

Všechny manipulace s látkami dýmavými, dráždivými, těkavými, zdraví škodlivými je nutné provádět v digestoři.

Při práci s hořlavými kapalinami je nezbytné vypnout v okolí do bezpečné vzdálenosti všechny zdroje plamene.

Posluchačům je zakázáno odnášet cokoli z prostorů laboratoří.

Po ukončení pokusu je třeba zkontrolovat uzavření plynu, vody a vypnout všechny elektrické spotřebiče. Rovněž je třeba zkontrolovat, zda jsou uzavřeny nádoby s chemikáliemi, zvláště těmi,

se kterými se pracovalo.

c) Práce s biologickým materiálem a laboratorními zvířaty:

Všichni posluchači jsou povinni být očkováni proti tetanu a hepatitidě typu B.

Všechny práce spojené s prací s laboratorními zvířaty musí posluchač vykonávat po seznámení s pracovním protokolem a pod dohledem asistenta.

Při manipulaci s laboratorním zvířetem u tohoto nevyvolávat nešetným a agresivním zacházením stres.

Při práci s biologickým materiálem jsou posluchači povinni používat ochranné rukavice a další ochranné pomůcky dle instrukcí vyučujícího.

Tekutý odpad je shromažďován do určených nádob nebo výlivek. Pevný odpad je shromažďován ve speciálním kontejneru umístěném v laboratoři.

d) První pomoc při úrazech

Každé zranění, úraz i nevolnost je třeba ihned ohlásit vyučujícímu.

Poranění se evidují do deníku úrazů.

Zasažení kyselinami a hydroxidy

Postižené místo ihned opláchneme velkým množstvím tekoucí vody a u kyselin neutralizujeme 2% roztokem hydrogenuhličitanu sodného. K neutralizaci postiženého místa u hydroxidů použijeme 1% roztok kyseliny octové nebo 2% roztok kyseliny borité.

Poranění očí leptajícími látkami

Oči ihned důkladně opláchnout velkým množstvím vody. Neutralizaci u očí neprovádíme. Přiložíme sterilní krytí. Toto zranění si vyžaduje odborného lékaře.

Požítí kyselin

Co nejdříve postiženému podat neutralizační prostředek (suspenze oxidu hořečnatého v ledové vodě) a ihned vyvolat zvracení. Vyhledat lékařskou pomoc.

Požítí hydroxidů

Postiženému podáme co nejrychleji vypít větší množství 1% kyseliny octové, ledově ochlazené nebo větší množství citrónové šťávy. Pokusíme se rychle vyvolat zvracení. Vyhledáme odbornou pomoc.

Požítí jiných látek

Je nutné tyto látky co nejdříve dostat ze žaludku. Jako dávidlo může sloužit nasycený roztok kuchyňské soli. Je nutné vyhledat odbornou pomoc.

Řezné a bodné rány

Při tomto poranění necháme krev zprvu odtéci, tím se vyplaví nečistoty . Ránu ošetříme desinfekčním prostředkem, sterilně překryjeme. U ran většího rozsahu vyhledáme odbornou pomoc.

Poranění očí

Oko převážeme sterilním obvazem s měkkou podložkou, aby se zabránilo pohybu víčka a vyhledáme odbornou pomoc.

Otrava jedovatými látkami a plyny bezvědomím

Postiženého vyneseme na čerstvý vzduch a necháme ležet ve stabilizované poloze a vyčkáme příchodu lékaře. Je-li postižený v bezvědomí a nedýchá, zahájíme ihned umělé dýchání.

Mdloba

Postiženého uložíme v klidu, uvolníme těsný oděv. Je-li obličej rudý, podložíme hlavu mírně nahoru. Je-li bledý, uložíme hlavu mírně dolů a zvedneme nohy. Na čelo přikládáme studený obklad, zajistíme dostatečný přívod čerstvého vzduchu , kontrolujeme dech a srdeční činnost. Dle závažnosti voláme lékaře. V případě, že postižený nedýchá, zavádíme umělé dýchání.

Úrazy elektrickým proudem

Pokud se postižený stále dotýká elektrického vedení, je třeba nejdříve vypnout proud. V případě, že postižený nedýchá, zahájíme ihned umělé dýchání a neprodleně přivoláme lékařskou pomoc.

3. Laboratorní zvířata používaná v experimentu

Šárka Kuchtíčková

1. Typy kmenů

a) **Outbrední populace**

Každý jedinec takového souboru je geneticky jedinečný a tudíž odlišný od ostatních. Outbrední populace nejsou geneticky definované, i když mohou mít některé společné rysy (např. kmeny potkanů Wistar). Outbrední zvířata stejné kolonie mohou být geneticky rozdílná a naopak outbrední zvířata různých kolonií (tj. i různých jmen) mohou být geneticky podobná. Výhodou outbredních populací je vysoká produktivita, tedy i levnost a snadná dostupnost.

b) **Inbrední kmeny**

Inbrední kmen je produkci 20 a více páření bratr x sestra, kdy všichni jedinci jsou odvozeni od jediného páru. Generace F1, která vzniká křížením dvou inbredních kmenů, je také souborem geneticky totožných jedinců, kteří nejsou homozygotní, jsou heterozygotní ve všech lokusech, ve kterých se rodičovské kmeny liší.

c) **Kongenní a koisogenní kmeny**

Dva kmeny jsou koisogenní tehdy, jestliže se mezi sebou liší v jediném lokusu jako následek bodové mutace v diferencčním lokusu. Jejich výhodou je možnost exaktního studia biologických účinků tohoto lokusu.

Dva kmeny jsou kongenní tehdy, jestliže se liší v určitém lokusu a přilehlé malé části chromozomu. Kongenní kmeny jsou produktem opakovaných (obvykle nejméně 12) zpětných křížení.

d) **Rekombinantní inbrední kmeny**

Jsou odvozeny opakovaným sourozeneckým křížením od generace F2 dvou inbredních kmenů. Příslušníci rekombinantního kmene jsou pak opakováním jedné kombinace F2.

e) **Mutantní kmeny**

Tyto kmeny jsou nositelem definované mutace. Ta může být buď patologické povahy a takový kmen slouží jako biomodel nebo může jít o mutaci v rámci vnitrodruhového polymorfismu. Takový kmen pak slouží ke studiu charakteru a výzkumu polymorfismu ve sledovaném lokusu. V současné době lze získat kmeny s definovanou mutací v genomu - tzv. knock-out technologie.

f) **Transgenní kmeny**

Vznikají přenosem a integrací určitého sledovaného genu do genomu zygoty definovaného kmene. U vzniklých transgenních organismů je možno za definovaných podmínek studovat biologickou funkci přeneseného genu.

2. Rozdělení laboratorních zvířat z hlediska genetického

a) **Isogenní zvířata**, tj. geneticky identická (kmeny inbrední a odvozené a F1 hybridy, vzniklé křížením inbredních kmenů)

b) **Neisogenní zvířata**, tj. geneticky neidentická (outbrední kmeny a randombrední populace)

V první skupině se snažíme zajistit genetickou uniformitu zvířat, nejčastěji úzkou příbuzenskou plemenitbou (často za účelem fixace genu), v druhé skupině je cílem zachovat co největší genetickou heterogenitu vyloučením příbuzenské plemenitby.

3. Rozdělení laboratorních zvířat z hlediska mikrobiálního osídlení, resp. přítomnost či nepřítomnost patogenních zárodků.

Konvenční zvířata obvykle chovaná v „otevřených“ zvěřincových zařízeních bez bariéry s neznámým a obvykle nekontrolovaným mikrobiálním osídlením, nebo kontrolou zaměřenou pouze na přítomnost zárodků přenosných na člověka.

SPF zvířata (specified pathogen free) nebo také za bariérou chovaná zvířata, která byla v izolátoru úmyslně osídlena definovanou mikroflórou, umístěna za bariéru a jsou kontrolována na přítomnost náhodně získaných nežádoucích mikroorganismů.

SPF technologie má odrážet průběžnou mikrobiální kontrolu v chovné kolonii s následnou specifikací přítomných a nepřítomných zárodků. Tento systém má vyloučit přítomnost specifikovaných (potenciálních) patogenních mikroorganismů.

Gnotobiologická zvířata získaná hysterektomií a chovaná v izolátoru bezmikrobní technologií, prokazatelně prostá všech dalších forem života (germ free nebo axenická), nebo záměrně osídlena jedním, dvěma či více mikroorganismy (mono-, di-, polyxemická zvířata).

4. Práce s laboratorními zvířaty. Příprava zvířete k pokusu.

Dana Bučková

1. Cíl

Seznámit se s manipulací s laboratorním zvířetem, provést anestézii, laparotomii a naučit se základní chirurgické techniky - suturu, ligaturu a kanylaci. Seznámit se s topografií orgánů dutiny břišní u laboratorního potkana.

2. Materiál a metody

Skleněné akvárium s víkem pro inhalační narkózu, inhalační anestetikum, váhy, anestetická směs (20 dílů 1% Narkamonu a 1 díl 2% Rometar), operační stolek, operační kazeta obsahující injekční stříkačky a jehly, nůžky, pinzety, peán, oční rozvěrač, šicí materiál, jehelec, chirurgické jehly, gázu a tampony, jodová tinktura.

3. Postup

Zvíře uchopíme palcem a ukazovákem za ocas, vyzvedneme z klece hlavou dolů a rychle je umístíme do skleněného akvária.

a) Anestézie

Na papírovou vatu na dně akvária nalijeme cca 20ml inhalačního anestetika a uzavřeme akvárium víkem. Nejprve pozorujeme excitaci, pak zvíře pomalu usíná. Můžeme pozorovat dilataci zornic, nystagmus, nepravidelné dýchání. S prohlubující se narkózou mizí nejprve víčkový, později rohovkový reflex a zužují se zornice. Ve fázi chirurgické narkózy se zastavují pohyby hmatových chlupů na čenichu. V tomto stádiu je nutno vyjmout zvíře z akvária, aby nedošlo k dechové zástavě a smrti (varovnými příznaky je nepravidelné povrchní dýchání a dilatace zornic). Zvíře vyjmuté z akvária zvážíme a podle aktuální váhy zvířete vypočítáme dávku anestetika, která má být zvířeti podána.

0,5ml směsi Narkamon/Rometar na 100g váhy zvířete.

Vypočítanou dávku natáhneme do stříkačky, nasadíme jehlu a aplikujeme formou intraperitoneální injekce. Při aplikaci drží jeden student zvíře za kůži na hřbetě břichem nahoru a mírně natáhne druhou rukou dolní končetinu zvířete. Druhý student pak provede vpich skrze kůži a břišní stěnu mírně laterálně zhruba ve výši pupku. Po proniknutí do dutiny břišní se stříkačka sklopí a zavede ještě asi 1 – 2 cm do peritoneální dutiny a injikuje se celá dávka anestetika. Vyčkáme nástupu anestézie (cca 5 min) a poté zvíře fixujeme na operační stolek. V

případě potřeby můžeme v průběhu operačního výkonu prodlužovat narkózu přidáním 1/4 - 1/2 vypočtené dávky anestetika.

b) Provedení laparotomie

Při operačním zákroku se snažíme dodržet maximální čistotu. Zvíře fixujeme na operačním stolku v poloze na hřbetě. Nejprve připravíme operační pole - ostříháme srst v mediální části břicha od processus xiphoideus po symfýzu a desinfikujeme kůži jodovou tinkturou. Laparotomii provedeme ve dvou vrstvách. Operatér s asistentem nadzvednou pinzetami v mediální rovině v úrovni pupku příčně kožní řasu, kterou operatér nůžkami prostříhne a rozšíří operační řez kraniálně k processus xiphoideus a kaudálně k symfýze. Stejným postupem pronikneme přes břišní stěnu v linea alba. Okraje rány zarouškujeme a naložíme rozvěrač.

c) Ligatura v. cava

Nalezneme břišní aortu a podél ní probíhající v. cava inf. Jemnou tupou pinzetou opatrně oddělíme obě tyto cévy od sebe v místě odstupu aa. renales. Pomocí peanku tupě odpreparujeme v. cava od spodiny, opatrně podvlečeme pomocí zahnuté pinzety návlek a zauzlíme několika chirurgickými uzly.

d) Kanylace v. jugularis

Nůžkami rozstříhneme kraniokaudálně kůži cca 1 cm laterálně od manubrium sterni tak, aby byla viditelná v. jugularis externa v místě, kde se zanořuje pod m. pectoralis. Cévu nepreparujeme! Jehlu zavedeme kraniálně přes m. pectoralis do v. jugularis tak, aby hrot jehly při jejím mírném zvednutí lehce prosvítal tenkou stěnou žíly, tím se přesvědčíme o jejím správném zavedení. Do vény velmi pomalu aplikujeme požadovanou látku nebo fyziologický roztok.

e) Sutura

Operační ránu uzavřeme ve dvou vrstvách. K šití použijeme silonové vlákno, pro šití břišní stěny více zahnutou jehlu, pro šití kůže jehlu rovnější. Jehla je během šití fixována v jehelci. Nejprve šijeme stěnu břišní spolu s peritoneem, a to pokračovacím stehem, v tomto případě použijeme návlek délky cca 30 – 40 cm. První steh naložíme na kraniálním konci rány a uděláme dvakrát uzel na kratším konci vlákna. Dále pokračujeme delším vláknem, stehy klademe asi 0,5 cm od sebe, 2 – 3 mm od okraje rány. Jednotlivé stehy musí asistent operátora ihned dotahovat a nit mít pod neustálým napětím. Poslední steh neutahujeme a smyčku použijeme k zauzlení jako druhý konec.

Kožní řez šijeme jednotlivými stehy asi v 0,5 cm vzdálenostech. Uzly klademe při jednom okraji rány nad kůží (ne ve středu rány). Po skončení sutury ránu desinfikujeme jodovou tinkturou, zvíře umístíme do klece na břicho a necháme jej v klidu a teplém prostředí.

4. Závěr

Stručný popis topografie břišní dutiny u potkana, popř. srovnání s topografií člověka.

5. Anestésie laboratorních zvířat

Šárka Kuchtíčková

1. Úvod

Nové poznatky a pokrok v lékařských i biologických vědách je trvale spojen s pokusy na laboratorních zvířatech.

V současné době se hledají a už i aplikují alternativní metody, aby se minimalizoval počet laboratorních zvířat uvedených do pokusů. Nicméně řada experimentů se bez zvířecího modelu neobejde.

Z toho důvodu volba vhodného druhu pokusného zvířete, správná manipulace s ním a především volba vhodného způsobu anestézie výrazně ovlivňuje jak průběh experimentální práce, tak její výsledky. Výběr vhodného způsobu anestésie závisí na celé řadě faktorů. Je nezbytné přihlídnout k:

1. Povaze chirurgického výkonu (zda se jedná o akutní nebo chronický pokus) a tomu i přizpůsobit hloubku anestézie a analgezie
2. Znalosti vlivu anestetik na sledované pokusné parametry
3. Druhově specifickým rozdílům v citlivosti a dávkování anestetik u jednotlivých druhů laboratorních zvířat
4. Technickému a personálnímu vybavení laboratoře

2. Příprava pokusného zvířete před anestésii

Velmi důležitým předpokladem úspěšného provedení celkové anestézie je zhodnocení zdravotního stavu pokusného zvířete.

K zamezení předoperačních i pooperačních komplikací, zejména zvracení, a k odlehčení zažívacího traktu a krevního oběhu je vhodné, aby zvířeti před pokusem byla na určitý časový úsek odejmuta potrava. Voda musí být samozřejmě k dispozici a je eventuelně odejmuta až těsně před pokusem.

Pozor! U malých laboratorních zvířat je dlouhodobé hladovění spojeno s nebezpečím vzniku hypoglykémie a acidózy.

Úprava stavu hydratace

Zjistíme-li příznaky dehydratace, provádíme infuzní terapii krystaloidními roztoky v dávce 10ml/kg/hod. V případě nedostupnosti žíly můžeme podat subkutánně depo Ringerova roztoku v dávce 20-30ml/kg. Takováto zvířata do pokusů nezačleňujeme. Naopak sledujeme jejich

zdravotní stav a pokračujeme v terapii.

Premedikace

K zabránění výskytu bradykardie, bronchospasmu a k omezení slinné sekrece podáváme atropin v druhově specifických dávkách, 10-15 minut před zavedením samotné anestézie.

Sedace

K snadnější manipulaci se zvířetem, nebolestivým výkonům a zklidnění potenciální agresivity nebo k premedikaci před celkovou anestézií můžeme použít některá sedativ (propionylpromazin, dehydrobenzperidol, xylazin)

Celková anestézie

V zásadě rozeznáváme dva způsoby celkové anestézie.

1. Injekční anestézie, při které je v tekutině rozpuštěné anestetikum injikováno intravenózně, intramuskulárně, subkutánně nebo intraperitoneálně.
2. Inhalační anestézie, při které jsou vdechována za pomoci inhalačních zařízení plynná nebo tekutá anestetika.

3. Injekční anestézie

Jako vstupní cestu do organismu můžeme volit intravenózní – i.v., subkutánní-s.c., intramuskulární-i.m. nebo intraperitoneální – i.p. aplikaci. Způsob podání je pak rozhodující v dávkování, rychlosti a nástupu účinku i pro jeho délku. Při i.m., s.c. nebo i.p. injekci dochází k aktivní resorpci anestetika tkáněmi nebo přes peritoneum. Rychlost resorpce je závislá od způsobu aplikace, od místa aplikace, a od stavu krevního oběhu. Při i.v. injekci se dostává anestetikum přímo do krevního oběhu a odtud do CNS.

Subkutánní aplikace

Provádíme do volných tkání krku, mezi lopatky nebo stěny hrudní. Resorpce farmaka je opožděná. Tento způsob aplikace je používán při premedikaci anebo k podání depot tekutin při úpravě stavu hydratace.

Intramuskulární aplikace

Je velmi často používána k anestézii laboratorních zvířat, zejména králíků a morčat. Dáváme přednost aplikaci do musculus quadriceps nebo do musculus gastrocnemius hluboko do stehenní svaloviny.

Intraperitoneální aplikace

Tento způsob anestézie je výlučně prováděn u malých hlodavců. Zvíře přitom držíme v šikmé poloze hlavou dolů a injikujeme do horního kvadrantu hypogastria. Je možný ještě jeden způsob podání farmak intraperitoneálně za pomoci asistenta, a to tak, že premedikované zvíře uchopíme za volnou kůži na krku bříškem nahoru, mírně natáhneme zadní nožičky, čímž napneme břišní stěnu a poté aplikujeme injekčně farmaka skrze kůži a břišní stěnu mírně laterálně zhruba ve výši pupku kolmo na stěnu. Po proniknutí do břišní dutiny se jehla sklopí a zavede asi 1 cm a provádíme vlastní aplikaci. Při tomto podávání anestézie musíme brát v potaz velikost a uložení

jater, která by mohla být nesprávně vedeným vpichem poškozena. Tento způsob aplikace náleží zkušeným experimentátorům.

Intravenózní aplikace

Farmaka aplikujeme do povrchově ležících vén zvířete. U králíka používáme véna antebrachii nebo vena saphena, velmi dobře přístupná je véna marginalis auricularis.

U morčete je punkce obtížná. V úvahu přichází ušní véna nebo véna antebrachii. U některých druhů laboratorních zvířat připadají k úvahu pro aplikaci ocasní vény. U laboratorního potkana připadá v úvahu ocasní véna. Úspěch aplikace do těchto cév je závislý na zručnosti a zkušenosti experimentátora, proto raději volíme jiný způsob podání anestézie.

Manipulace a imobilizace laboratorních zvířat, způsoby podání farmak.

Myš laboratorní (*Mus musculus var. alba*)

Myš zvedáme z boxu za kořen ocasu a ihned ji pokládáme na drsnou podložku. Jestliže ji uchopíme pouze za špičku ocasu, začne po něm šplhat a může nás kousnout. K intraperitoneální aplikaci uchopíme myš za volnou kůži v šijové krajině palcem a ukazovákem a ocas držíme mezi čtvrtým a pátým prstem. Zvíře pak obrátíme do polohy na zádech. S myší manipulujeme velmi jemně. Hrubé zacházení vyvolá stres, který může modifikovat následný účinek anestetik a mění tak spolehlivost pokusu.

Nejčastěji podáváme anestetika ***intramuskulárně*** do svaloviny stehna nebo ***intraperitoneálně*** asi 2-3 mm laterálně od pupku. ***Intravenózní injekce*** vyžaduje značnou zručnost a praxi. K punkci užíváme nejčastěji laterální ocasní vénu nebo dorzální metatarzální vénu. Přístup k véně usnadní správné držení, ohřátí myši pod infračervenou lampou a ponoření ocasu do vody teplé 40-50°C na jednu až dvě minuty. Při opakovaném podávání je třeba cévu preparovat a kanylovat.

Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus var. alba*)

S potkanem je třeba manipulovat klidně a bez váhání, protože při zkusmých trhavých pohybech rukou se potkan snadno poleká, cítí se ohrožen a může zaútočit. Při přenášení držíme potkana palcem a ukazovákem levé ruky za ocas, asi v polovině jeho délky, rychle vyzvedneme z klece s hlavou visící dolů a položíme na podložku nebo pravé stehno. Nyní palcem a ukazovákem pravé ruky uchopíme zvíře za volnou kůži v krajině šíje a přetočíme na záda. Jestliže potkana uchopíme pouze za ocas, má tendenci podobně jako myš po ocase šplhat a mohl by nás nepříjemně pokousat.

Při druhé metodě uchopíme zvíře dlaní pravé ruky přes hřbet s palcem kolem krku a pod bradou tak, že nás nemůže v žádném případě kousnout. U zlých, divokých nebo nemocných potkanů používáme kožené rukavice. Při punkci ocasní žíly můžeme potkana zabalit do roušky nebo ručníku, lze použít i speciální odchyťový a odběrový box.

Subkutánní injekce podáváme do volné kůže v oblasti šíje, ***intramuskulární injekce*** do skupiny stehenního svalstva. ***Intraperitoneální aplikaci*** podáváme zvířeti v poloze na zádech.

Zvíře přitom držíme v šikmé poloze hlavou dolů a injikujeme do horního kvadrantu hypogastria. Je možný ještě jeden způsob podání farmak intraperitoneálně za pomoci asistenta a to tak, že premedikované zvíře uchopíme za volnou kůži na krku bříškem nahoru, mírně natáhneme zadní nožičky, čímž napneme břišní stěnu a poté aplikujeme injekčně farmaka skrze kůži a břišní stěnu mírně laterálně zhruba ve výši pupku kolmo na stěnu. Po proniknutí do břišní dutiny se jehla sklopí a zavede asi 1 cm a provádíme vlastní aplikaci. Při tomto podávání

anestézie musíme brát v potaz velikost a uložení jater, která by mohla být nesprávně vedeným vpichem poškozena. Tento způsob aplikace náleží zkušeným experimentátorům.

Pro **intravenózní aplikaci** používáme nejčastěji ocasní vény. Tato je u mladých jedinců snadno přístupná, protože kůže na ocase není zrohovatělá. U starších jedinců je třeba tyto zrohovatělé vrstvy odstranit a ponořit ocásek do teplé vody, aby se žíla dilatovala. Úspěch aplikace do těchto cév je závislý na zručnosti a zkušenosti experimentátora. Při opakovaném podávání je třeba cévu preparovat a zakanylovat.

Morče (*Cavia porcellus*)

Manipulace s morčetem je velmi snadná. Morče uchopíme zezadu palcem a ukazovákem kolem krčních partií a ostatní prsty ho svírají kolem hrudníku. Přední končetiny morčete vyčnívají mezi našimi prsty. Druhou rukou podpíráme jeho zadní část.

Intravenózní aplikace farmak u morčete je poměrně obtížná. Je závislá na praxi a zkušenosti experimentátora. V úvahu připadá ušní marginální véna po předchozím tření boltce ukazovákem a palcem a po dilataci xylenem. Dále je k dispozici véna cephalica a dorzální metatarzální véna. Použití intraperitoneální cesty podání anestetik je u morčete pro malou vzdálenost mezi stěnou břišní a břišními orgány dosti riskantní. Především hrozí poranění jater a močového měchýře. **Subkutánní injekce** se používá zřídka, většinou pro premedikaci a doplnění depot tekutin. Kůži hřbetu morčete je obtížné shrnout v řasu. **Intramuskulární injekce** se podává do svaloviny stehna a tato aplikace je nejrozšířenější.

Králík (*Oryctolagus cuniculus*)

Většina králíků je krotká a neagresivní, ale mohou se vyskytnout jedinci, kteří škrábou, koušou nebo kopou. Při nešetrné manipulaci se uvolňují katecholaminy do oběhu v masivním množství, což činí králíka citlivějším na srdeční arytmie a ohrožuje se tak průběh anestézie, dále prudké vymrštění zadních nohou může vést k fraktuře páteře s následnou ireverzibilní paralýzou končetin.

Ke zvířeti v boxu nebo kotci proto přistupujeme klidně, poklepáváme jemně prsty nad jeho hlavou a ušima a před zvednutím k němu promlouváme klidným monotónním hlasem. Jednou rukou uchopíme králíka za volnou kůži o oblasti lopatek, zatímco druhou ruku ho hladíme podél hřbetu až sklouzneme pod jeho zadní končetiny. Teprve potom vyzvedneme králíka z boxu a přitiskneme k tělu. Králíka nikdy nepokládáme na kluzkou podložku, kde je značně nejistý a podléhá panice. **Intramuskulární aplikace** se provádí hluboko do stehenní svaloviny musculus quadriceps a musculus gastrocnemius nebo do musculus humeri přední končetiny. **Subkutánní injekce** aplikujeme do volné kůže v oblasti lopatky. Kůže je zde velmi volná a snadno se z ní vytvoří kožní řasa. **Intravenózní injekce** podáváme nejčastěji do marginální žíly. Asistent stojí za králíkem a palci drží ucho skloněné směrem k anesteziologovi. Zadní část těla zvířete se přitom opírá o jeho hrudník. Svými předloktími pak asistent fixuje králíka po obou stranách. Oběma prsty působí kompresi marginální ušní žíly při bázi ucha. Místo vpichu volíme co nejdál, abychom v případě neúspěšného pokusu mohli provést další punkci o něco proximálněji. V laboratořích, kde se s králíky rutinně manipuluje, je často k dispozici odběrový box, který umožní zafixování králíka a snadnou manipulaci s ním i jedné osobě.

Přehled injekční anestézie u jednotlivých laboratorních zvířat.

MYŠ

Sedace:

Dehydrobenzperidol 3mg /kg i.m.; délka účinku 60 minut

Injekční anestézie:

Ketamin 100mg/kg i.m.,i.p. + xylazin 16 mg/kg i.m., i.p. , délka chirurgického stadia anestezie 90 minut = 0,1-0,2 ml/10g ž.v.i.p.

Ketamin 200mg/kg i.m., i.p.

Ketamin 200mg/kg i.m. + diazepam 5 mg/kg i.m.

LABORATORNÍ POTKAN

Sedace:

Dehydrobenzperidol 0,8 mg/kg i.m.

Diazepam 2,5 mg/kg i.m.

Atropin 0,05mg/kg s.c., i.m. 30 minut před výkonem k minimalizaci slinné a bronchiální sekrece (zvláště u anestézie diethyletherem a ketaminem)

Injekční anestézie:

Pentobarbital 20mg/kg i.p.

Ketamin 100mg/kg i.m.,i.p. + xylazin 16 mg/kg i.m., i.p. = 0,5 ml/100g ž.v.i.p.. Nevýhodou je zvýšená diuréza. Délka účinku 60 – 90 minut.

MORČE

Sedace:

Xylazin 4mg/kg i.m., délka účinku 10-15 minut, dosažená sedace je velmi slabá. Hrozí zvracení.

Injekční anestézie:

Ketamin 150 mg/kg i.m. + xylazin 5 mg/kg i.m., délka chirurgického stadia anestézie 40 minut. Spánek po anestezii 2-4 hodiny.

KRÁLÍK

Sedace:

Diazepam 5-10 mg/kg i.m., délka účinku 3-4 hodiny, mírná sedace. Vhodné i k premedaci ke ketaminové anestézii.

Injekční anestézie:

Ketamin 50-70 mg/kg i.m. + xylazin 4- 5 mg /kg i.m. K prodloužení anestézie je možno ketamin/xylazin zředit fyziologickým roztokem v poměru 1:3. Délka chirurgického stadia anestézie kolísá od 45-60 minut, spánek po anestézii 45-75 minut.

Pentobarbital 25-40 mg/kg i.v., malá terapeutická šíře, možnost výskytu dechové deprese.

Thiopental 25-30 mg/kg i.v., stadium lehké chirurgické anestézie 10-20 minut.

4. Inhalační anestézie

Představuje u zdravého zvířete nejlépe říditelnou celkovou anestézii a je v principu proveditelná u všech druhů laboratorních zvířat. Její nejjednodušší provedení spočívá ve vdechování par

anestetik v boxu.

Dále lze pokračovat maskou a pro nejlepší zajištění dýchacích cest v průběhu inhalační anestézie je tracheální intubace, popřípadě u akutních stavů tracheostomie.

Nejčastěji používaným inhalačním anestetikem je diethylether, halotan a methoxyfluran.

Anestézii můžeme udržovat pomocí směsi oxidu dusného a kyslíku v poměru 1:1 a 0,5-1% koncentraci methoxyfluranu.

Malou nevýhodou inhalační anestézie je ten fakt, že zvířata v inhalačních boxech reflexivně zadržují dech, a tím pádem může dojít k řadě komplikací souvisejících s respiračním a oběhovým systémem.

Resuscitace

Během aplikace anestetik může dojít u vybraných skupin laboratorních zvířat ke komplikacím. Jedná se většinou o zástavu dechu.

Při intravenózním podání barbiturátů k tomuto dochází u králíků. Vytažením jazyka zprůchodníme dýchací cesty a jemnou masáží hrudníku a břicha se pokoušíme nastartovat respiraci. Při déletrvajícím zástavě dýchání musíme králíka zaintubovat a řízeně ventilovat čistým kyslíkem.

Podobné je to u laboratorního potkana při inhalační anestézii v boxu. Cyanóza sliznic, uší a v interdigitálních oblastech svědčí pro ohrožení respiračním selháním. Ihned musí následovat energická opatření, neboť potkani špatně tolerují apnoe a vzápětí nastává i srdeční zástava. Umělá respirace záleží na jemném foukání vzduchu nebo lépe čistého kyslíku do dutiny ústní za pomoci katetru. K obnově respirace u potkana může pomoci i jemná masáž hrudníku. Občas pomůže i houpání zvířete hlavou dolů.

Péče o laboratorní zvířata po celkové anestézii

- Je nutné zajistit dokonalou ventilaci. Tracheální rourku odstraňujeme až po návratu polykacího reflexu.
- Dbát na udržování správné teploty těla, aby nedošlo k hypotermii. Používáme infračervené lampy nebo elektrické dečky. Teplotu zevního prostředí udržujeme na 25°C.
- Při delším přespávání měníme polohu
- Probouzející se zvířata by měla být izolována a chráněna před možností poranění a vzájemného napadení.
- Vodu k pití podáváme až po návratu do reflexní polohy.
- Po chirurgických výkonech dbáme na podávání malých dávek analgetik k profylaxi neurogenního šoku, k prohloubení dýchacích pohybů, ke zlepšení celkového stavu a v neposlední řadě z etických důvodů.

Euthanázie

Euthanázie ke usnutí zvířete s minimem jeho duševního a fyzického utrpení. Metody euthanázie dělíme na fyzikální a chemické. Výběr metody se řídí především druhem laboratorního zvířete, počtem zvířat určeným k euthanázii, důvodem k usmrcení a cílem následných vyšetření.

Mezi fyzikální metody patří a to zejména u malých hlodavců zlomení vazů a dekapitace. Jsou rychle proveditelné, ale méně estetické.

Z chemických metod je to podání injekčních nebo inhalačních anestetik, kterými zvíře předávkuje.

Jsou to barbituráty nebo speciálně k tomuto účelu určený připravený a komerčně dodávaný

kombinovaný přípravek T61. Z inhalačních anestetik se používá ether nebo halothan.

Příklady počítání dávek u laboratorních zvířat:

Laboratorní potkan váha 250 g Dávka 0,5 ml/100g

Výpočet:

Podání $25:2=12,5$ **1,25 ml**

Králík váha 2,70 kg Dávka: Diazepam 5 -10mg/kg

Amp a 2ml 10mg/ml

Podání 2,7 ml

Dávka: Narkamon 5% 60mg/kg

Lag a 50 ml 50 mg/ml

Výpočet: $2,7 \times 60\text{mg/kg} = 162:50(\text{mg/ml})=$ **3,24 ml z 5% Narkamonu**

Dávka: Rometar 2% 5 mg/kg

Lag a 50 ml 20mg/ml

Výpočet: $2,7 \times 5\text{mg/kg} = 13,5 : 20(\text{mg/ml})=$ **0,67 ml z 2% Rometaru**

Celkem ve stříkačce směs 3,24 ml 5% Narkamonu a 0,67 ml 2% Rometaru.

6. Průměrné hodnoty nejčastěji sledovaných parametrů u dospělých laboratorních zvířat

Šárka Kuchtíčková

1. Laboratorní myš

Hmotnost	20-90g
Teplota	37,1 °C
Srdeční frekvence	480-740 t/min
Arteriální tlak krve	
-systolický	95-140 mmHg
-diastolický	20-90 mmHg
Dechová frekvence	84-230 d/min
Množství krve	7,6% tělesné hmotnosti
Doba srážení krve	1-3 min
Počet erytrocytů	4,7-12,5 mil.mm-3
Hematokrit	41%
Počet leukocytů	10 tis.mm-3
- neutrofilní granulocyty	20-30%
- bazofilní granulocyty	0-1%
- eozinofilní granulocyty	0-1%
- lymfocyty	35-90%
- monocyty	0-3%
Počet trombocytů	350 tis.mm-3
Hemoglobin	148g/l (105-160 g/l)

2. Laboratorní potkan

Hmotnost	200-500 g
Teplota	37,3°C
Srdeční frekvence	260-600 min-1
Dechová frekvence	66-210 min-1
Arteriální krevní tlak	
- systolický	90-100 mmHg
- diastolický	80 mmHg
Množství krve	5-8 % tělesné hmotnosti
Doba srážení krve	2-4 min
Počet erytrocytů	5,5-10 mil.mm-3
Hematokrit	46%
Počet leukocytů	12,5 tis.mm-3

- neutrofilní granulocyty	18-36%
- bazofilní granulocyty	0-1%
- eozinofilní granulocyty	1-4%
- lymfocyty	65-75%
- monocyty	1-6%
Počet trombocytů	600 tis.mm-1
Hemoglobin	145g/l (130-150 g/l)

3. Laboratorní králík

Hmotnost	1,5-6 kg
Teplota	38,5°C
Srdeční frekvence	180 min-1(130-300)
Dechová frekvence	53 min-1(38-55)
Množství krve	5% živé tělesné hmotnosti
Doba srážení krve	5-7 min
Počet erytrocytů	6,3 mil.mm-3
Hematokrit	39,8%
Počet leukocytů	5,2-12 tis.mm-3
- neutrofilní granulocyty	8-50%
- eozinofilní granulocyty	1-3%
- bazofilní granulocyty	1-8%
- lymfocyty	20-90%
- monocyty	1-4%
Počet trombocytů	0,130 – 1 mil.mm-3

7. Pomůcky

Šárka Kuchtíčková

1. Úvodní praktikum. Práce s laboratorním zvířetem

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží.

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Operační stůl, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou pro narkózu a aplikaci farmak, nůžky, pinzety anatomické, peán, oční rozvěrač, šicí materiál, jehelec, chirurgické jehly, gázu a tampony.

Fyziologický roztok, jodová tinktura.

2. Alloxanový diabetes

Fáze A: Vyvolání experimentálního diabetu

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží .

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Roztok alloxanu ve fyziologickém roztoku (13mg/ml).

Operační stůl, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou pro narkózu a aplikaci farmak, nůžky, pinzety anatomické, peán, šicí materiál, jehelec, chirurgické jehly a tampony.

Fyziologický roztok, jodová tinktura.

Fáze B: Glukózový toleranční test

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží.

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Roztok glukózy (20%).

Glukometr a reagenční proužky pro stanovení hladiny glukózy v krvi, reagenční proužky pro stanovení glukózy v moči (MelliPhan, GlukoPhan, KetoPhan).

Alkohol pro desinfekci, žiletka, buničitá vata v přřezech, Petriho miska.

3. Anafylaktická reakce u králíka

Fáze A: Senzibilizace laboratorního králíka

Pomůcky:

Koňské sérum, injekční jehla 22G(černá), injekční stříkačka 5 ml, dezinfekce (Septonex spray).

Fáze B: Sledování změn v krevním obraze po anafylaktické reakci

Pomůcky:

Koňské sérum, injekční jehla 22G(černá) a 21G(zelená), injekční stříkačka 5 ml.

Zkumavky s vysušenou směsí šťavelanu dle Wintroba.

Hematologická kazeta obsahující mikropipetu 25 μ l, gumovou hadičku a sterilní náustek, Burkerovu komůrku, buničitou vatu v přířezech.

Baničky s roztoky 475 μ l pro počítání jednotlivých krevních elementů (Türkův roztok pro leukocyty, Dungerův roztok pro eozinofily a prokainový roztok dle Piettových pro trombocyty).

Podložní skla pro zhotovení krevních nátěrů.

Barvicí set LeukoDIF a barvicí kyvety pro diferenciální počet leukocytů .

Mikroskop.

Kyselý alkohol a ether pro čištění pomůcek.

4. Radiační poškození krevních buněk I, II

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží .

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%), heparin.

Operační stolek, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou pro narkózu, odběrovou jehlu (růžovou) se stříkačkou, nůžky, pinzety anatomické, oční rozvěrač, tampony.

Petriho miska na slezinu.

Zkumavky s vysušenou směsí šťavelanu dle Wintroba.

Hematologická kazeta obsahující mikropipetu 25 μ l, gumovou hadičku a sterilní náustek, Bürkerovu komůrku, buničitou vatu v přířezech.

Baničky s roztoky 475 μ l a 4975 μ l pro počítání jednotlivých krevních elementů (Türkův roztok pro leukocyty, Haymův roztok pro erytrocyty a prokainový roztok dle Piettových pro trombocyty). Zkumavku s transformačním roztokem dle Drabkina pro stanovení množství hemoglobinu.

Skleněné kapiláry pro hematokrit, plastelína na misce.

Podložní skla pro zhotovení krevních nátěrů. Skla barvená briliantkrezylovou modří pro retikulocyty.

Barvicí set LeukoDIF a barvicí kyvety pro diferenciální počet leukocytů.

Mikroskop. Centrifuga a odečítací zařízení pro hematokrit, spektrofotometr.

Kyselý alkohol a ether pro čištění pomůcek.

Barvená skla s krevními nátěry.

Mikroskop, imersní olej.

5. Model venózní trombózy u laboratorního potkana

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží.

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Operační stolek, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou (zelená) pro narkózu a

aplikaci farmak (oranžová nebo modrá), odběrová jehla (růžová) se stříkačkou, nůžky, pinzety anatomické, peán nebo moskyto, oční rozvěrač, oční preparační pinzety, oční nůžky, šicí materiál, gáza a tampony.

Heparin, hypotonický roztok, 2,5% natrium citricum.

Vlhká komůrka (Petriho miska se zvlhčeným filtračním papírem namočeným ve fyziologickém roztoku).

Centrifuga, koagulometr.

Diagnostický set pro stanovení APTT, koagulační kloboučky, pipety, špičky a zkumavky.

6. Konzumpční koagulopatie

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží .

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Operační stolek, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou (zelená) pro narkózu a aplikaci farmak (oranžová nebo modrá), odběrová jehla (růžová) se stříkačkou, nůžky, pinzety anatomické, peán nebo moskyto, oční rozvěrač, oční preparační pinzety, oční nůžky, šicí materiál, gáza a tampony.

Heparin, hypotonický roztok, 2,5% natrium citricum.

Centrifuga, koagulometr.

Diagnostické sety pro stanovení APTT, fibrinogenu a trombinového času dle Clause, koagulační kloboučky, pipety, špičky a zkumavky.

Mikroskop.

Hematologická kazeta obsahující mikropipetu 25ul, gumovou hadičku a sterilní náustek, Bürkerovu komůrku, buničitou vatu v přířezech.

Baničky s 475ul prokainového roztoku dle Piettových pro trombocyty.

Kyselý alkohol a ether pro čištění pomůcek.

7. Experimentální žaludeční vřed

Pomůcky

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží .

Ether pro narcosi.

Injekční stříkačka 2 a 5 ml, žaludeční sonda, kádinka.

Fyziologický roztok, Ranital inj., indometacin (Indren) nebo ketoprofen (Profenid).

Nůžky, anatomické pinzety.

Korková destička, špendlíky, skla na vyhlazení povrch sliznice.

Fixační roztok v kyvetě.

8. Vyšetření sekrece žaludeční šťávy v experimentu

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží .

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Operační stůlek, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou pro narkózu a aplikaci farmak, nůžky, pinzety anatomické, peán, oční rozvěrač, šicí materiál, jehelec, chirurgické jehly, gáza a tampony.

Ranital, fyziologický roztok.

Mikrobyreta, mikropipety, Erlenmayerova baňka na titraci, kádinka, centrifugační kalibrovaná zkumavka.

Fenolftalein, destilovaná voda, 0,01 mol/l NaOH.

Centrifuga.

9. EKG u potkana

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží .

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Operační stůlek, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou (zelená) pro narkózu, nůžky, pinzety anatomické, peán nebo moskyto, oční rozvěrač, oční preparační pinzety, oční nůžky, šicí materiál, gáza a tampony.

Endotracheální kanyla.

Monitory EKG.

10. Model peritoneální dialýzy u laboratorního potkana

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží.

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Operační stůlek, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou (zelená) pro narkózu a aplikaci farmak (oranžová nebo modrá), injekční stříkačka 20 ml, peritoneální kanyla, nůžky, pinzety anatomické, šicí materiál, gáza a tampony.

Ethylenglykol, dialyzační roztok, 7,5% roztok KCl.

Monitory EKG.

11. Stanovení kinetiky vylučování inulinu ledvinami.

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží.

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Operační stůlek, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou (zelená) pro narkózu a aplikaci farmak (oranžová nebo modrá), odběrová jehla (růžová) se stříkačkou, nůžky, pinzety anatomické, peán nebo moskyto, oční rozvěrač, oční preparační pinzety, oční nůžky, šicí materiál, gáza a tampony.

Fyziologický roztok, inulin 25mg v eppendorfce.

75mM roztok kyseliny beta-indolctové, konc. HCl, 0,5 % roztok TRITON X-100.

Centrifugační zkumavky, mikropipety, špičky.
Centrifuga, vodní lázeň, spektrofotometr.

12. Renální ischémie, vznik reninu v ledvině

Pomůcky:

Akvárium s víkem pro inhalační narkózu, váhy a závaží.

Ether pro narcosi, anestetická injekční směs (10 ml Narkamon 1% + 0,5 ml Rometar 2%).

Operační stůl, operační kazeta obsahující injekční stříkačky s jehlou (zelená) pro narkózu, nůžky, pinzety anatomické, peán nebo moskyto, oční rozvěrač, oční preparační pinzety, oční nůžky, šicí materiál, gáza a tampony.

Fyziologický roztok, jodová tinktura.

Mikroskopy, preparáty.

13. Akutní infarkt myokardu u králíka

Pomůcky:

Narkóza (Narkamon 5%, Dometat 2%, diazepam), fyziologický roztok, heparin.

Polypropylenové katetry pro kanylaci artérie a vény, infúzní sety, stříkačky, jehly.

Chirurgické instrumentárium.

EKG monitor a elektrody, zařízení pro sledování změn krevního tlaku krvavou cestou, dýchací přístroj.

8. Model peptické ulcerace žaludku na zvířeti

Michal Jurajda

1. Cíl

Vysvětlit etiopatogenezi vzniku peptických ulcerací žaludku a dvanáctníku. Demonstrovat na zvířecím modelu ulcerogenní působení nesteroidních antiflogistik a antiulcerózní působení blokátorů H₂ receptorů.

2. Úvod do problematiky

Peptické ulcerace v žaludku a dvanáctníku vznikají při nerovnováze v působení obranných slizničních mechanismů a agresivních žaludečních šťáv. Vznik peptických ulcerací usnadňují látky a stavy, které vedou ke zhoršení trofiky žaludeční sliznice a ke snížené produkci hlenu. Uplatňuje se také zvýšená sekrece žaludečních šťáv. Naopak protektivně působí látky snižující sekreci HCl nebo látky zvyšující sekreci hlenu.

3. Materiál a metody

Laboratorní zvířata (*Rattus norvegicus*) lačná po dobu 24 hodin, indometacin substance, ranitidin (RANITAL, Lek Pharmaceutical), anestetická směs, chirurgické instrumentárium, katetr.

4. Postup

U laboratorních potkanů vyvoláme aplikací suspenze indometacinu do žaludku vznik peptických ulcerací. Porovnáním kontrolní a pokusné skupiny zjišťujeme antiulcerózní působení ranitidinu.

Zvířata uvedeme do lehké inhalační éterové narkózy. Pomocí katetru nasondujeme žaludek a podáme ranital (u kontrolní skupiny fyziologický roztok). Po půl hodině opět v lehké éterové narkóze aplikujeme všem zvířatům suspenzi indometacinu. Experiment vyhodnocujeme po 24 hodinách. Zvířata utratíme předávkováním etheru a vypreparujeme žaludek. Žaludek rozstříhneme podél velké křivky a sliznici pod tekoucí vodou zbavíme žaludečního obsahu a hlenu s krví. Preparáty žaludku napneme mezi dvěma skly a spočítáme léze. Poté napneme žaludky na korkovou destičku a zafixujeme v 10% formalínu. Trvalé preparáty vyfotíme a vyhodnotíme plochu a počet lézí. K hodnocení můžeme použít program ImageJ.

5. Výsledky

Porovnáme počty a plochy žaludečních lézí mezi pokusnou a kontrolní skupinou. K zjištění statisticky signifikantního rozdílu použijeme nepárový neparametrický test (např. Mann – Whitney U test).

6. Závěr

Několik poznámek k možné interpretaci výsledků (závěr samozřejmě koncipují studenti sami), např. očekávaný nárůst hodnot je... možné zdroje chyb při měření

9. Radiační poškození krevních buněk I. a II.

Lydie Izakovičová Hollá

1. Cíl

Cílem praktického cvičení je zjistit, jak se mění v důsledku celotělového ozáření dávkou 4 Gy u experimentálních potkanů počet, eventuálně další vlastnosti erytrocytů, leukocytů a trombocytů, a to ve dvou různých časových odstupech po ozáření (3 a 20 dní, tj. ve stadiu nejhlubší deprese a ve stadiu regenerace). Dále nás zajímá, zda dochází ke změnám hmotností ozařovaných zvířat a některých jejich orgánů (sleziny).

2. Úvod do problematiky

Po celotělovém ozáření vyšších organismů se rozvíjí tzv. nemoc z ozáření, jejíž projevy závisí na velikosti dávky a na tom, zda šlo o jednorázové ozáření nebo organismus obdržel výslednou dávku v dlouhých časových intervalech. Vedle primárních poruch, vyvolaných vlastním ozářením, probíhají v organismu i sekundární reakce, které mohou dále poškozovat tkáň.

Citlivost na ozáření ionizujícím zářením je u různých tkání rozdílná. Účinky záření se projevují nejvýrazněji u buněk, které se intenzivně dělí. Mezi nejcitlivější buňky patří buňky lymfatické tkáňe a kostní dřeně, dále pak buňky střevní sliznice. Po ozáření se mění krevní obraz, v rané fázi dochází ke vzestupu počtu bílých krvinek v periférii (v důsledku vyplavení nezralých leukocytů z kostní dřeně), po němž následuje jejich prudký pokles, který je charakteristickým rysem klinického stádia onemocnění (je způsoben deplecí prekurzorů ve dřeni). Po ozáření vyššími dávkami se ihned objeví pokles lymfocytů (v důsledku jejich vyšší citlivosti na ozáření a aktivace stresové osy) přetrvávající relativně dlouhou dobu. Rychle také dochází k poklesu počtu trombocytů, později i erytrocytů (jejichž životní doba v cirkulaci je nejdelší, a proto trvá nejdéle, než se projeví „deficit“ erythropoezy v periferní cirkulaci). Množství erytrocytů v periferní krvi je totiž dáno vztahem mezi jejich „přítokem“ (zde kvantifikovaným pomocí retikulocytů) a jejich odtokem (ozářením použitou dávkou nejsou erytrocyty v periférii postiženy), který můžeme považovat za danou dávkou neovlivnitelný, tj. u potkana $100/56 = 1.79\%$ denně, (průměrná délka života erytrocytu u potkana činí totiž 56 dní). Výsledky by měly potvrdit elementární logickou úvahu, že rychlost produkce (zde indikovaná koncentrací retikulocytů) a koncentrace erytrocytů se po ozáření mění každá jinak, i když přirozeně v zákonité souvislosti.

Díky tomu, že u potkana přetrvává tvorba krevních elementů ve slezině i postnatálně, bude se měnit během vývoje nemoci z ozáření i hmotnost a buněčnost sleziny (po prvotní depleci vzroste hmotnost sleziny nad původní úroveň a hemopoeza ve slezině rychle nahrazuje přetrvávající menší deficit hemopoezy v kostní dřeni).

Poznámka: Mezi potkanem a člověkem jsou velké rozdíly jak v radiosenzitivitě (tedy citlivosti na ozáření - potkan je mnohem odolnější a je tedy schopen tolerovat vyšší dávky záření), tak i v krevním obraze (u potkana je obrácený poměr v zastoupení počtů neutrofilů/lymfocytů oproti lidem a kratší životní doba erytrocytů v periférii-kolem 56 dnů – závisí na kmeni potkanů).

3. Materiál a metody

Hayemův roztok, Bürkerova komůrka, světelný mikroskop, mikropipeta 25 μL , kyveta tloušťky 1 cm, fotometr s barevným filtrem pro 530 - 550 nm (SPECOL), transformační roztok podle Drabkina, Türkův roztok, banička s 475 μL prokainového roztoku (20ti násobné zředění), barvicí roztok 1 (Eosin Y + fosfátový pufr pH 6.8), barvicí roztok 2 (Azur II + fosfátový pufr pH 6.8), oplachovací roztok (fosfátový pufr pH 7.2).

4. Postup

a) Stanovení počtu erytrocytů - melanžerová metoda:

Provedení: Do melanžeru pro červené krvinky nasajeme pomocí gumové násavky krev přesně po značku 0.5 (ředění 1:200). Očistíme pečlivě hrot melanžeru od krve a zkontrolujeme výšku sloupce krve. Přitom je nutné, aby byl melanžér ve zcela kolmé poloze. Zcela nepatrně povytáhneme jemným nasátím sloupec krve v melanžeru a kolmo jej vložíme do lahvičky s Hayemovým roztokem. Tento roztok nasajeme s již nasátou krví po značku 101. Potom sejmemme opatrně gumovou násavku, uzavřeme palcem a ukazovákem obě ústí melanžeru a dobře mícháme 2-3 minuty. Po odkápnutí několika kapek z melanžeru vpustíme další kapku krevní suspenze pod krycí skličko počítací komůrky, až se kapka rozlije v souvislé vrstvě mezi krycím sklem a spodní plochou komůrky. Cca za 3 minuty počítáme krvinky ve 20 obdélnících:

$$E = \sum 20 \quad \times 10\,000 \text{ při ředění } 1:200 \text{ (počet}/\mu\text{L})$$

b) Stanovení množství hemoglobinu - hemiglobinkyanidová metoda:

Roztokem ferrikyanidu draselného se hemoglobin oxiduje na hemiglobin (methemoglobin). Ten se pomocí kyanidu draselného přemění na hemiglobinkyanid. Stabilní barevný komplex má hnědočervenou barvu a hodí se k fotometrickému stanovení.

Provedení: Do zkumavky se 7 ml transformačního roztoku podle Drabkina přidáme 25 μL krve a po promíchání necháme 10 min stát. Potom měříme extinkci vzorku ve fotometrické kyvetě tloušťky 1 cm oproti Drabkinově roztoku. Současně měříme extinkci standardů o známých koncentracích pro kalibrační přímku. Z této přímky odečteme koncentraci Hb v g/l.

c) Stanovení hematokritu - mikrohematokritová hodnota:

Centrifugujeme kapiláry délky 75 mm s nasátým krevním sloupcem 3 min. při 100 000 g. Oddělený sloupec erytrocytů se odečítá pomocí odečítacího zařízení (tabulka). Z počtu erytrocytů, množství hemoglobinu v krvi a hematokritu je možno spočítat tzv. indexy červené krvinky podle těchto vztahů:

MCV (μm^3) = Hct x 10 / počet ery v miliónech, kde MCV je střední objem erytrocytu v μm^3

MCH (ng) = Hgb x 10 / počet ery v miliónech, kde MCH je střední korpuskulární hemoglobin v ng.

MCHC (%) = Hgb / Hct x 100, kde MCHC je střední korpuskulární hemoglobinová koncentrace v %.

d) Počítání leukocytů - melanžerová metoda:

Provedení: Krev odebíráme analogicky jako u červených krvinek příslušným melanžerem, který má dělení 0,5, 1, 11. Krev nasáváme přesně ke značce 0,5 (ředění 1: 20). Pomocí násavky dosajeme ředící roztok pro bílé krvinky po značku 11. Bílé krvinky počítáme v 50 středních čtvercích:

$$L = \Sigma \quad \times 100 \text{ při ředění 1: 20 (počet}/\mu\text{l)}$$

e) Počítání krevních destiček - dle Pieltových:

Provedení: Do baničky s prokainovým roztokem napipetujeme 25 μl krve. Zředěná krev se nechá stát alespoň 20 minut, aby nastala hemolýza a aby se trombocyty stabilizovaly a zvýraznily. Poté se krev protřepe a napipetuje do prostoru Bürkerovy komůrky. Trombocyty se nechají cca 10 min sedimentovat a potom se počítají při zvětšení 240x, resp. 150x v dobře zacloněném světelném poli.

$$T = \Sigma 20 \quad \times 1\,000 \text{ (počet}/\mu\text{l)}$$

f) Příprava periferního nátěru:

Kapku krve jsme kápli na podložní sklíčko asi 1 cm od pravého okraje. Druhé sklíčko položíme na toto sklíčko vlevo od kapky krve pod úhlem 30 - 40 °. (Čím je tento úhel ostřejší, tím je nátěr tenčí). Kapku rozetřeme rychlým pohybem ve směru od kapky. Nátěr má být homogenní, rovnoměrný a přiměřeně tenký, což vyžaduje jistý cvik. Dlouhé okraje mají být rovné, na konci nátěru cípaté až do ztracena.

Barvení: Nátěry mají před barvením schnout 0,5-4 hodiny. Barví se pomocí soupravy LEUKODIF 200 (LACHEMA Brno).

Provedení:

- Krevní nátěry se zhotoví obvyklým způsobem na odmaštěná sklíčka a nechají se uschnout volně na vzduchu.
- Roztoky 1-4 se nalijí do vhodných nádobek
- Nátěr se fixuje tak, že se ponoří 5x na 1 sekundu do fixačního roztoku. Po každém ponoření se nechá roztok stéci a jeho přebytek se odstraní otřením kapky o stěnu nádoby
- Fixovaný nátěr se ponoří 3x na 1 s do barvicího roztoku 1. Po každém ponoření se nechá roztok stéci a jeho přebytek se odstraní otřením kapky o stěnu nádoby

- Nátěr se ponoří 6x na 1 s do barvicího roztoku 2. Po každém ponoření se nechá roztok stéci a jeho přebytek se odstraní otřením kapky o stěnu nádoby
- Sklíčko se opláchne oplachovacím roztokem a nechá se zaschnout volně na vzduchu

g) Nátěr na stanovení retikulocytů - nepřímá metoda pomocí brilantkrezylvé modři:

Provedení: Nátěr zhotovíme obvyklým způsobem na plochu podložního sklíčka s předem nanesenou zaschlou kapkou 1% brilantkrezylvé modři. Nabarvené preparáty necháme řádně uschnout před dalším zpracováním.

h) Počítání retikulocytů:

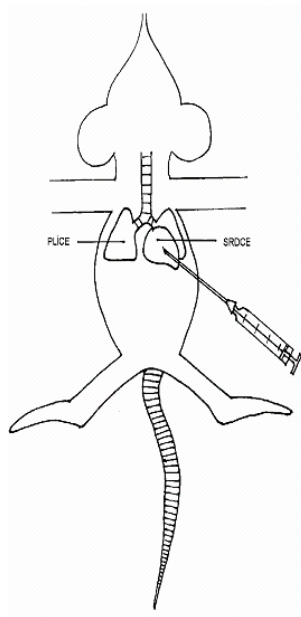
Provedení: Určujeme počet mladých erytrocytů se zbytky ribonukleové kyseliny v plasmě, tzv. substantia reticulofilamentosa (zbytky RNA se pomocí brilantkrezylvé modři obarví tmavě modře, takže retikulocyty můžeme odlišit od zralých erytrocytů).

Počítáme s imerzí, při 10-násobném zvětšení objektivu. Určujeme počet retikulocytů připadajících na 1000 erytrocytů a výsledek uvádíme v tisícinách (promile). Z jistého hlediska informativnější je vypočítat z této hodnoty a ze zjištěného počtu erytrocytů absolutní počet retikulocytů (přepočet faktorem $\times 10^9/l$).

i) Diferenciální rozpočet bílých krvinek:

Provedení: Počet jednotlivých druhů určujeme nejméně na 100, lépe na 200 leukocytů, nátěr přitom prohlížíme meandrovitě, protože rozložení jednotlivých subtypů bílých krvinek není v nátěru stejnoměrné. Počet jednotlivých druhů nakonec vyjádříme procentuálně.

Vyšetříme skupinu potkanů kontrolních a 2 skupiny potkanů ozářených (v první budou zvířata ozářena před třemi dny a ve druhé potkani ozářeni před 20 dny). Před začátkem experimentu uvedeme zvířata do lehké anestézie (inhalačním podáním Halotanu), zvážíme je a poté podáme intraperitoneálně (i.p.) Rometar s Narcamonem v dávce 0.5 ml/100 g (roztok získáme smícháním 0.5 ml 2% Rometaru s 10 ml 1% Narcamonu), čímž uvedeme zvířata do celkové anestézie. Torakotomií otevřeme hrudník a odebereme krev ze srdeční komory do 2 ml plastikové stříkačky s jehlou namočenou do heparinu.



Obrázek 1: *Odběr krve ze srdečních dutin*

Okamžitě po skončení odběru odkápneme 2 kapky na 2 podložní sklíčka pro zhotovení krevního nátěru a stanovení retikulocytů (sklíčko pro počítání retikulocytů bude označeno). Zbytek krve vystříkneme do zkumavky s protisrážlivou oxalátovou směsí a jemně promícháme. Po odběru krve zvážíme také vypreparované sleziny, jejichž odběr provádíme ze střední laparotomie.

Poté stanovíme počty jednotlivých krevních elementů (erytrocytů, leukocytů a trombocytů), dále množství hemoglobinu, hematokritu a zhotovíme krevní nátěry pro počítání diferenciálního krevního obrazu a stanovení zastoupení retikulocytů výše uvedenými postupy.

5. Výsledky

Získaná data budou porovnána vzájemně mezi všemi skupinami (tj. budeme sledovat rozdíly mezi skupinou kontrolních zvířat, potkanů ozářených před 3 dny a před 20 dny), abychom mohli posoudit dynamiku změn parametrů krevního obrazu. Statistické zpracování Mann-Whitney testem bude doplněno korekcí na mnohonásobné srovnání vybranou metodou (Holm, Bonferroni).

6. Závěr

Z výsledků praktika vyhodnotíme dosažené změny v krevním obraze a vysvětlíme případné odchylky od předpokládaných výsledků (možné zdroje chyb).

10. Ikterus u laboratorního potkana

Lukáš Pácal

1. Cíl

Cílem praktika je diagnostikovat ikterus a jeho typ.

2. Úvod do problematiky

Ikterus (žloutenka) je žluté zbarvení kůže a sliznic způsobené zvýšenou hladinou bilirubinu v séru. Při mírném zvýšení nemusí být žluté zbarvení zřetelné (subikterus). Pro zvýšenou hladinu bilirubinu v séru se používá termín hyperbilirubinémie. Bilirubin je konečný produkt degradace hemu. Při zániku erytrocytů se z nich uvolňuje hemoglobin, z hemové části je hemoxygenázou odstraněno železo a zbytek je přeměněn na bilirubin. Další zpracování bilirubinu se děje výhradně v hepatocytech. Po vstupu do hepatocytu následuje jeho rychlá konjugace s glukuronovou kyselinou proti koncentračnímu gradientu do žluči. Vzniká ve vodě nerozpustný konjugovaný bilirubin.

Podle mechanismu vzniku dělíme ikterus do tří skupin: prehepatální, hepatální a posthepatální.

Prehepatální ikterus vzniká nadměrnou tvorbou bilirubinu při zvýšeném rozpadu erytrocytů (hemolytické anémie). Hepatocyty nestíhají konjugovat a vyloučit všechny bilirubin, zvyšuje se jeho hladina v séru a jeho ukládání v tkáních způsobuje jejich žluté zbarvení.

Hepatální ikterus je způsoben poruchou metabolismu bilirubinu v játrech (vychytávání, konjugace nebo vylučování z hepatocytu) nebo poškozením až zánikem hepatocytů při jaterních chorobách.

Příčinou vzniku posthepatálního ikteru je cholestáza (porucha odtoku žluči).

3. Materiál a metody

Anestetická směs (1% Narcamon s Rometarem), chirurgické instrumentárium, operační stůl, injekční stříkačky, jehly, nitě, tampony, zkumavky, heparin, reagensie na stanovení bilirubinu v plazmě, proužky na diagnostiku bilirubinu a urobilinogenu v moči.

4. Postup

a) Modelování obstrukčního ikteru podvazem ductus choledochus

Laboratorního potkana zvážíme a uvedeme do celkové anestézie. Hmotnost si zaznamenáme. Potkana fixujeme na operačním stole a provedeme laparotomii. Pomocí rozvěrače otevřeme dutinu břišní a najdeme játra, žaludek a duodenum, ve spojce jater a duodena je spolu s venou

portae ductus choledochus. Ductus choledochus opatrně oddělíme od vena portae a podvážeme. Operační ránu uzavřeme ve dvou vrstvách. Potkana umístíme do klece na břicho. Nakonec umyjeme a uklidíme operační nástroje. Stejný postup mimo podvazu ductus choledochus provedeme u kontrolních potkanů. Další fáze pokusu následuje za týden.

b) Diagnostika ikteru

Potkana uvedeme obvyklým způsobem do narkózy. Porovnáme váhu zvířat před a po operaci, sledujeme zabarvení uší, paciček a ocasu a porovnáme s kontrolními zvířaty. Srdeční punkcí odebereme krev do stříkačky propláchnuté heparinem. Krev ze stříkačky (již bez jehly) opatrně vstříkneme do plastové zkumavky určené k centrifugaci. Po 10 minutách centrifugace (3000 otáček za minutu) získáme plazmu, kterou dále analyzujeme. Sledujeme zabarvení plazmy po centrifugaci. Punkcí močového měchýře odebereme moč. Pomocí indikátorových papírků vyšetříme přítomnost bilirubinu a urobilinogenu.

5. Závěr

Popíšeme pozorované změny. Porovnáme hladiny bilirubinu v plazmě a v moči mezi pokusnými a kontrolními zvířaty.

11. Model venózní trombózy u laboratorního potkana

Dana Bučková

1. Cíl

Porovnat hmotnost trombu vytvořeného ve venózním řečišti v nepřítomnosti a v přítomnosti heparinu a srovnat naměřené hodnoty koagulačních testů v obou skupinách pokusných zvířat.

2. Úvod do problematiky

Trombózou rozumíme vytváření krevních sraženin uvnitř cirkulačního systému. Ke vzniku tohoto stavu vede poškození cévní stěny (zánětem, aterosklerózou), vyšší srážlivost krve (při poruše antikoagulačních faktorů nebo uvolněním koagulačních faktorů z poškozené tkáně) a snížená rychlost průtoku krve (např. u ležících pacientů). K těmto mechanismům přispívá i zvýšená viskozita krve (u polycytémie, dehydratace apod.).

Mezi přirozené antikoagulační faktory patří specifický endotelový protein trombomodulin a plazmatické proteiny jaterního původu (protein C, protein S a antitrombin III). Heparin (ať už tělu vlastní nebo dodávaný za léčebným účinkem) snižuje srážení krve aktivací antitrombinu III.

3. Materiál a metody

anestetická směs (20 dílů 1% Narkamonu a 1 díl 2% Rometaru, 2 ml hypotonického roztoku (25 % roztok fyziologického roztoku), roztok heparinu v Michaelisově pufru, injekční jehly a stříkačky (1 stříkačka na 2 ml s obsahem 0,2 ml natrium citricum), chirurgické instrumentarium, preparační stolek, vlhká komůrka (Petriho miska s filtračním papírem, namočeným ve fyziologickém roztoku), tampony, papírová vata, gáza, SEVATEST aPTT Test, koagulometr KC 4A a příslušenství, centrifuga, zkumavky, automatická pipeta 100 µl, trombinové reagens

4. Postup

Model venózní trombózy u laboratorního potkana dle Hladovce (1986) umožňuje kvalifikovat i kvantifikovat tvorbu trombu ve venózním řečišti, která se dá standardně vyvolat společným působením dvou základních patogenetických mechanismů poškozujících cévní endotel – působením hypotonického roztoku a stagnací krve ve venózním řečišti. Hmotnost trombu je možno modifikovat aplikací heparinu. Aktuální situaci v koagulaci je možno monitorovat pomocí koagulačních testů, např. aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas) a TT (trombinový čas), nebo stanovením koncentrace fibrinogenu.

Anestézie

Laboratorní potkany po úvodní inhalační anestézii uvedeme do celkové narkózy podáním směsi 20 dílů 1% NARKAMONU a 1 dílu 2% ROMETARU i.p. v množství 0,5ml/100g váhy.

Operační výkon

Experimentální zvířata (laboratorní potkani 180-220 g) rozdělíme na dvě skupiny:

- 1. skupina: experimentální venózní trombóza bez antikoagulační terapie
- 2. skupina: experimentální venózní trombóza s antikoagulační terapií

Zvířatům podáme do vena jugularis 2 ml hypotonického roztoku (25% roztok fyziologického roztoku). Ve skupině s antikoagulační terapií přidáme do tohoto roztoku ještě vypočtené množství heparinu tak, aby zvíře dostalo antikoagulační dávku 4 U/kg. Zvíře fixujeme na operačním stolku v poloze na hřbetě. Nůžkami rozstříhneme kraniokaudálně kůži cca 1cm laterálně od manubrium sterni tak, aby byla viditelná v. jugularis externa v místě, kde se zanořuje pod m. pectoralis. Cévu nepreparujeme! Jehlu zavedeme kraniálně přes m. pectoralis do v. jugularis tak, aby hrot jehly při jejím mírném zvednutí lehce prosvítal tenkou stěnou žíly. Do vény velmi pomalu aplikujeme fyziologický roztok (bez nebo s heparinem, podle skupiny). Operační ránu uzavřeme v jedné vrstvě několika stehy.

Ze střední laparotomie pomocí očního rozvěrače otevřeme dutinu břišní a tupou preparací opatrně uvolníme cévní svazek abdominální aorty a vena cava inf. tak, aby bylo pod uvolněný cca 2 cm dlouhý segment možno naložit dvě ligatury (horní ligatura pod levou renální vénou, dolní cca 2 cm pod horní). Obě ligatury zatáhneme. Po uplynutí 10 min rozstříhneme hrudník ve střeně čáře a provedeme intrakardiální odběr krve do stříkačky s připraveným citrátem (1:9). Dobře promíchanou krev ze stříkačky opatrně stříkneme do plastické zkumavky pro centrifugaci. Po 10 min centrifugace (3000 ot) získáme plasmu, kterou dále analyzujeme.

Po odběru krve ze srdce (zvíře uhyne) vystříhneme cévní segment z dutiny břišní a umístíme ho do vlhké komůrky. Segment zvážíme nejprve celý, pak jej rozstříhneme, opláchneme fyziologickým roztokem, vysušíme a znovu zvážíme. Z rozdílu obou hmotností vypočítáme hmotnost trombu (tímto postupem se do jisté míry relativizuje rozdíl v délkách segmentů izolovaných na jednotlivých pracovištích).

Laboratorní část

a) aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas)

Do 0,1 ml plasmy přidáme 0,1 ml kefalinkaolinového reagens a stejné množství 0,025 mol/l CaCl₂. Kefalinová složka reagens aktivuje XII. Hagemannův faktor vnitřní koagulační kaskády. Kaolinová zrna standardně imitují membrány krevních destiček, které byly od plasmy odděleny centrifugací. Koagulační faktory obsažené ve vzorku plasmy po aktivaci kefalinkaolinovým reagens a po přidání 0,025 mol/l CaCl₂ začnou srážet fibrinogen v plasmě na fibrin. Dobu srážení (s) registruje koagulometr jako aPTT.

b) Trombinový čas (TT)

Přidání standardního množství trombinu k plasmě způsobí přeměnu fibrinogenu na fibrin v určitém čase, jehož délka závisí na množství a kvalitě fibrinogenu a na přítomnosti případných inhibitorů krevního srážení.

Do 0,2 ml vyšetřované plasmy přidáme 0,2 ml trombinového reagens. Koagulometr měří čas, za kterou se suspenze srazí.

Prodloužený TT je při snížené hladině fibrinogenu, dysfibrinogenémii, v přítomnosti heparinu a při získaných poruchách koagulace (DIC).

c) Stanovení fibrinogenu dle Clausse

Po přidání vysoce koncentrovaného trombinu ke zředěné plasmě (zředění eliminuje vliv inhibitorů koagulace) je doba koagulace přímo úměrná koncentraci fibrinogenu.

K 0,2 ml vyšetřované plasmy ředěné 1:9 fyziologickým roztokem přidáme 0,2 ml trombinového reagens. Koagulometr změří čas srážení. Z kalibrační křivky pak přímo odečteme koncentraci fibrinogenu v plasmě v g/l.

Zvýšené hodnoty bývají u zánětlivých a neoplastických onemocnění a u akutních interních stavů. Snížené hodnoty nacházíme u hypofibrinogenémie, DIC, při fibrinolytické léčbě, při těžkých poruchách jaterního parenchymu.

5. Výsledky

bez heparinu					s heparinem				
	m trombu [mg]	aPTT [s]	TT [s]	Fgen [g/l]		m trombu [mg]	aPTT [s]	TT [s]	Fgen [g/l]
1.					1.				
2.					2.				
3.					3.				
4.					4.				
5.					5.				
6.					6.				

Výsledky zapsané do tabulky srovnáme pomocí neparametrického nepárového Wilcoxonova testu.

9. Závěr

Zhodnotíme výsledky experimentu na základě provedené statistické analýzy.

12. Experimentálně navozený diabetes mellitus u pokusného zvířete - diagnostický průkaz glukózovým tolerančním testem

Kateřina Kaňková

1. Cíl

Provedení glukózového tolerančního testu k průkazu porušené schopnosti regulace glykémie, popř. manifestního diabetu u pokusného zvířete s experimentálně vyvolaným diabetem. Seznámení se s možnostmi diagnostiky diabetu mellitu a hodnocením nálezů.

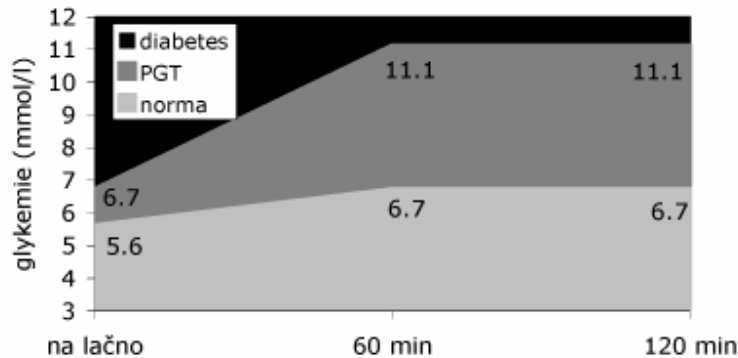
2. Úvod do problematiky

Diabetes mellitus (DM) je syndrom charakterizovaný deficiencí účinku inzulínu. Z hlediska příčin deficitu inzulínu rozeznáváme dva základní typy onemocnění: (1) DM typu I - porucha vzniká v důsledku absolutního nedostatku inzulínu při autoimunitní destrukci β buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu a (2) DM typu II - relativní deficiencie vzniká v důsledku inzulínové rezistence v periferních tkáních normálně citlivých na inzulín (kosterní sval, tuková tkáň, játra).

Při manifestním diabetu je možno zjistit hyperglykémii již nalačno (≤ 6.7 mmol/l v žilní nebo kapilární krvi po osmihodinovém lačnění). Její opakovaný průkaz stačí ke stanovení diagnózy diabetu. Kromě manifestního diabetu ovšem existuje i tzv. porušená glukózová tolerance (PGT), kdy je glykémie nalačno normální, ale po zátěži glukózou dlouho přetrvává hyperglykémie a její maximální hodnota je vyšší než norma (≤ 11.1 mmol/l za dvě hodiny po podání glukózy). K rozlišení sporných případů diabetu a odhalení PGT slouží glukózový toleranční test. U člověka jej v naprosté většině případů provádíme v modifikaci perorální, kdy vyšetřovaný vypije standardní dávku rozpuštěné glukózy (75g) a glykémie se stanovuje v čase 0 (tj. nalačno), za 60 a 120 minut. U pokusného zvířete vzhledem k neschopnosti perorální aplikaci glukózy použijeme modifikaci intraperitoneální. Krev na stanovení glykémie odebíráme z ocasní žíly v čase 0, 30 a 90 minut.

K vyvolání experimentálního diabetu se u zvířat nejčastěji používá alloxan¹ nebo streptozotocin². Obě látky selektivně toxicky poškozují β buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu a vedou v závislosti na dávce k rozvoji různě závažné inzulinopenie, a tedy diabetu typu I. Působení alloxanu podaného intravenózně v dostatečně vysoké dávce je experimentálně dobře popsáno. Alloxan vyvolá nejprve přechodnou stimulaci β buněk, při které dojde k uvolnění intracelulárních zásob inzulínu a vznikne krátkodobá hypoglykémie. Po několika dnech se pak u zvířat objeví inzulinopenie s klasickými příznaky diabetu: hyperglykémie, glykosurie, polydipsie a polyurie. Tíže projevů je závislá na použité dávce: zničení všech β buněk, a tedy kompletní inzulinopenie, je dosaženo dávkou cca 65mg/kg váhy zvířete (potkan), v našem případě volíme záměrně dávku nižší.

Jako průkaz rozvoje DM u potkana provedeme modifikovaný glukózový toleranční test - stanovíme glykémii nalačno a za 30 a 90 min po intraperitoneální aplikaci 20% glukózy.



Obrázek 1. Ukázka hodnocení orálního glukózového tolerančního testu u člověka (plná kapilární, popř. žilní krev)

3. Materiál a metody

Roztok alloxanu ve fyziologickém roztoku (13mg/ml), anestetikum (směs 1% Narkamon + 2% Rometar, 20:1), 20% roztok glukózy, fyziologický roztok, injekční jehly, stříkačky, žiletky, papírová vata, akvárium, éter, operační stolek, nůžky, pinzety, chirurgické jehly, jehlec, šicí materiál, váhy, osobní glukometr, reagenční proužky Glucophan a Ketophan, popř. Diaphan (vše PLIVA Lachema), Petriho miska.

4. Postup

a) Experimentální navození diabetu

Zvíře uvedeme do anestézie (inhalační úvod, anestetická směs 0.5ml/100g i.p.) a fixujeme na operačním stolku v hřbetní poloze. Nůžkami provedeme opatrně incizi kůže na krku ve stř. čáře. Zpřístupníme operační pole v místě, kde se v. jugularis externa zanořuje pod musculus pectoralis a kanylujeme v. jugularis. Cévu nepreparujeme ani jinak netraumatizujeme, intradermální jehlu zavedeme kraniálně přes m. pectoralis a **bez aspirace** aplikujeme roztok alloxanu v objemu 0.1ml/100g váhy zvířete. U kontrolních zvířat stejným způsobem aplikujeme fyziologický roztok. Operační ránu uzavřeme několika stehy. Zvířeti v mezidobí poskytneme náležitou pooperační péči a nutrici, zejm. však dostatečnou hydrataci s ohledem na rozvíjející se hyperglykémii. Další fáze pokusu následuje cca za 5 dní.

b) Glukózový toleranční test

Zvířata obvyklým způsobem uvedeme do narkózy. Okamžitě po nastoupení plné anestézie vyšetříme glykémii nalačno (zvířata jsou v den pokusu lačná). Glykémii stanovíme ze vzorku žilní krve pomocí osobního glukometru dle doporučení výrobce. Potkanovi oťreme proximální část ocasu tamponem navlhčeným v alkoholu. Žiletkou nařízneme příčně kůži v místech, kde probíhá ocasní žíla. Kapku krve opatrně obtiskneme na reagenční zónu proužku. Kapka musí být dostatečně velká, ale nesmí přetéct přes okraje reagenční zóny. Krvácení zastavíme kompresí tamponem. Po změření glykémie nalačno zvířeti aplikujeme 20% glukózu i.p. v dávce 1ml/100g

(tj. 2g/kg). Stejným způsobem změříme glykémii za 30 a 90 minut po podání. V mezechasech mezi měřeními položíme zvíře na břicho a pod pánev vložíme Petriho misku na zachycení moči. Na závěr praktika stanovíme pomocí reagenčních proužků semikvantitativně přítomnost glukózy a ketolátek v zachycené moči.

5. Výsledky

Z jednotlivých naměřených hodnot glykemií zvířat v příslušné skupině (diabetici, kontroly) spočítáme průměry a směrodatné odchylky. Průměrné hodnoty glykemií v jednotlivých časech měření vyneseme do grafu a získáme profily glykemií pro diabetická versus kontrolní zvířata. Statisticky zhodnotíme významnost rozdílu hodnot v 0., 30. a 90. minutě mezi skupinami (neparametrický nepárový test).

6. Závěr

Komentář a interpretace výsledků - došlo působením alloxanu k vyvolání diabetu nebo porušené glukózové tolerance? Co indikuje nález glukózy a ketolátek v moči?

7. Poznámky

¹Alloxan (mesoxalylurea) je organická sloučenina s pyrimidinovou heterocyklickou kostrou. Alloxan je oxidační produkt kyseliny močové, sám je silným oxidačním činitelem. Selektivní působení je umožněno transportem alloxanu do β buněk pomocí GLUT2 (dostává se i do jater, tam je ale detoxifikován). Přechodná hyperinzulinemie je způsobena zvýšením intracelulární hladiny Ca^{2+} (depolarizace membrány alloxanem a inhibice Ca^{2+} -ATP-áz) s následnou stimulací exocytózy inzulinových sekrečních granul. K poruše tvorby a sekrece inzulinu vede jednak inhibice glukokinázy v důsledku její oxidace, ale zejm. vlastní oxidační poškození a destrukce β buněk reaktivními metabolity kyslíku. Při cyklické redukci alloxanu na kyselinu dialurovou a oxidaci zpět na alloxan vzniká superoxid. V dismutační reakci se mění na hydrogenperoxid, který může vstupovat do Fentonovy reakce s Fe^{2+} za vzniku velmi toxického hydroxylového radikálu. Antioxidační kapacita β buněk je narušena zejm. v důsledku oxidace glutathionu alloxanem. Výsledné oxidativní poškození DNA aktivuje reparační enzymy, které pro svou činnost významně spotřebovávají NAD^+ a ATP a narušují tak energetický stav buňky, což může vést k jejímu zániku.

²Mechanismus selektivního účinku streptozotocinu spočívá opět v jeho transportu do β buněk prostřednictvím GLUT2. Vlastním patologickým efektem je alkylace DNA, která podobně jako v případě alloxanu aktivuje reparační pochody sekundárně vyčerpávající buněčný metabolismus.

13. Experimentálně navozená ateroskleróza u pokusného zvířete

Kateřina Kaňková

1. Cíl

- a) Objasnit patogenezi aterosklerózy s důrazem na kauzální efekt endotelového poškození (funkčního i organického) jako důležitého iniciačního faktoru.
- b) Ukázat kumulativní efekt kardiiovaskulárních rizikových faktorů – hypertenze a hypercholesterolemie – na progresi aterosklerózy.

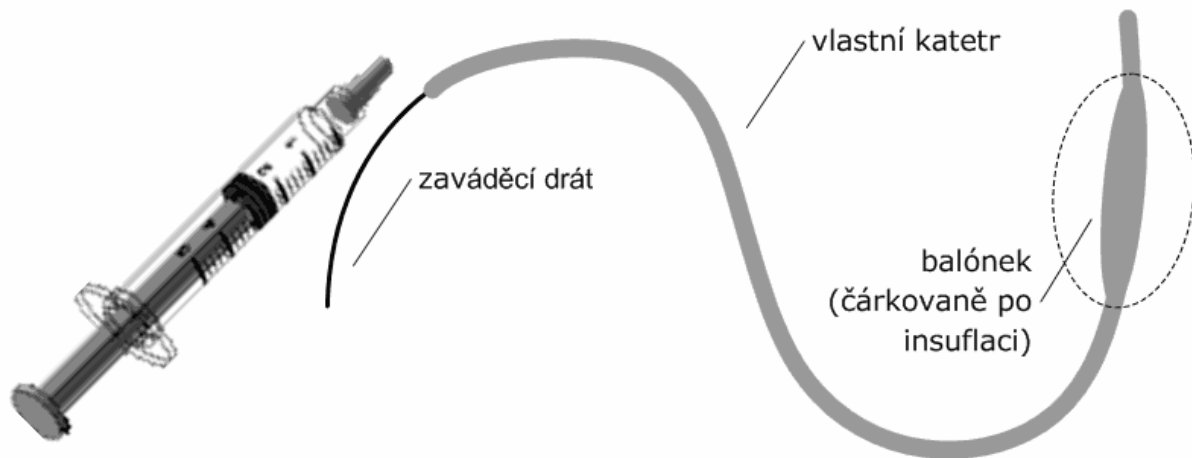
2. Úvod

Jedním z nejdůležitějších a velmi pravděpodobně kauzálních momentů v patogenezi aterosklerózy je poškození endotelu chronickou expozicí chemickým, biologickým i fyzikálním noxám (např. hypertenze, hypercholesterolemie (zejm. oxidované částice LDL), reaktivní metabolity kyslíku, homocystein, některé mikroorganismy aj.). Zpočátku funkční poškození posléze startuje cévní remodelaci zasahující všechny složky stěny cévy, které je podstatou aterosklerotického procesu. Omezený průtok cévou a obleněná perfúze celé zásobované oblasti, popř. úplný uzávěr aterosklerotickým procesem nebo častěji trombotizací v oblasti aterosklerotického plátu, jsou důvodem klinické manifestace aterosklerózy, nejčastěji v podobě ischemické choroby srdeční, mozku či dolních končetin, akutního infarktu myokardu a cévních mozkových příhod.

3. Materiál a metody

V experimentu budou použiti potkani kmene Wistar. V bodě A, B i C (viz níže Postup) budeme pracovat se dvěma skupinami zvířat – 1) kontrolní (pouze kanylace a. carotis), 2) pokusná (kanylace a. carotis a denudace endotelu). V rámci bodu C budeme srovnávat sledované parametry mezi těmito skupinami zvířat a dále si prohlédneme preparáty zhotovené stejným postupem (body A - C) u dalších dvou exp. modelů: 3) hypertenzní zvířata (operačně navozená hypertenze částečnou ligaturou abdominální aorty, následně kanylace a. carotis a denudace endotelu), 4) hypercholesterolemická zvířata (dietně navozená hypercholesterolemie obohacením potravy o živočišné tuky, následně kanylace a. carotis a denudace endotelu).

Anestetikum, operační stůl a instrumentarium, fyziologický roztok, injekční jehly, stříkačky, Fogartyho arteriální embolektomický katetr 120 602F, 60cm, náplň max. 2ml → Ø 4mm (obr. 1), 0.5% Evansova modř, fixace dle Bouina, alkohol, xylen, parafin, mikrotom, hematoxylin-eosin, protilátky (anti-vWf aj.).

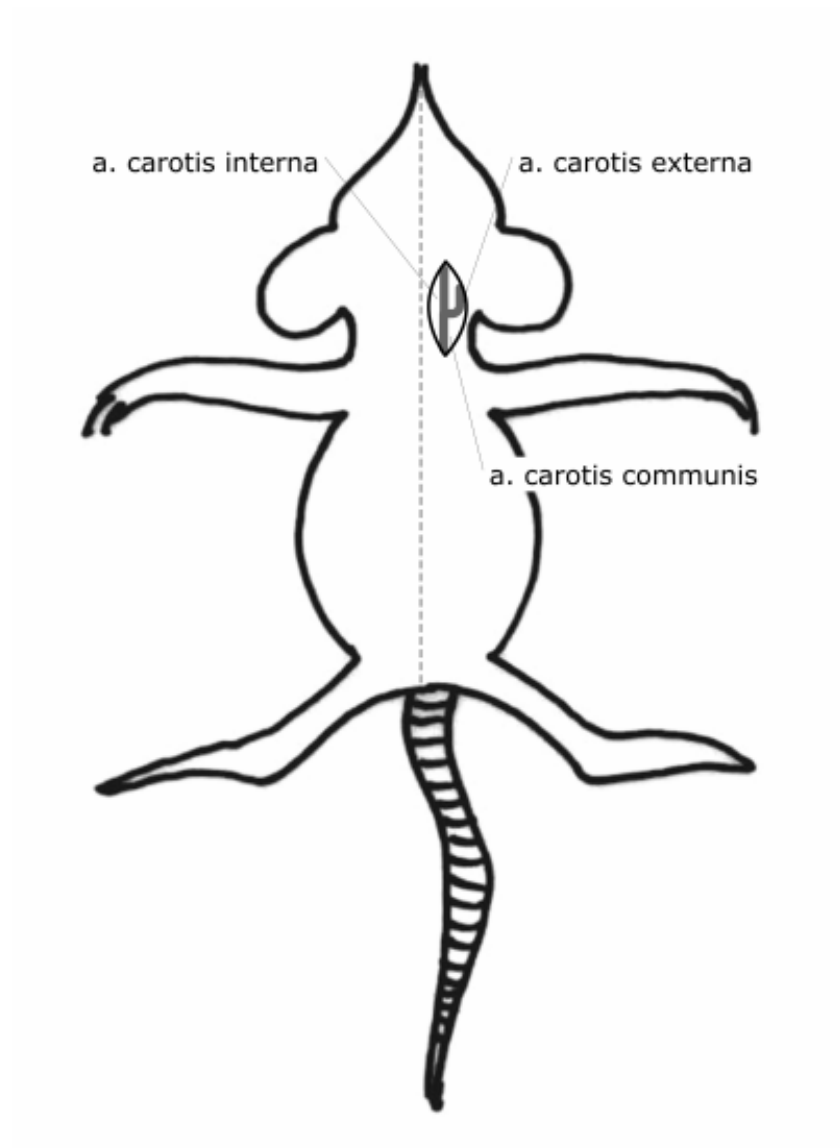


Obrázek 1. Schematicky Fogartyho arteriální embolektomický katetr.

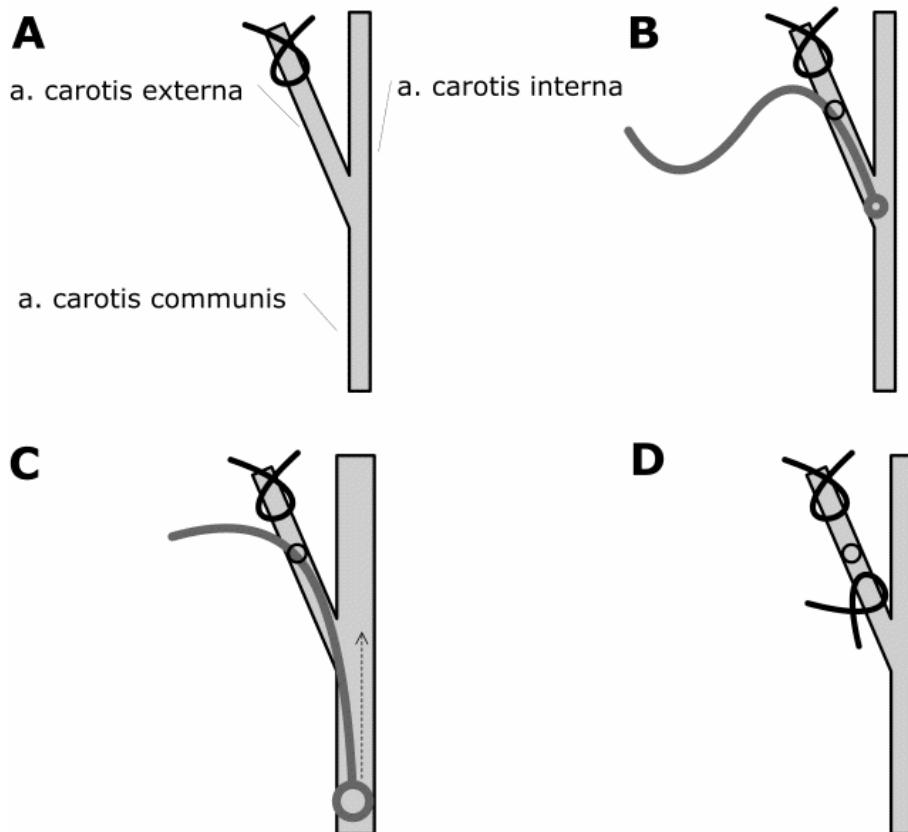
4. Postup

a) Experimentální navození aterosklerózy

Zvíře uvedeme do anestézie (inhalační úvod, anestetická směs 0.5ml/100g i.p.) a fixujeme na operačním stolku v hřbetní poloze. Nůžkami provedeme opatrně incizi kůže na krku poněkud laterálně od střední čáry. Zpřístupníme operační pole v místě, kde se z. a. carotis communis rozděluje na a. externa carotis interna a externa (viz obr. 2). Podvážeme a. carotis ext., zavedeme Fogartyho katetr a provedeme denudaci endotelu nafouknutým balónkovým katetrem (postup detailně viz obr. 3). Poté podvážeme a. carotis externa pod místem vpichu. U kontrolních zvířat postupujeme stejným způsobem ovšem bez nafouknutí balónku. Operační ránu uzavřeme v jedné vrstvě několika jednotlivými stehy. Zvířeti v mezidobí poskytneme náležitou pooperační péči a nutriční.



Obrázek 2. Schéma operačního přístupu a topografie tepen krku.



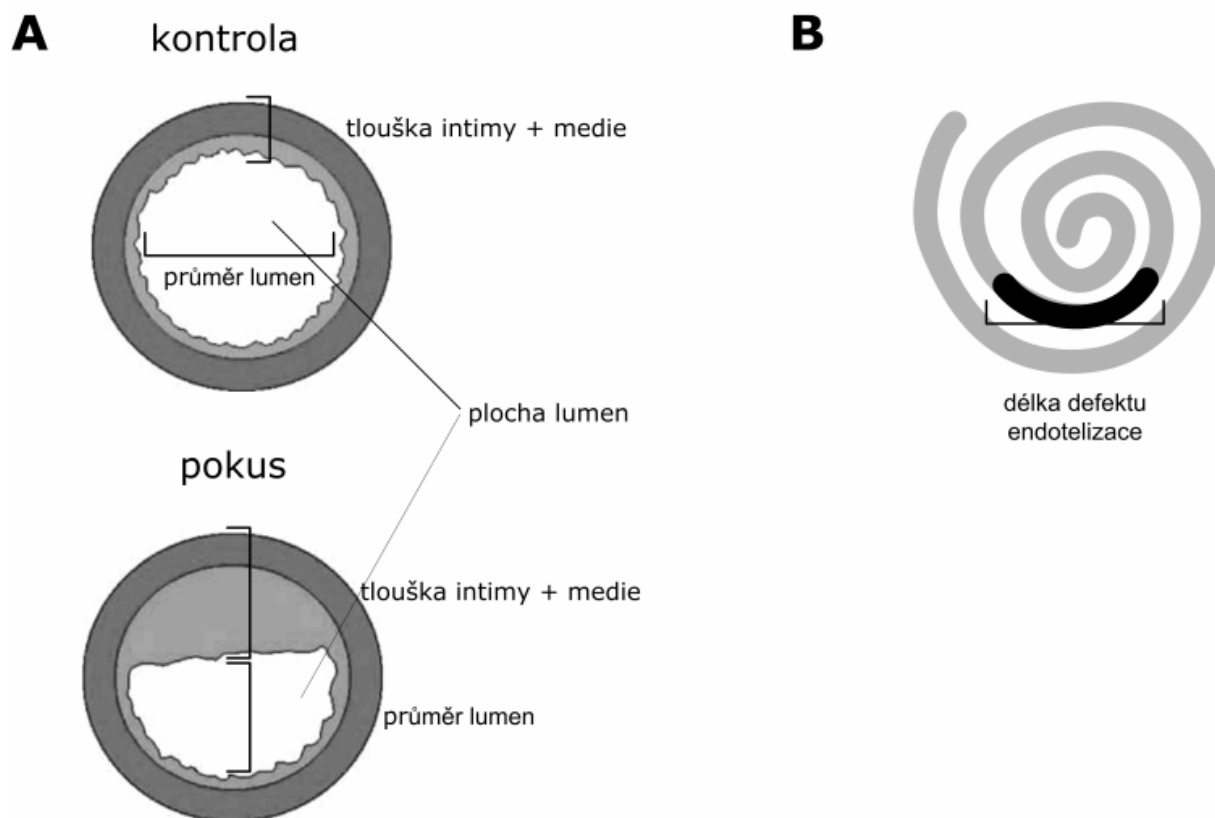
Obrázek 3. Praktické provedení úvodní části experimentu. A – podvaz a. carotis externa, B – zavedení Fogartyho katetru, C – zavedení katetru do a. carotis communis, inflace balónku a deendotelizace zpětným tahem, D – uzavření místa punkce podvazem a. carotis ext.

b) Euthanasie a zhotovení preparátů cév

Zvířata budou utracena v časových intervalech 3, 14 a 28 dní po provedení denudace endotelu. U poloviny zvířat v každé skupině (nativní preparáty) aplikujeme 1 hodinu před euthanasií Ewansovu modř i.v. do ocasní žíly (1mg/kg). Před euthanasií provedeme pro účely fixace preparátů cév tlakovou perfúzi (proplach fyziol. roztokem a násl. fixace Bouinovou tekutinou po dobu 16-ti hodin). Poté vystříháme cévy, odvodníme, zalijeme do parafinu a krájíme mikrotomem řezy tloušťky $\sim 4\mu\text{m}$. Barvíme přehledně hematoxylin-eosinem a speciálními protilátkami – anti-von Willebrandův faktor (endotel), anti-elastin (tunica media).

c) Hodnocení histologických preparátů cév

Obarvené preparáty prohlédneme ve světelném (H-E, elastin) a fluorescenčním (anti-vWf/DAB/fluorescein) mikroskopu a hodnotíme následující parametry: (i) tloušťku intimy a medie (mm), (ii) průměr lumen, (iii) plochu lumen (mm^2) na příčných řezech cévou a (iv) délku defektu endotelu (mm) na podélných řezech cévou. Schematické znázornění sledovaných parametrů ukazuje obr. 4.



Obrázek 4. Hodnocení sledovaných parametrů na histologických preparátech cév. A – parametry hodnocené na příčných řezech cévou (hematoxylin-eosin), B – podélný řez cévou (technika “roláda”) ukazující (ne)kompletní reendotelizaci (Evansova modř, anti-vWf).

5. Výsledky

U jednotlivých naměřených hodnot (viz tab. 1) spočítáme deskriptivní statistiku (průměry a směrodatné odchylky) a graficky znázorníme (sloupcové, popř. krabicové grafy). Statisticky zhodnotíme významnost rozdílu hodnot v intervalech 3, 14 a 28 dní mezi skupinami kontrolních a pokusných zvířat skupiny 1 a mezi pokusnými zvířaty skupin 1, 2 a 3 (neparametrické nepárové testy).

	kontrola	pokusná 1 (normo TK/CH)	pokusná 2 (↑TK)	pokusná 3 (↑CH)	dny
tloušťka intimy + medie (mm)					3
					14
					28
Ø lumen (mm)					3
					14
					28
plocha lumen					3

(mm²)					14
					28
délka defektu endotelu (mm)					3
					14
					28

6. Závěr

Komentář a interpretace výsledků – došlo v důsledku denudace endotelu k nastartování aterosklerotického procesu? Jak byla progresse aterosklerózy ovlivněna působením dalších kardiovaskulárních rizikových faktorů (hypertenze a hyperlipidemie)? Jakým způsobem se endotel za fyziologických okolností podílí na udržení normálních morfologických a funkčních poměrů v cévě?

14. EKG a arytmie na zvířecím modelu - změny EKG při adrenergní stimulaci, hypokalcemii a hyperkalemii

Kateřina Kaňková

1. Cíl

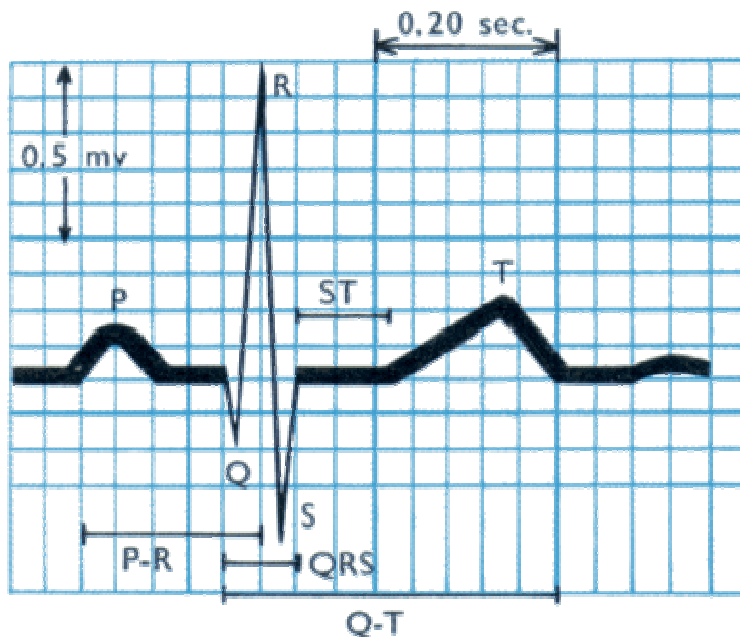
Popsat a vysvětlit příčinu změn EKG při adrenergní stimulaci, hypokalcemii a hyperkalemii, experimentálně vyvolané podáním adrenalinu, blokátorů Ca-kanálů (verapamil) a KCl, jako modelových situací a potenciálně život ohrožujících patofyziologických stavů v humánní medicíně.

2. Úvod do problematiky

Autonomní nervový systém (sympatickým prostřednictvím β_1 adrenergních receptorů a parasympatickým prostřednictvím M2 cholinergních receptorů) moduluje především rychlost geneze akčního potenciálu v pacemakerových buňkách SA uzlu (chronotropní efekt) a vedení AV junkcí (dromotropní efekt). Adrenergní stimulace má rovněž vliv na kontraktilitu myokardu (inotropní efekt).

Bilance vápníku v organismu je udržována jeho přiměřenou resorpcí z potravy ve střevě (nabídka, vitamin D), regulovanou exkrecí v ledvině (parathormon) a rovnováhou mezi resorpcí a novotvorbou kosti (parathormon, kalcitonin). Celková plazmatická hladina Ca (2.2 - 2.7 mmol/l) je zhruba z poloviny tvořena ionizovaným, a tedy fyziologicky relevantním, vápníkem; zbytek je vázán na bílkoviny (zejm. albumin) a komplexy s bikarbonátem, fosfátem aj. Ionizace kalcia je ovlivněna pH. Velký vliv na plazmatickou $[Ca^{2+}]$ mají fosfáty, součin koncentrace kalcia a fosfátů je zhruba konstantní. Pokles hladiny ionizovaného Ca vede ke zvýšení nervosvalové dráždivosti. Hypokalcémie prodlužuje repolarizaci, hyperkalcémie ji naopak zrychluje. Mimo to má kalcium pozitivní inotropní účinek.

Bilance draslíku v organismu (3.8 - 5.5 mmol/l v ECT) je určena jeho příjmem potravou a exkrecí ledvinami. Na regulaci exkrece ledvinami se podílejí kromě samotné plazmatické hladiny kalia hormony aldosteron, inzulin a adrenalin. Při zachovalé funkci ledvin nedojde ani při značně zvýšeném příjmu kalia potravou k jeho retenci a hyperkalemii. Závažná hyperkalcémie (>7 mmol/l) se rozvíjí zpravidla v oligoanurické fázi akutního renálního selhání a při chronickém selhání ledvin, pokud není snížen jeho příjem potravou; k snížení exkrece draslíku dále dochází při hypokortikalismu (např. m. Addison) a při předávkování diuretiky šetřícími K. Nejvýznamnějším projevem hyperkalcémie jsou změny převodu v myokardu, které mohou vyústit v srdeční zástavu.



Obrázek 1. Součásti EKG křivky – záznam jednoho elektrického srdečního cyklu.

3. Materiál

Monitory EKG, zařízení pro záznam EKG, operační stůl pro potkana, skleněné akvárium (inhalační narkóza), narkotikum (směs 1% Narkamon + 2% Rometar, 20:1), kanyly, stříkačky, roztoky: adrenalin 1mg/ml (Epinefrin Léčiva inj., 1mg/ml), verapamil 20mg/ml (Isoptin Abbot, 40mg/tbl.), KCl 12.5% (Kalium chloratum, plv.).

4. Postup

Zvíře uvedeme do celkové anestézie. Po úvodní inhalační narkóze aplikujeme směs Narkamon + Rometar v dávce 0.5 mg/100 g hmotnosti zvířete i.p. Potkana fixujeme na operační stůl, umístíme končetinové EKG svody (jehly jednotlivých končetinových elektrod zavedeme podkožně) a natočíme klidový záznam EKG. Zavedeme intraperitoneální kanylu (periumbilikálně). Do stříkačky natáhneme 2ml roztoku látky pro konkrétní model (adrenalin, verapamil nebo KCl) a pomalu podáme 0.5ml do kanyly i.p. Sledujeme rozvoj EKG změn. Za kontinuálního sledování EKG takto fracionovaně (po 0.5ml/každých 5-7min) podáme celý objem roztoku (tj. 2ml).

5. Výsledky

Popis výchozí fyziologické EKG křivky, popis časových změn u jednotlivých modelů při kumulativní expozici účinnou látkou.

6. Závěr

Vysvětlení patofyziologického mechanismu elektrofyziologických změn při nadměrné adrenergní

stimulaci, hypokalcémii a hyperkalémií.

15. Model peritoneální dialýzy na laboratorním potkanovi

Julie Bienertová Vašků

1. Cíl

Demonstrovat využití difúzních vlastností peritonea pro ovlivnění hodnot draslíku v organismu. Demonstrovat účinnost peritonea při terapeutickém ovlivňování hyperkalémie při akutním renálním selhání (ARS).

2. Úvod do problematiky

Při peritoneální dialýze se užívají obdobné principy (difúze a filtrace) jako při dialýze klasické, dialyzační membránou je přitom peritoneum, jehož plocha se rovná přibližně ploše tělesného povrchu, průtok krve činí zhruba 70 ml/min. Velkou výhodou peritoneální dialýzy je vyšší kvalita života pacienta a absence krevních ztrát, nebezpečím je zejména zvýšené riziko peritonitidy.

Úkolem je sledování EKG změn po podání dialyzačního roztoku o různé koncentraci K^+ u laboratorního potkana, jehož ledviny jsou nefunkční (v důsledku působení toxické noxy) a u nějž se tedy v důsledku ARS rozvíjí hyperkalémie.

3. Materiál a metody

Anestetická směs (1% Narcamon s Rometarem), injekční stříkačky, inj. jehly, kanyla (pro periferní žílu člověka), nitě, 2 pinzety, preparační stolek, chirurgické instrumentárium, tampony, papírová vata, gáza, EKG monitor se svody, roztok pro peritoneální dialýzu, 7,5% roztok KCl, roztok 0,1M HCl, bromfenolová červeň (indikátor pH 5.0 - 6.8), kapilára na stanovení Astrupova vyšetření

4. Postup

Cílem je u experimentálního zvířete navodit toxickým poškozením akutní renální selhání s manifestní hyperkalémií a sledovat efekt peritoneální dialýzy na rozvoj této hyperkalémie. Laboratorního potkana uvedeme do celkové anestézie obvyklým způsobem pomocí diethyletheru, intraperitoneálně 1% Narcamonu a Rometaru (0,5ml/100g). Nejdříve provedeme odběr krve z ocasní žíly na stanovení normálních hodnot acidobasické rovnováhy. Po provedení kožního řezu aplikují studenti pracující s kontrolní skupinou zvířat přes musculus

pectoralis do v. jugularis fyziologický roztok a studenti pracující s experimentální skupinou roztok ethylenglykolu v množství 0,15ml/100 g tělesné hmotnosti. Po 15 min asi v polovině vzdálenosti mezi spina iliaca anterior a pupkem zavedeme kanylu s jehlou, po proniknutí břišní stěnou jehlu odstraníme a kanylu zasuneme ještě asi o 1 cm hlouběji do dutiny břišní a zafixujeme leukoplastí. Z roztoku pro peritoneální dialýzu a roztoku KCl připravíme roztoky o koncentraci 0, 4 a 10 mmol/l. Potkany připojíme k EKG a provedeme výchozí záznam před aplikací dialyzačního roztoku. Posluchači změní pravítkem na EKG 10 komplexů QRS a spočítají průměrnou hodnotu v mm. Kontrolní skupina provede dialýzu s roztokem o koncentraci 4 mmol/l, další 2 skupiny s koncentracemi 0 a 10 mmol/l (celkové množství roztoku vpraveného do dutiny břišní je až 30 ml). Studenti budou kontinuálně sledovat EKG a po nástupu změn provedou zápis EKG křivek. U jednotlivých EKG změn bude zaznamenán čas od podání dialyzačního roztoku do vzniku příslušných změn, které studenti popíší. Po zachycení nesporných známek hyper- nebo hypokalémie na EKG se provede odběr venózní krve z ocasní žíly na stanovení parametrů ABR. Nakonec studenti po otevření hrudníku provedou intrakardiální odběr 1,5 ml srážlivé krve. Otevřením hrudníku a punkcí srdce zvíře uhynie. Krev zcentrifugujeme (10 min při 3000 ot/min), stáhneme plasmu a provedeme acidimetrické stanovení alkalické rezervy. Ke vzorku 500 μ l plasmy přidáme 10 μ l indikátoru (bromfenolová červeň) a titrujeme 0,1M HCl po 1,0 μ l. Zaznamenáme spotřebu HCl a orientačně porovnáme alkalickou rezervu.

5. Závěr

Vysvětlit patofyziologický mechanismus hyperkalémie při ARS, statistické zhodnocení výsledků (formulace nulové a alternativní hypotézy, výběr vhodného statistického testu)

16. Stanovení kinetiky vylučování inulinu ledvinami

Michal Jurajda

1. Cíl

Vysvětlit princip stanovení glomerulární filtrační rychlosti (GFR) pomocí stanovení ledvinné clearance inulinu. Demonstrovat na zvířecím modelu změny GFR při snížení počtu funkčních glomerulů podvazem jedné renální arterie.

2. Úvod do problematiky

Glomerulární filtrační rychlost udává množství glomerulárního ultrafiltrátu (primární moče) vyprodukovaného za jednotku času. Pokles GFR je významným ukazatelem poškození funkce ledvin – ledvinného selhání. Stanovení clearance inulinu umožňuje určit GFR při nemožnosti kvantitativního sběru moče vyšetřovaného subjektu.

3. Materiál a metody

Inulin, spektrofotometr, kyvety, operační instrumentárium, anestetická směs (1% Narcamon s Rometarem), roztok polyfruktosanu (25mg/1,5ml fyziologického roztoku), 75 mmol/l roztok kyseliny beta-indolyloctové v methanolu, koncentrovaná kyselina chlorovodíková, 0,5 % roztok Tritonu X-100, spektrofotometr, centrifuga, pipety, injekční stříkačky, inj. jehly, nitě, 2 pinzety, preparační stolek, tampony, papírová vata, gáza.

4. Postup

Laboratorního potkana uvedeme do celkové anestézie obvyklým způsobem pomocí diethyletheru, poté podáme intraperitoneálně směs 1 % Narcamonu a Rometaru (0,5ml/100g). Provedeme střední laparotomii v linea alba, izolujeme v. cava inferior a podvlečeme ligaturu pod arteria renalis sinistra. Studenti pracující s kontrolní skupinou potkanů nechají ligaturu nezataženou, studenti pracující s experimentální skupinou zaváží ligaturu, a tím zruší přítok krve do levé ledviny. Dále provedeme chirurgické zpřístupnění v. jugularis, kam aplikujeme polyfruktosan (PFS 25mg/1.5ml fyziologického roztoku). V předem stanoveném intervalu (po 5, 10, 15 a 30 min) otevřeme hrudník a intrakardiálně odebereme 1,5 ml srážlivé krve. Otevřením hrudníku a punkcí srdce zvíře uhynie.

Krev zcentrifugujeme (10min při 3000ot/min). Do zkumavek pipetujeme 50 ml roztoku indolyloctové kyseliny (75mmol/l), 1,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 50 ml biologického materiálu (séra). Promícháme, inkubujeme při 60°C 10 min a pak přidáme 50 µl Tritonu X-100 (0,5 %). Po ochlazení měříme v kyvetě při 520 nm, absorbanci testu odečítáme

proti kompenzaci testu. Výpočet koncentrace PFS ve vzorku se provede běžným způsobem ze změřených absorbancí testu, standardu a známé koncentrace standardu. Protože známe křivku závislosti koncentrace standardně zředěného inulinu na absorbanci, je možné odečíst koncentraci vzorku i z grafu. Pokles plazmatických koncentrací probíhá v exponenciální závislosti na čase, takže nanese-li jednotlivé body na semilogaritmický papír, dostáváme přímku.

5. Výsledky

Stručný návod k hodnocení daného praktika – poznámky ke statistice.

6. Závěr

Několik poznámek k možné interpretaci výsledků, např. očekávaný nárůst hodnot je... možné zdroje chyb při měření, atd.

17. Renální ischemie, vznik reninu v ledvině

Julie Bienertová-Vašků

1. Cíl

Ischemizace ledviny u laboratorního potkana, zhodnocení makroskopických změn a mikroskopické sledování granul reninu v ischemizované a neischemizované ledvině.

2. Úvod do problematiky

Omezení perfúze parenchymu ledvin je spojeno s aktivací systému renin- angiotenzin- aldosteron (RAAS). V důsledku protražované těžké ischemie se snížením nutričního průtoku (a velmi často s morfologickými změnami) vzniká ischemické akutní renální selhání. Na vzniku ischemického ARS se podílejí čtyři hlavní mechanismy:

1. pokles průtoku krve, zejména kúrou ledviny
2. snížení permeability glomerulární kapilární stěny
3. reflux filtrátu z tubulů do intersticia ledvin
4. tubulární obstrukce

Dlouhodobá ischemie endotelu v renálních cévách snižuje produkci vazodilatačních působků (NO, prostacyklin) a stimuluje uvolnění vazokonstrikčních látek typu endotelinu. Poškození buněk tubulů a ztráta resorpční schopnosti vede k nadměrnému přísunu solutů do oblasti macula densa distálního tubulu s aktivací tubuloglomerulární zpětné vazby a konstrikcí aferentních arteriol ústící v pokles glomerulární filtrace.

3. Materiál a metody

Anestetická směs (1% Narcamon s Rometarem), injekční stříkačky, inj. jehly, kanyla (pro periferní žílu člověka), nitě, 2 pinzety, preparační stolek, chirurgické instrumentárium, tampony, papírová vata, gáza, EKG monitor se svody, váhy, preparáty, mikroskop.

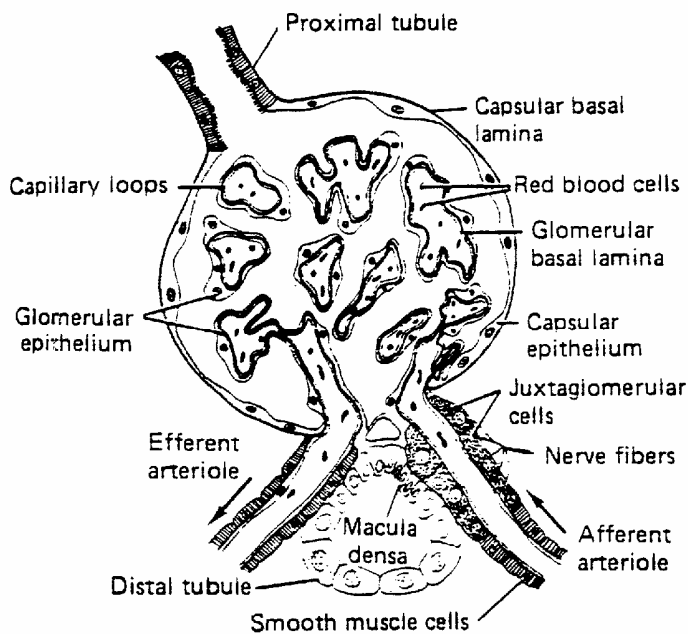
4. Postup

Levá a. renalis odstupuje z aorty distálněji než pravá. Proto je experiment modifikován tak, že stenosa se provádí na aortě mezi odstupem obou renálních tepen. Při provádění stenosis aorty musíme dbát na přítomnost odstupující a. mesenterica a podvaz volit tak, aby byl umístěn mezi a renalis sin. a a. mesenterica. Pravá ledvina je intaktní. Tato ledvina hypertrofuje, zatímco hypoperfundovaná levá ledvina se zmenšuje. Laboratorní potkan po výkonu přežívá cca jeden měsíc.

Laboratorního potkana uvedeme do celkové anestézie obvyklým způsobem pomocí diethyletheru, intraperitoneálně 1% Narcamonu a Rometaru (0,5ml/100g). Potkana upevníme v poloze na zádech na pracovní stůl a provedeme laparotomii ve střední rovině od processus xiphoideus po symfýzu. Rozevřeme operační ránu a jemnou tupou pinzetou odpreparujeme v. cava inf. od aorty v místě mezi oběma aa. renales. Peánem provedeme tupou preparaci abdominální aorty a opatrně protáhneme pod aortou šicí vlákno. Na aortu jemně přiložíme připravenou otupělou jehlu o průměru 0.5 mm, paralelně s osou cévy a naložíme několika uzly ligaturu aorty s jehlou. Jehlu odstraníme. Dutinu břišní po vrstvách zavřeme (sval- pokračovací steh, kůže- jednotlivé stehy).

Po třech týdnech provedeme oboustrannou nefrektomii. Očistíme obě ledviny, společně s myokardem zvážíme a zapíšeme do protokolu.

Následuje histologická analýza přítomnosti epiteloidních buněk v ledvině u potkana kontrolního a experimentálního a histochemický průkaz zvýšené produkce reninu v ischemizované ledvině.



Obrázek 1: Detail juxtaglomerulárního aparátu ledvin

5. Závěr

Vysvětlit patofyziologický mechanismus hypertenze při ischemickém akutním renálním selhání, statistické zhodnocení výsledků (formulace nulové a alternativní hypotézy, výběr vhodného statistického testu pro porovnání váhy ischemizované a neischemizované ledviny u pokusného zvířete). Stručný popis Goldblattova pokusu dvou a jedné ledviny.

18. Spirometrické vyšetření

Dana Bučková

1. Cíl

Seznámit se základy provádění a hodnocení spirometrického vyšetření a vyšetření usilovného výdechu pomocí peak-flow metru.

2. Úvod do problematiky

Spirometrie je základní vyšetření sloužící ke zjištění funkčního i organického postižení plic. Vzhledem k nutnosti aktivní spolupráce pacienta je možné zpravidla vyšetřovat až děti od 6 let. Spirometrem můžeme změřit hodnotu klidového nádechu a výdechu (dechový objem, VT - volume tidal), inspirační rezervní objem (IRV - inspiratory reserve volume) a expirační rezervní objem (ERV - expiratory reserve volume), které patří mezi tzv. statické parametry. Jejich součtem získáme plicní kapacity: vitální kapacitu (VC - vital capacity = IRV+ERV+VT) a inspirační kapacitu (IC - inspiratory capacity = VT+IRV). RV - reziduální objem, tj. objem vzduchu, který i po usilovném výdechu zůstane v plicích, však na spirometru zjistit nemůžeme! Z dynamických parametrů měříme objem vydechnutý maximálním úsilím za jednu vteřinu (FEV1 - forced expiratory volume in 1sec), objem vydechnutý s nejvyšším úsilím z polohy nejvyššího nádechu do maximálního výdechu (FVC - forced vital capacity) a průtokové rychlosti (MEF50, MEF25). FEV1 je u zdravých osob vyšší než 80% FVC. Pokud je tato hodnota snižena, je to většinou známka obstrukce dýchacích cest.

3. Materiál a metody

spirometr, peak-flow metr, sterilní náustky, tabulky referenčních hodnot

4. Postup

a) Spirometrické vyšetření

Vyšetření se provádí tak, že vyšetřovaná osoba se maximálně nadechne mimo přístroj a pak do něj s co největším úsilím vydechne. Dosažené hodnoty se vyjádří v procentech náležité hodnoty, která je tabelována pro pohlaví, výšku a věk. Hodnoty objemových parametrů nad 80% náležité hodnoty považujeme za normální, hodnoty od 60% do 80% odpovídají lehké poruše, od 40% do 60% středně těžké a nižší než 40% ventilační poruše těžkého stupně. Výdechové rychlosti nad 60% náležité hodnoty považujeme za normální, pod 60% náležité hodnoty za snížené. Snížení dynamických ventilačních parametrů je typické pro obstrukční ventilační poruchu, u restriční ventilační poruchy jsou sníženy především parametry statické, u smíšené ventilační poruchy nacházíme snížení jak statických, tak dynamických ventilačních parametrů. Pro orientační rozlišení obstrukční a restriční ventilační poruchy se užívá poměr FEV1/FVC (tzv. Tiffeneau-index), který je při nepřítomnosti obstrukce větší než 80%. Je však validní jen tehdy, pokud nejsou zvýšeny reziduální objemy nebo není přítomna tzv. hyperinflace plic.

b) Stanovení maximální výdechové rychlosti (PEF) pomocí peak-flow metru

Vyšetřovaná osoba se maximálně nadechne mimo přístroj a pak do něj s co největším úsilím vydechne. Posuvná ručička ukáže na stupnici výdechovou rychlost v litrech za minutu. Vyšetření se opakuje zpravidla třikrát, hodnotí se nejvyšší dosažená hodnota, která se vyjádří v procentech náležité hodnoty, která je tabelována pro pohlaví, výšku a věk.

5. Výsledky

	změřeno	referenční hodnota	% referenční hodnoty
PEF (peak flow meter)			
FVC			
FEV1			
PEF (spirometr)			
MEF50			
MEF25			
FEV1/FVC (Tiffeneau)			

6. Závěr

Bude obsahovat zhodnocení zda:

- se jedná o normální nález při spirometrickém vyšetření
- event. typ a závažnost poruchy

19. Hyperoxický test

Vyšetření transkutánním oxymetrem

Michal Jurajda

1. Cíl

Demonstrovat transkutánní oxymetr a vysvětlit princip jeho funkce. Pomocí transkutánního oxymetru odhadnout pravo-levý plicní zkrat.

2. Úvod do problematiky

Pomocí transkutánního oxymetru jsme schopni měřit parciální tlak kyslíku, který difunduje k měřicí elektrodě skrz kůži. Hodnota takto naměřeného parciálního tlaku kyslíku je dána propustností kůže pro kyslík a hlavně parciálním tlakem kyslíku v arteriální krvi, která zásobuje kůži pod čidlem. Toto měření může v některých případech nahradit potřebu odebírat arteriální krev ke stanovení parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Další výhodou tohoto postupu je možnost kontinuálního měření. Parciální tlak kyslíku v arteriální krvi získaný při různých frakcích inspirovaného kyslíku pak může sloužit pro odhad pravolevého zkratu.

3. Materiál a metody

Transkutánní oxymetr PL 1 (RTO Brno), tlaková láhev s medicínálním kyslíkem, redukční ventil, inhalační maska s difuzérem a přívodní hadičky, náplast, destilovaná voda, kapátko, denaturovaný líh, gázové tampony.

4. Postup

Studenti za pomoci asistenta změří p_{tcO_2} u vybraného dobrovolníka. Měření se provede při dýchání atmosférického vzduchu a poté při inhalaci dýchací směsi vzduchu s kyslíkem (F_i cca 50%). Z nomogramů se odečte přibližný pravolevý zkrat.

Nakalibrujeme oxymetr tak, aby udával parciální tlak kyslíku 150 mmHg, což je parciální tlak kyslíku v okolním vzduchu.

Elektrodu umístíme do masky, kterou lehce uzavřeme, tak, aby z ní mohla hyperoxická směs unikát. Otevřeme vysokotlaký ventil tlakové láhve, nastavíme nízkotlakým ventilem průtok O_2 na 15 l za minutu.

Nastavíme přísávání kyslíku do masky tak, aby parciální tlak kyslíku v masce byl přibližně 40, 50

nebo 450 mmHg. (Dosažitelná hodnota závisí zejména na tlaku v kyslíku v láhvi a těsnosti přívodního systému.)

Uzavřeme vysokotlaký ventil, nízkotlaký ventil regulující průtok ponecháme otevřený.

U pokusné osoby dobře odmastíme kůži na vnitřní straně předloktí a na odmaštěnou kůži kápneme kapku vody o průměru asi 1 mm. Čidlo oxymetru přiložíme tak, aby kapka vody byla v kontaktu s elektrodou, která je umístěna ve středu čidla. Čidlo přilepíme náplastí vzduchotěsně ke kůži. Vyčkáme, až se ustálí údaj na přístroji, což trvá obvykle 5 až 10 minut.

Přiložíme masku a otevřeme vysokotlaký ventil. Odečítáme a zaznamenáváme údaje oxymetru v intervalu 15 sekund do ustálení hodnoty.

Uzavřeme vysokotlaký a nízkotlaký ventil, sejmeme masku a odstraníme čidlo.

Z maximální dosažené hodnoty $ptcO_2$ a koeficientu k vypočteme maximální dosaženou hodnotu paO_2 . Pomocí nomogramu stanovíme pro změřenou FiO_2 a maximální hodnotu paO_2 přibližně velikost pravolevého zkratu.

5. Výsledky

Výsledkem praktika jsou hodnoty odhadovaného pravolevého zkratu u pokusných osob.

6. Závěr

V závěru studenti zhodnotí velikost pravolevého zkratu a prodiskutují faktory ovlivňující hodnoty naměřeného $ptcO_2$ (tloušťka kůže u mužů a žen, kosmetika, vliv teploty okolního prostředí).

20. Vyšetření bariérové funkce kůže

Vyšetření kožní vodivosti

Michal Jurajda

1. Cíl

Demonstrovat metody měření bariérové funkce kůže a využití těchto měření v klinické praxi.

2. Úvod do problematiky

Kůže zprostředkovává na převážné části povrchu lidského těla kontakt se zevním prostředím. Za její bariérovou funkci je zodpovědná především nejsvrchnější vrstva epidermis, stratum corneum. Bariérovou funkci kůže můžeme hodnotit tak, že kůži vystavíme určité definované zátěži a sledujeme reakci kůže na zátěž, popřípadě měříme změny jejích fyzikálních a chemických vlastností.

3. Materiál a metody

Podložní skříčka, 1,0 M vodný roztok NaOH, nitrazinová žlut' (CAS 5423-07-4), Dermotest (Chirana), fyziologický roztok, gáza.

4. Postup

Studenti provedou klasickou Burckhardtovu zkoušku. Ta spočívá ve sledování rozvoje erytému po působení 0,5 M roztoku NaOH jako standardní zátěži kožní bariéry. Poté provedou vyšetření přístrojem Dermotest. Tady představuje standardní zátěž iontoforéza a stav kožní bariéry je měřen jako kožní vodivost při střídavém napětí o nízké frekvenci. Narušení kožní bariéry je možné simulovat stržením povrchové vrstvy epidermis pomocí samolepící pásky nebo odmaštěním kůže pomocí běžně používaných detergentů (SDS v prostředku na mytí nádobí).

Přístroj **Dermotest** umožňuje měření elektrické vodivosti kůže při frekvenci střídavého proudu 32 Hz v rozsahu 0-500 μ S. Metoda je kombinována s iontoforézou stejnosměrným proudem 1,5 mA, která představuje pro epidermis standardní zátěž. Přístroj ukládá do paměti 5 naměřených hodnot vodivosti (V1- za 1 minutu po zahájení měření, V2- za 30 s po zahájení iontororézy, V3- za 60 s po zahájení iontoforézy, V4- za 30 s po vypnutí iontoforézy, V5- za 60s po vypnutí iontoforézy).

Indiferentní elektrodu obalíme gázou namočenou ve fyziologickém roztoku a položíme na ni předloktí. Na volární stranu předloktí (vhodnou díky jemné vrstvě rohoviny v této oblasti a

nízké hustotě potních žláz, které mohou výsledek měření modifikovat) přiložíme diferentní elektrodu, podloženou kolečkem filtračního papíru, nasáklým fyziologickým roztokem. Po stisknutí tlačítka START začíná 3 minuty trvající měření. Pět výše uvedených hodnot kožní vodivosti V1-V5 je možno znovu vyvolat na displeji pomocí tlačítka VÝBĚR. Dermotestem vyšetříme 10 posluchačů a 10 posluchaček.

Burckhardtova zkouška

Na volární stranu předloktí nanese se kapka 0,5 M NaOH a překryje se podložním sklíčkem. Po 10 min expozice posuzujeme makroskopicky stav pokožky pod okluzí. Pokud je zjevný erytém, považujeme zkoušku za pozitivní (+++) příznak snížené funkce kožní bariéry. Pokud erytém nevznikl, opakujeme expozici na dalších 10 min (vznik erytému po 20 min expozice-pozitivita ++). Pokud erytém nevznikl, opakujeme expozici na dalších 10 min (vznik erytému po 30 min expozice-pozitivita +). Pokud ani po 30 min erytém nevznikl, považujeme zkoušku za negativní. Tento výsledek svědčí o kvalitní bariérové funkci epidermis.

5. Výsledky

Výsledkem praktika bude vyhodnocení Burckhardtovy zkoušky a hodnoty kožní vodivosti naměřené přístrojem DERMOTEST. Posoudíme rozdíl kožní vodivosti mezi skupinou mužů a skupinou žen pomocí analýzy variance?

6. Závěr

V závěru se studenti vyjádří ke korelaci výsledků Burckhardtovy zkoušky s hodnotami kožní vodivosti a ke změnám kožní vodivosti po odstranění povrchové vrstvy epidermis lepící páskou, popřípadě po omytí kůže detergentem.

21. Vyšetření periferních cév pomocí ultrazvuku

Michal Jurajda

1. Cíl

Vysvětlit principy vyšetření krevní cirkulace v periferních cévách s využitím ultrazvuku a demonstrovat možnosti klinického využití.

2. Úvod do problematiky

Proudění krve v artériích a vénách je možno detekovat pomocí ultrazvukových přístrojů využívajících Dopplerův efekt. Obvykle měříme rychlost, směr a charakter proudění. Změny proudění krve v cévách nás mohou informovat o případných stenózách. U vén na končetinách můžeme hodnotit stav žilních chlopní.

3. Materiál a metody

Kapesní „doppler“ MULTI DOPPLEX II se sondou EZ8 (Huntleigh Nesbit Evans Diagnostics), „ultrazvukový“ gel, fonendoskop, rtuťový tonometr.

4. Postup

Studenti změří arteriální krevní tlak na horní končetině metodou Riva Rochi a poté ověří naměřenou hodnotu systolického krevního tlaku pomocí kapesního doppleru. Změří arteriální krevní tlak na dolní končetině a porovnájí s tlakem na horní končetině.

Studenti se pokusí provést diagnostický manévr na syndrom horní hrudní apertury pomocí palpce tepu a pomocí ultrazvuku.

Studenti vyšetří věnu jugularis. Budou sledovat jak je proudění krve ve větě ovlivněno dýcháním a jak reaguje krevní proud ve větě na Valsalvův manévr. Dále vyšetří povrchové žilní řečiště na horní končetině se zaměřením na žilní chlopenní systém.

5. Výsledky

Výsledkem praktika budou hodnoty STK naměřené na horní a dolní končetině, výsledek diagnostického manévru na detekci syndromu horní hrudní apertury a výsledek vyšetření žilního řečiště na horní končetině.

6. Závěr

V závěru se studenti vyjádří k interpretaci výsledků měření.

22. Vyšetření krevního tlaku (TK). Ambulantní monitorování TK a tepové frekvence (SF).

Změny TK a SF v důsledku změn polohy těla, izometrické zátěže a lehké fyzické zátěže.

Anna Vašků

1. Cíl

Cílem tohoto cvičení je seznámit se s monitorem Space Lab90207 a procvičit si měření TK rtuťovým manometrem při jednoduchých zátěžových testech. Hodnocení změny tlaku krve (TK) a tepové frekvence (SF) v závislosti na změně polohy těla, izometrické zátěži a lehké aerobní fyzické zátěži.

2. Úvod

Hypertenze je definována jako systolický krevní tlak 140 mm Hg a vyšší, diastolický krevní tlak 90 mm Hg a vyšší, nebo užívání antihypertenzních léků. Cílem rozpoznání a léčení hypertenze je snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění a s nimi spojené mortality a morbidity.

Ambulantní monitorování krevního tlaku se provádí pomocí přístrojů, které je možno programovat k měření krevního tlaku, přičemž vyšetřované osoby pokračují ve svých normálních denních aktivitách. Toto vyšetření je klinicky nejužitečnější a nejčastěji se používá u pacientů s podezřením na hypertenzi bílého pláště, u hypertenzních pacientů se zjevnou rezistencí na léčbu, s příznaky hypotenze při antihypertenzní medikaci, u nemocných s epizodickou hypertenzí a s autonomní dysfunkcí. Frekvence měření TK a SF se obvykle programuje na 15-20 minutový interval během dne a na 30-60 min. interval v noci. Každý záznam tohoto 24hod. vyšetření tedy teoreticky obsahuje 80-56 měření systolického a diastolického tlaku a srdeční frekvence. Střední arteriální tlak se stanovuje podle algoritmu výrobce přístroje.

3. Materiál a metody

Monitor krevního tlaku Space Lab 90207, rtuťový manometr.

4. Postup

a) Měření krevního tlaku přístrojem Space Lab 90207

Hodnocení změn TK a SF v důsledku změn polohy těla

Provedení: Přístroj naprogramovaný v režimu M (=manual) je asistentem nasazen vyšetřovanému studentovi. Student mění v daných časových intervalech polohu těla podle protokolu 1 a jsou mu přitom měřeny TK a SF.

Měření	Protokol 1
1	změření TK a SF vsedě za 5 min po posazení
2	změření TK a SF okamžitě po ulehnutí nznak
3	změření TK a SF po 5 min ležení
4	změření TK a SF okamžitě po posazení
5	změření TK a SF po 5 min vsedě
6	změření TK a SF okamžitě po postavení
7	změření TK a SF po 5 min vestoje

Naměřené hodnoty se zaznamenají do uvedené Tabulky 1.

Protokol:

Tabulka 1: Hodnoty TK a SF při změnách polohy těla

	1	2	3	4	5	6	7
Systolický TK [mm Hg]							
SAP [mm Hg]							
Diastolický TK [mm Hg]							
SF [min^{-1}]							

Hodnocení změn TK a SF po izometrické (IZM) zátěži

Provedení: Vyšetřovaná osoba, napojená na monitor, stiskne v dominantní ruce balónek tenzometru na maximální hodnotu. Adekvátní silou ruky potom drží poloviční hodnotu

maximální tenze na stupnici tenzometru po dobu 2 min. Monitor spouštíme v režimu M podle Tabulky 2, do níž zapisujeme naměřené hodnoty TK a SF.

Tabulka 2: Hodnoty TK a SF při izometrické zátěži

	před	po 1. minutě IZM zátěže	po 2. minutě IZM zátěže	5 min po skončení IZM zátěže
Systolický TK [mm Hg]				
MAP [mm Hg]				
Diastolický TK [mm Hg]				
SF [min^{-1}]				

Hodnocení změn TK a SF po lehké fyzické (LF) zátěži

Provedení: U vyšetřovaného posluchače, napojeného na monitor, změříme TK a SF v klidu vestoje. Posluchač potom provede 25 dřepů při frekvenci 1 dřep/s. Ihned po skončení činnosti a za dalších 5 min změříme TK a SF. Výsledky zapíšeme do Tabulky 3.

Tabulka 3: Hodnoty TK a SF po lehké fyzické (LF) zátěži

	před	okamžitě po skončení LF zátěže	za 5 min po skončení LF zátěže
Systolický TK [mm Hg]			
MAP [mm Hg]			
Diastolický TK [mm Hg]			
SF [min^{-1}]			

b) Měření krevního tlaku rtuťovým manometrem

Změny TK a SF po izometrické (IZM) zátěži (měřeno tonometrem)

Provedení: Vyšetřovaná osoba, napojená na rtuťový manometr, stiskne v dominantní ruce balónek tenzometru na maximální hodnotu. Adekvátní silou ruky potom drží poloviční

hodnotu maximální tenze na stupnici tenzometru po dobu 2 min. Naměřené hodnoty TK (rtuťovým manometrem) a SF (palpačně) zapisujeme do Tabulky 4.

Protokol:

Tabulka 4: Hodnoty TK a HR po IZM zátěži

n	před			ihned po ukončení zátěže		
	STK [mm Hg]	DTK [mm Hg]	SF [min ⁻¹]	STK [mm Hg]	DTK [mm Hg]	SF [min ⁻¹]
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
P						

Provedeme statistické hodnocení změn jednotlivých tlaků a srdeční frekvence, způsobených IZM zátěží, pomocí Wilcoxonova testu.

Hodnocení změn TK a SF po lehké fyzické (LF) zátěži

Provedení: U vyšetřovaného posluchače, napojeného na rtuťový tonometr, změříme TK a SF v klidu vestoje. Posluchač potom provede 25 dřepů při frekvenci 1 dřep/s. Ihned po skončení činnosti a za dalších 5 min změříme TK a SF. Výsledky zapíšeme do Tabulky 5.

Protokol:

Provedeme statistické hodnocení změn jednotlivých tlaků a srdeční frekvence, způsobených LF zátěží, pomocí Wilcoxonova testu.

Tabulka 5: Hodnoty TK a HR po LF zátěži

	před	ihned po skončení LF zátěže	za 5 min po skončení LF zátěže
--	------	-----------------------------	--------------------------------

n	STK [mm Hg]	DTK [mm Hg]	SF [min ⁻¹]	STK [mm Hg]	DTK [mm Hg]	SF [min ⁻¹]	STK [mmHg]	DTK [mm Hg]	SF [min ⁻¹]
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
P									

5. Závěr

Interpretovat změny v hodnotách TK a SF způsobené LF zátěží. Interpretovat změny v hodnotách TK a SF, způsobené IZM zátěží. Interpretovat rozdíly v hodnotách TK a SF při změnách polohy těla.

23. Statistika I.

Vladimír Znojil

1. Úvod

Vzhledem k velkým rozdílům mezi lidmi nelze z jediného případu usoudit na výsledky léčby, k posouzení její účinnosti, případně obecněji k formulaci vztahů mezi skupinami pokusných subjektů, proto musíme použít statistických metod. Škála statistických metod užívaných v medicíně je velice široká, jedny metody používáme například k porovnání dvou poměrně malých skupin pacientů, jiné a složitější při zpracování vysoce komplexních dat (například faktorovou nebo shlukovou analýzu) a další při statistických šetřeních na velkých populacích (do této skupiny můžeme zařadit i tabulky četností). Mnoho (hlavně moderních metod) lze jen těžko správně použít bez pomoci odborníka.

Základním pojmem při statistickém hodnocení výsledků je **nulová hypotéza**. Nulovou hypotézou může být v nejjednodušších případech předpoklad, že léčbou se stav pacienta nezlepšil, nebo že mezi studovanými skupinami není zjistitelný rozdíl, nebo že dvojice získaných veličin nejsou ve vzájemném vztahu cílem statistického testování je nulovou hypotézu vyvrátit. Přesněji řečeno prokázat, že pravděpodobně neplatí.

Při použití všech statistických metod je nezbytné vědět, že žádný ze získaných výsledků není dogmatem (pravdivý sám o sobě), každý výsledek získaný vědeckými metodami včetně statistických je správný jen do určité (a v případě statistických výsledků navíc kvantifikované) míry. Samozřejmě, pravděpodobnost správnosti většiny základních poznatků je velmi blízká 1, hodnota 1 však zůstává nedosažitelným limitem. V přírodních vědách a medicíně se dost vžilo používání dvou hraničních hodnot pravděpodobnosti omylu: pod 0.05 (v tomto případě je obvykle požívaným termínem "významný" efekt), nebo pod 0.01 ("velmi významný" efekt).

V této části se budeme zabývat jen nejjednoduššími metodami, kterými můžeme řešit mnoho běžně se vyskytujících problémů:

- zjištění, zda došlo k nějaké změně v hodnotě měřeného parametru (například krevního tlaku po zátěžovém testu)
- zda se hodnoty sledovaného parametru u dvou skupin mezi sebou liší (například výsledky určitých laboratorních vyšetření u zdravých a nemocných)
- jestli existuje souvislost mezi dvěma studovanými veličinami.

Tyto (a řadu dalších) problémy lze řešit více cestami. V některých případech můžeme použít již známých informací (například o typu rozdělení dané veličiny) k utvoření vstupních předpokladů, za nichž lze příslušnou úlohu řešit jednodušší nebo citlivější metodou. Takovým metodám zahrnujícím v sobě předpoklady o vlastnostech měřených veličin říkáme **parametrické**, těm metodám, při nichž téměř žádné vstupní předpoklady neužíváme, pak **neparametrické**. Čím se

tyto dvě skupiny od sebe liší? Parametrické metody mohou mít (při dobrém splnění předpokladů, za nichž jsou odvozeny) poněkud větší senzitivitu a dovolují popsat zjištěné poznatky kvantitativně (například velikostí změny nebo rozdílu a chybou této veličiny, případně rovnicí uvádějící dvě studované veličiny do matematického vztahu), neparametrické metody jsou celkově robustnější. Téměř všechny běžně používané parametrické metody vycházejí z předpokladu **normálního rozdělení** veličin. Ověření jejich předpokladů není příliš jednoduché, a proto jsou v současné době používány velice často metody neparametrické.

Neparametrické metody nepočítají s naměřenými hodnotami, ale pouze s výsledky jednoduchých porovnání, případně s pořadím těchto hodnot. Nejjednodušším z testů je takzvaný **znaménkový test**, při kterém například určujeme úspěšnost léčby znakem "+", neúspěšnost znakem "-". Za prokázanou úspěšnost považujeme stav, kdy je počet případů s "-" natolik malý, že je jeho pravděpodobnost menší než 5%.

Jako příklad vezměme pokus s 12 subjekty, který skončil s výsledkem 10-krát "+" a 2-krát "-". Pokud chceme spočítat onu pravděpodobnost výskytu "-" (neúspěchu léčby), musíme nejprve určit počet všech takových situací, při kterých se vyskytne maximálně 2-krát "-" (tzn., kdy je všech 12 "+" nebo je 11-krát "+" a 1-krát "-" nebo 10-krát "+" a 2-krát "-").

- situace, že bychom měli samá "+" může vzniknout jen jediným způsobem
- situace s jedním "-" 12 způsoby (celkem je 12 subjektů, kterýkoliv z nich může mít "-").
- situace se dvěma "-" vznikne 12*11 způsoby (poprvé se vybírá ze 12 subjektů, podruhé se vybírá z 11 zbývajících), protože se však jedná o kombinace a nezáleží na pořadí (který byl vybrán první a který druhý), je skutečný počet možností poloviční, tedy 66.

K získanému (nebo příznivějšímu) výsledku se tedy dostaneme $1+12+66 = 79$ způsoby. Formálně tento postup zapíšeme jako součet kombinačních čísel

$$N = \sum_{k=0}^m \binom{n}{k} = \sum_{k=0}^m \frac{n!}{k!(n-k)!}$$

kde **n** je celkový počet pokusných objektů (zde 12), **m** je počet vybraných (zde 2). Jaký však je celkový počet všech možných situací (bez ohledu na počty "+" a "-")? Tento počet získáme z uvedené rovnice, pokud bychom za **m** dosadili **n**, tzn. vypočetli bychom součet všech kombinačních čísel od 0 do **n**. Lze snadno spočítat, je to 2^n , tedy v našem případě 4096. Hledaná pravděpodobnost je pak prostým podílem $79/4096 = 0.019$, tedy v tomto příkladu méně než "požadovaných" 5%.

Podobným způsobem pracuje i mediánová ANOVA. Výhodou těchto metod je, že umožňují srovnávat i neúplně kvantifikovatelná data, mají však dosti malou citlivost. Nejčastěji používanými metodami jsou proto citlivější metody pracující s pořadími získaných hodnot, pokud mají některé údaje stejná pořadí, použijeme jejich průměrné hodnoty (například z pořadí 12, 13 hodnotu 12.5, podobně z pořadí 10, 11 a 12 hodnotu 11).

Úloha uvedená v minulém odstavci vede na Wilcoxonův test. Jeho technické provedení je jednoduché: spočteme rozdíly změřených hodnot před léčbou (x_i) a po léčbě (y_i) jako

$$d_i = x_i - y_i$$

a vytvoříme pořadí hodnot d_i bez ohledu na znaménko. Spočteme součet pořadí všech kladných hodnot d_i , a tím získáme hodnotu testovacího kritéria T . Meze testovacího kritéria T jsou většinou udány pro hodnoty pravděpodobnosti $\alpha < 0.5$, pro hodnoty $\alpha > 0.5$ lze spočítat meze testovacího kritéria

$$T_{1-\alpha} = \frac{n \cdot (n+1)}{2} - T_{\alpha}$$

rozdělení je tedy symetrické (je to zcela logické, setřídění od největšího čísla a setřídění od nejmenšího musí dát - při patřičné úpravě nulové hypotézy - stejnou odpověď).

Takto provedený test je jednostranný, odpovídá tedy na nulovou hypotézu typu: skupina A dává nižší nebo stejné hodnoty jako skupina B. Pokud chceme testovat hypotézu, že skupiny se od sebe neliší, musíme testovat nejen situaci již uvedenou, ale i situaci, že A dává vyšší, nebo stejné hodnoty jako B. Na každý z těchto testů musíme použít polovinu přípustné hodnoty pravděpodobnosti omylu, testujeme tedy tak, že místo α použijeme pravděpodobnost $\alpha/2$ a test provedeme také pro hodnotu pravděpodobnosti $1-\alpha/2$. Například pro 12 pokusů najdeme pro pravděpodobnost 0.01 (1%) hodnoty $T_{0.005} = 7$ a $T_{0.995} = 78 - 7 = 71$. Pokud nám tedy vyjde součet pořadí mezi 7 a 71 nepodařilo se nám rozdíly na úrovni pravděpodobnosti 0.01 prokázat.

Častěji musíme porovnat dvě skupiny získané na m a na n nezávislých objektech (porovnáváme například dva způsoby léčby).

V tomto případě sestrojíme společné pořadí hodnot r_i a s_j , z těchto pořadí spočteme pro skupiny o velikostech m a n součty

$$W_1 = \sum_{i=1}^m r_i$$

$$W_2 = \sum_{j=1}^n s_j$$

tedy součet pořadí z jedné a/nebo z druhé skupiny. Častěji se proto používají hodnoty

$$U_1 = \frac{mn - m(m+1)}{2} - W_1, \quad U_2 = \frac{mn - n(n+1)}{2} - W_2$$

Při použití takto zavedených kritérií mluvíme o **Mann-Whitneyově testu** (je původně definovanému postupu - **dvojvýběrovému Wilcoxonovu testu** - zcela ekvivalentní).

Pro jednostranný test používáme jen jednu z hodnot U_1, U_2 . Tabulky kritických hodnot U_{α} jsou obvykle tabelovány pro $m \leq n$, za prvou skupinu proto obvykle bereme tu menší. Obdobně jako při Wilcoxonově testu platí

$$U_{\alpha} = mn - U_{1-\alpha}$$

Protože na pořadí skupin nezáleží, můžeme (pochopitelně s uvažováním správného směru porovnání) použít vztahu $U = \min(U_1, U_2)$. Pro oboustrannou hypotézu musíme opět použít hraničních hodnot $\alpha/2$ místo α (stejně jako u Wilcoxonova testu).

Třetím velmi používaným testem je test vzájemné souvislosti mezi dvěma kvantitativními veličinami. Lze provést více způsoby, nejběžněji se z nich v současné době používá výpočet Spearmanova koeficientu korelace. Při jeho výpočtu postupujeme tak, že si utvoříme dvě pořadí: jedno pro veličiny x_i , druhé pro y_i . V ideálním případě budou obojí pořadí v příslušných dvojicích měřených hodnot stejná (pokud hodnoty y s rostoucím x vesměs rostou), nebo opačná (pokud klesají): Postupujeme tak, že pro každou dvojici hodnot x_i, y_i spočteme rozdíl jejich pořadí d_i . Spearmanův koeficient korelace r_s potom je

$$U_{\alpha} = mn - U_{1-\alpha}$$

pro test významnosti koeficientu r_s lze pak použít vztahu (n je vesměs počet dvojic):

$$t = r_s * \sqrt{\frac{n-2}{1-r_s^2}}$$

hodnoty mezních testovacích kritérií pravděpodobnost t najdeme v tabulkách Studentova rozdělení s $n-2$ stupni volnosti.

Důležitá poznámka: Takto provedený test není zcela korektní, pro malé počty n je lépe použít tabulek mezních hodnot Spearmanova koeficientu z větších statistických tabulek.

Dalším problémem je výskyt stejných pořadí při třídění souborů (viz poznámka výše). Tyto situace by se rozhodně neměly ve studovaných datech vyskytovat příliš často, výsledky získané z dat tohoto typu jsou nespolehlivé, spočtené hodnoty se od skutečných pravděpodobností mohou (i značně) lišit. Na "nedodržení" možnosti vytvořit jednoznačná pořadí (bez opakování) není příliš citlivý ani Wilcoxonův test (často se též u nás užívá ve spojení jednovýběrový Wilcoxonův test),

ani Mann-Whitneyův test, Spearmanův test je však na výskyt stejných pořadí v údajích x_i i y_i velice citlivý. Pokud nejsou tyto případy velmi ojedinělé, musíme na jejich výskyt výpočet hodnoty r_s korigovat, pro hodnotu r_s pak platí

$$r_s = \frac{A + B - D^2}{2\sqrt{AB}}$$

v tomto vztahu jsou hodnoty, kde

$$A = \frac{n^3 - n}{12} - T_x, B = \frac{n^3 - n}{12} - T_y, D = \sum_{i=0}^n d_i^2$$

korekční členy na stejná pořadí jsou v hodnotách x T_x a v hodnotách y T_y , obojí hodnoty spočteme jako

$$T = \sum \frac{t^3 - t}{12}$$

kde jednotlivá t jsou počty stejných hodnot příslušné veličiny (pro dvojici tedy 7/12, pro trojici 26/12 a podobně).

I tyto vztahy jsou však jen přibližné, pokud nabývají měřené veličiny jen několika málo hodnot (třeba 3-4) jsou uvedené postupy velmi nespolehlivé. Posoudit věrohodnost výsledků jde pochopitelně i v těchto případech (celou řadou metod, vesměs dost komplikovaných), nejjednodušší z nich jsou metody četnostních (kontingenčních) tabulek. Kromě nejjednodušších z nich (2x2 případy) jsou obvykle pravděpodobnosti výsledků počítány aproximativními metodami nebo statistickým modelováním (obvykle metodou Monte-Carlo).

2. Mnohonásobné srovnání

Při použití statistických metod na složitější úlohy je třeba brát v úvahu korekci na mnohonásobné srovnání. Mnohonásobné srovnání vzniká například tehdy, když určujeme ve které ze tří skupin má sledovaná veličina nejvyšší hodnotu. Čím více porovnání děláme, tím je pravděpodobnější, že (často zcela náhodně) najdeme nějaký rozdíl. Pro tyto situace je obvykle používán Bonferoniho postup: limitní zvolenou hranici významnosti P dělíme počtem použitých srovnání. Jinou, modernější, možnost nabízí Holmův postup. Při tomto postupu seřadíme významnosti od nejvyšší (s nejmenší hodnotou P) po nejméně významnou (tedy vzestupně dle P). Při N srovnáních vynásobíme prvou hodnotu číslem N , druhou $N-1$, třetí $N-2$ a tak dále, až předposlední 2 a poslední již nenásobíme. Poté postupujeme od počátku tabulky a porovnáme znásobené hodnoty se zadanou mezí (např. 0.05). Pokud jsou porovnávané hodnoty menší než mez, jsou jednotlivá jim příslušná tvrzení významná, pokud je vynásobená hodnota větší již nelze příslušné tvrzení a všechna tvrzení následující považovat za významná.

Problémem téměř všech metod korekce je obvykle nesplněný předpoklad, že jednotlivé porovnávané hodnoty jsou na sobě nezávislé, často existují vztahy mezi skupinami, korelace nebo asociace jednotlivých srovnávaných hodnot. Zanedbání těchto vztahů vede ve většině případů (ne však nutně!) k tomu, že korigované pravděpodobnosti jsou "překorigovány", a že jsou tedy větší, než by být měly (experimentátor je tím tedy "poškozen"). Námitky vůči korektnosti takto korigovaných srovnání jsou proto vzácné.

3. Design experimentu

Jednou z nejobtížnějších oblastí experimentální práce je návrh studie. Nesčetné námitky často provázejí (i dosti vtipná) zpracování více-méně náhodně sebraných medicínských údajů. Pokud má mít studie skutečnou hodnotu je nutné získávat údaje přesně definovanými postupy na dobře definovaných (a standardizovaných) souborech pacientů. Právě proti této zásadě se mnoho studií prohřešuje: je dosti běžné, že při srovnávání nové a starší léčebné metody není výběr pacientů náhodný a tím mohou být výsledky značně zkreslené (nejlepšímu chirurgovi umře nejvíce pacientů - operuje většinu těžkých případů). Mimořádnou pozornost je věnovat pokusům, při nichž je například posuzována kvalita života - za této situace se může velmi silně uplatnit "placebo efekt", zkreslení výsledků jím vyvolané může vést až k jejich bezcennosti (některé výzkumy, pokud mají být vůbec provedeny, se často blíží k hranicím etiky - pacient se nemá dozvědět, jak je léčen). Při hodnocení stavu pacientů může být nejen pacient, ale i lékař ovlivněn svými názory na lék, nebo použitý postup). Pokusům, při nichž pacient ani lékař nevědí do ukončení experimentu, do které skupiny léčených pacient náleží, říkáme "dvojitě slepé studie". Pro řadu problémů medicíny ale asi představují jediný dostatečně spolehlivý přístup k získání adekvátních výsledků.

I v nejjednodušších studiích se rozhodně vyplatí mít srovnávané soubory věkově, pohlavím a případně i dalšími charakteristikami dobře vyvážené. Design studií začátečníků by měl být také dost jednoduchý, aby odpovídal na několik málo přesně definovaných otázek.

24. Statistika II.

Vladimír Znojil

V kapitole “Statistika I.” bylo uvedeno několik nejjednodušších statistických metod (vesměs neparametrických) a některé poznámky k jejich výběru a konstrukci pokusů. Nemohlo pochopitelně jít o vyčerpávající přehled, ale spíše o ilustraci k jejich pochopení. Tato část se zabývá parametrickými metodami, opět jen v užším výběru skupinou metod, která je odvozena pro normální rozdělení sledovaných hodnot.

Důvodem proč používáme parametrické metody dnes již nebývá snadnější provádění statistických testů (řada statistických programů pracuje spolehlivě s neparametrickými testy), ani jejich vyšší citlivost (někdy dost sporná, například při Laplaceovsky rozdělených datech je neparametrický Mann-Whitneův test asymptoticky optimální) jako spíše možnost získat příslušné vztahy “v číselném vyjádření”. Právě možnost kvantifikace spojená s touto skupinou testů je jejich hlavní výhodou. Popisy odvozené z normálního rozdělení proto často používáme i tehdy, když vlastní testy provedeme neparametricky.

Hustota normálního rozložení je symetrickou křivkou, popsanou vztahem

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} * e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

parametr μ v tomto vztahu udává střední hodnotu (průměr), parametr σ^2 rozptyl (druhou mocninou střední vzdálenosti od průměru).

Je prokázáno, že pokud působí aditivně na měřenou hodnotu mnoho různých malých vlivů a rušivých faktorů, bude mít tato veličina rozdělení blízké normálnímu (Ljapunovova věta). V medicíně (a v biologii) se však bohužel příliš často setkáváme s případy, kdy předpoklad jednoduché aditivity působících faktorů není splněn a proto má většina veličin rozdělení blízké spíše logaritmicko-normálnímu (normální rozdělení nemá samotná veličina ale její logaritmus), někdy se normálnímu rozdělení blíží spíše druhé odmocniny z měřených hodnot (například u systolického i diastolického krevního tlaku). Jak je ale možné posoudit tvar rozdělení a jeho vlastnosti?

Na úvod této části nejprve několik pojmů: *průměr* souboru je součet všech hodnot v souboru dělený jejich počtem. *Medián* je hodnota určená tak, že polovina hodnot v souboru je menších a polovina větších (při lichém počtu prvků je rovna prvku s pořadím $(n + 1) / 2$, při sudém počtu průměru mezi prvky s pořadím $n / 2$ a následujícím. *Modus* je nejčastěji se vyskytující hodnota. Mimo tyto hodnoty se používá pojmu “*geometrický průměr*” pro n-tou odmocninu ze součinu n

hodnot a podobně.

Je zřejmé, že se těmito způsoby určené hodnoty sobě vzájemně nerovnají (jak by tomu při normálním rozdělení mělo být. K optickému posouzení charakteru distribuce pozorovaných hodnot můžeme použít metody *histogramu*: celé rozmezí měřených hodnot si rozdělíme na několik stejných úseků a spočteme počty případů v jednotlivých úsecích (počet úseků by měl při menším počtu měření být velmi zhruba asi odmocninou z počtu hodnot, (histogram z malého počtu údajů, tedy asi 10-20 má ale malou výpovědní hodnotu). Histogram by měl být pěknou symetrickou zvonovitou funkcí, podobnou hustotě pravděpodobnosti normálního rozdělení. Pro posouzení “normality” získaných dat se obvykle používá buď Kolmogorov-Smirnovův test, nebo χ^2 -test; jejich společnou nevýhodou je malá citlivost při malých počtech pokusů. Nás ale ve skutečnosti nezajímá, za se pozorované rozdělení *významně liší* od normálního, ale zda můžeme pozorované rozdělení *považovat* za normální aniž by byl náš další výpočet zatížen *podstatnější metodickou chybou*. K tomu účelu je možné k posouzení normality použít posouzení momentů. Z hodnot x_i si spočteme součty

$$\mu_m = \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - x_0)^m}{n}$$

kde x_0 je průměr hodnot x_i . Hodnotu μ_2 nazýváme *rozptyl*, $\sigma = \sqrt{\mu_2}$ nazýváme *směrodatnou odchylkou*, nebo také *standardní deviací*.

Důležité upozornění: Takto spočtený rozptyl je *vnitřním rozptylem hodnot v rámci měřené řady*. Jako *rozptyl* bývá obvykle uváděn “*vnější*” rozptyl, který je opraven o vliv chyby průměru, spočteme jej stejným způsobem s tím že v uvedeném vzorečku nahradíme počet n upraveným počtem $n-1$ (totéž platí pro *standardní deviaci*).

Pro následující výpočet vyšších momentů použijeme hodnoty n a spočteme normované momenty η_m ze vztahu

$$\eta_m = \frac{\mu^m}{\sigma^m}$$

pro hodnoty $m = 3, 4$

Hodnotu η_3 nazýváme *asymetrií*, η_4 *špičatostí*. Pro normální rozložení je asymetrie rovna 0, špičatost 3. Pro parametrická zpracování by proto měla být asymetrie a špičatost co nejbližší těmto hodnotám - absolutní hodnota asymetrie by měla být menší než 2, pro některé “citlivější” parametrické testy spíše pod 1; špičatost by měla být menší než 4 (hodnoty kolem 1 - 2 obvykle nevadí). Je ovšem jasné, že pro malý počet měřených hodnot (zvláště pokud nevíme, zda bývají normálně rozděleny) je lépe použít metod neparametrických, nebo méně citlivých metod odhadu požadovaných veličin.

Parametrickou analogií Wilcoxonova testu je *Studentův párový t-test*. Při tomto testu si spočteme rozdíly mezi sledovanými hodnotami před a po pokusu u všech pokusných osob:

$$z_i = x_i - y_i$$

pro jednotlivé pokusné osoby. Spočteme průměr hodnot z_i a označíme jej z . Očekávaná chyba průměru je

$$SE = \sqrt{\frac{\mu_2}{n-1}}$$

(při μ_2 počítaném výše uvedeným vzorcem).

Hodnota testovacího kritéria je

$$T = \frac{z}{SE}$$

tedy poměr mezi průměrným rozdílem hodnot a jeho chybou. Výsledek testujeme pomocí t-testu s počtem *stupňů volnosti* $v = n - 1$; tedy počtu měření zmenšeného o 1. Pokud se nad smyslem počtu stupňů volnosti trochu zamyslíte je jasné, že toto číslo udává počet hodnot, z nichž může být příčinná veličina (v tomto případě SE) určena. Jediné měření nám může poskytnout jen velmi hrubý odhad průměru veličiny, o její chybě nevíme nic. K velmi přibližnému určení SE potřebujeme nejméně 2 měření, čím máme měření víc, tím je odhad SE přesnější. Z této úvahy také vyplývá tvar hustoty pravděpodobnosti t-rozdělení: při malých počtech měření je dost vysoká pravděpodobnost chybného odhadu SE, významné je hlavně riziko jeho *podcenění*, proto má toto rozdělení při malém počtu stupňů volnosti výrazná vysoká “křídla” k větším kladným i záporných hodnotám (a poněkud užší maximum než normální rozdělení).

Parametrickou obdobou Mann-Whitneyova testu je *nepárový Studentův t-test*. Při tomto testu se pracuje s průměry hodnot měřené veličiny x a y v jednotlivých skupinách samostatně, spočteme tedy SE_x a SE_y dle počtů pokusů n_x , n_y . K hlavním předpokladům provedení tohoto testu patří nejen normalita distribucí v obou skupinách, musejí mít také přibližně stejné rozptyly a počty měření. Počet stupňů volnosti je v tomto případě dán vztahem

$$v = n_x + n_y - 2$$

a celková hodnota SE je dána vztahem

$$SE = \sqrt{\frac{[(n_x - 1) * n_x * SE_x^2 + (n_y - 1) * n_y * SE_y^2] * (n_x + n_y)}{n_x * n_y * (n_x + n_y - 2)}}$$

pokud lze rozptyly považovat za zcela stejné, případně pokud mají obě skupiny stejný počet měření, lze uvedený vzorec zjednodušit (upravíte dosazením $SE_x = SE_y$ a $n_x = n_y$). Pokud se počet stupňů volnosti (pokusů) mezi skupinami podstatně mezi sebou liší, je nutno použít korekce počtu stupňů volnosti

$$v = \frac{(SE_x^2 + SE_y^2)^2}{\frac{SE_x^4}{n_x - 1} + \frac{SE_y^4}{n_y - 1}}$$

Ze vzorců a z korekce je patrné, že může být výhodné pořídít více měření ve skupině, v níž jsou (z jakýchkoliv důvodů) měření méně přesná. Pro výpočet SE se dost často používá přibližný alternativní vzorec

$$SE = \sqrt{SE_x^2 + SE_y^2}$$

Pokud rozdělení měřených hodnot se od normálního rozdělení velmi liší, není nepárový t-test použitelný.

Protože rozdíly hodnot (i ve skupinách) bývají blíže normálnímu rozdělení než veličiny samotné (důsledek Ljapunovovy věty, viz výše) bývá výhodné sdružit pokusné objekty s kontrolními do dvojic (při složitějším uspořádání pokusu i trojic atd.) tak aby jejich vlastnosti u nichž soudíme, že budou vzhledem ke sledované veličině relevantní (věk, pohlaví, BMI a pod.) byly si co nejpodobnější, a při vyhodnocování pokusu zacházíme s celou dvojicí jako s jediným individuem, můžeme pak použít jednovýběrových postupů. Velmi často tím dosáhneme významnějších výsledků, než při jednodušším provedení experimentu.

Dosti často používanou metodou studia vzájemné závislosti dvou (i více) studovaných veličin je metoda nejmenších čtverců. Tato metoda je z hlediska svých možností mnohem obecnější, než *metody neparametrické korelace*, které jsou nezávislé na matematickém popisu vzájemného vztahu, odpovídající parametrické metody již s předpoklady o kvantitativních vztazích mezi nimi pracují. Nejjednodušším předpokladem vzájemného vztahu měřených veličin je vztah *lineární*, který jde vyjádřit rovnicí

$$y_i = y + a * (x_i - x)$$

v níž jsou x_i a y_i měřené hodnoty a a a b určované koeficienty. Pro určení významnosti vzájemného vztahu a hodnot koeficientů spočteme průměry měřených hodnot x a y a hodnoty jejich momentů μ_2 (pro obě veličiny, dále je proto označíme μ_x a μ_y). Spočteme *smíšený moment* měřených dat ze vztahu

$$\mu_{xz} = \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - x) * (y_i - y)}{n}$$

Korelační koeficient r_{xy} spočteme vztahem

$$r_{xy} = \frac{\mu_{xy}}{\sqrt{\mu_x * \mu_y}}$$

z výše uvedených vzorců lze odvodit, že korelační koeficient může být v uzavřeném intervalu $\langle -1, 1 \rangle$. Pokud má hodnotu nula, vzájemná souvislost mezi veličinami chybí, při kladných hodnotách obě veličiny spolu rostou (nebo klesají), při záporných hodnotách při vzrůstu jedné veličiny druhá klesá; pokud je rovna $-1, 1$ je vazba mezi hodnotami přesně lineární. Korelační koeficient můžeme testovat proti nule, pokud se od nuly významně liší můžeme vzájemnou souvislost mezi měřenými hodnotami považovat za prokázanou (pro testování použijeme tabulky kritických hodnot korelačního koeficientu).

Na rozdíl od neparametrických korelací je tento parametrický test zaměřen na lineární vztah mezi měřenými veličinami, pokud tento vztah není lineární, může být parametrický korelační koeficient v absolutní hodnotě menší, než neparametrický. Pro hodnotu a v uvedeném vztahu platí

$$a = \mu_{xy} \sqrt{\frac{\mu_y}{\mu_x}}$$

Pro strmost sklonu pro vztah x v závislosti na y pak platí též vzorec se výměnou hodnot μ_y a μ_x . Je zřejmé, že strmosti vztahu veličiny y vůči x a x vůči y nejsou vzájemně převrácenými veličinami, jak jsme z popisu lineárních závislostí v matematice zvyklí. Lze pochopitelně také odhadnout chyby těchto hodnot (jsou zhruba úměrné $\sqrt{(1 - r_{xy})^2}$).

Hodnota korelačního koeficientu není příliš citlivá na normalitu výchozích dat, zásadní problémy nastávají při distribucích s “*odlehlymi hodnotami*”, tedy při vysoké špičatosti rozdělení alespoň jedné z korelovaných veličin (na tuto situaci nejsou neparametrické metody příliš citlivé);

rovnoměrné rozdělení hodnot jedné z veličin výsledky téměř neovlivní (lze tedy použít klasického postupu, kdy jednu z veličin nastavujeme (raději na více různých hodnot) a druhou zaznamenáváme (například souvislost mezi dávkou léku a léčebným efektem).

Závěrečná upozornění: Na tomto místě (i když se tato poznámka statistických testů netýká) považujeme za vhodné upozornit na některé další vlastnosti normálně rozdělených veličin.

O tom, že součet i rozdíl dvou normálně rozdělených veličin mají normální rozdělení byla zmínka v úvodu. Tuto vlastnost však normálně rozdělené veličiny při násobení ani dělení nemají (logaritmus výsledku má však normální rozdělení tehdy, když logaritmy násobených/dělených veličin jsou normálně rozdělené). Pokud jsou chyby (rozptyly) měřených veličin malé vůči měřeným hodnotám (asi do 10% až 30%, v souvislosti s požadovanou spolehlivostí výpočtu) není rozdíl mezi normálním a logaritmicko-normálním rozdělením příliš velký a vznikající zkreslení můžeme zanedbat, v opačném případě musíme výpočty provádět s transformovanými daty, v těchto případech je vhodné výsledky takových měření konzultovat. Z tohoto hlediska je velmi problematická především práce s *indexy* (tedy s vyjádřením výsledku poměrem).

25. Enzymové a jiné markery využívané v diagnostice vybraných patologických stavů

Lukáš Pácal

1. Cíl

Srovnání elektroforeogramů izoenzymů laktátdehydrogenázy separovaných v agarózovém gelu ze vzorků normálních a patologických sér.

2. Úvod do problematiky

Laktátdehydrogenáza (LD, EC 1.1.1.27) je cytoplazmatický ubikvitární enzym. Katalyzuje reverzibilní přeměnu laktátu na pyruvát (poslední krok anaerobní glykolýzy). V organismu jsou přítomny dva typy polypeptidových řetězců označovaných jako H (heart) a M (muscle). Každá molekula enzymu je tetramer tvořený jedním nebo oběma typy podjednotek. Různými kombinacemi těchto podjednotek vzniká pět izoenzymů (enzymy, které mají stejnou funkci, ale liší se strukturou; primární izoenzymy vznikají v důsledku rozdílů ve struktuře dvou a více genů, v případě sekundárních izoenzymů je odlišnost způsobena posttranslační modifikací; izoenzymy se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, např. elektroforetickou pohyblivostí): LD1 (H₄), LD2 (H₃M), LD3 (H₂M₂), LD4 (HM₃) a LD5 (M₄). Podjednotky M převládají v izoenzimech LD4 a LD5 vyskytujících se hlavně v tkáních s převahou anaerobního metabolismu (kosterní svalstvo, játra) kde katalyzují přeměnu pyruvátu na laktát. Isoenzymy s převahou podjednotek H (LD1 a LD2) katalyzují přeměnu laktátu na pyruvát ve tkáních s aerobním metabolismem (myokard, mozek, ledviny, erytrocyty).



redukovaný NADH + H⁺ lze dokázat následující reakcí s tetrazoliovou solí



Zvýšené hodnoty LD v plazmě nacházíme u:

1) poškození myokardu

- vzestup izoenzymů LD1 a LD2, např. při akutním infarktu myokardu (LD1/ LD2 větší než jedna, u zdravých osob je poměr menší než jedna)

2) poškození jater

- elevace izoenzymů LD4 a LD5, např. akutní virová hepatitida, cirhóza, otrava organickými rozpouštědly

3) krevních chorob

- hemolytické a megaloblastické anemie

Izoenzymy se liší nábojem, a proto se dají elektroforeticky rozdělit. Izoenzym LD1 se pohybuje nejrychleji směrem k anodě, LD5 naopak ke katodě. Při následné inkubaci v roztoku obsahujícím substrát enzymu (laktát) a barvivo lze vizualizovat jednotlivé izoenzymy, které reagují se substrátem za vzniku NADH a H⁺, který redukuje bezbarvý indikátor NBT na barevný formazan. Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství jednotlivých izoenzymů.

3. Materiál

Skleněná podložní sklíčka (7,6 x 2,6 cm), elektroforetická vana, el. zdroj, termostat, automatická pipeta a špičky, vzorky séra.

Roztoky:

Barbitalový pufr:

Barbitalum solubile	10,3 g
Kyselina dietylbarbiturová	1,84 g
Aqua destillata	ad 1000 ml

Barvicí roztok:

Lithiumlaktát (substrát pro enzym)

Koenzym NAD⁺

Oxidované barvivo tetrazoliová modř (NBT)

Přenašeč elektronů mezi NADH a barvivem (fenazinmethosulfát)

Pufr o pH 8,6 a aktivující ionty

4. Postup

Na očištěnou skleněnou podložní mikroskopickou sklíčku nalijeme na nivelizačním stolku 1 % agarózový roztok a necháme ztuhnout.

Na sklíčka nanášíme analyzované vzorky séra (10 µl) pomocí hrany filtračního papíru a necháme 15 minut difundovat do agarózy. Na každé sklíčko nanášíme 2 vzorky.

Po 15 minutách povrch gelu opláchneme destilovanou vodou a vložíme do elektroforetické aparatury. Sklíčka s gelem spojíme s barbitalovým pufrem pomocí proužků filtračního papíru, uzavřeme aparaturu, spojíme se zdrojem a dělíme za následujících podmínek : U = 200 V, I = cca 32 mA, t = 55 min, T = 10°C.

Po ukončení elektroforetického dělení vložíme sklíčka agarózovou vrstvou dolů do Petriho misek (3 sklíčka/misku) a opatrně podlijeme inkubačním roztokem. Barvíme 45 min při 37°C. Po obarvení vložíme na 30 min do vypírací lázně a poté vysušíme.

Obarvená a vysušená skříčka naskenujeme a analyzujeme pomocí softwaru TotalLab.

5. Závěr

Počítačově zpracované výsledky elektroforetické separace zaznamenáme do protokolu. Popíšeme rozdíly mezi spektrem izoenzymů LD z normálního a patologického séra a interpretujeme je.

26. Hyperlipoproteinemie

Julie Bienertová Vašků

1. Cíl

Prokázat přítomnost/nepřítomnost mutace R395W v genu pro LDL receptor u pokusného subjektu a srovnání výsledku se zdravým kontrolním subjektem a pacientem s familiární hypercholesterolémií.

2. Úvod do problematiky

Primární dyslipidémie jsou vrozené poruchy metabolismu spojené jak s alterovanou hladinou lipoproteinů v plazmě, jejich neobvyklou distribucí a/nebo tvorbou aberantních lipoproteinových molekul.

Poruchy mohou obecně postihovat alfa-lipoproteiny (např. Tangierská choroba, deficit LCAT, deficit Apo A-1, porucha jaterní triacylglycerolové lipázy) nebo beta-lipoproteiny, kde je pak možné dílčí třídění na:

1. poruchy syntézy a sekrece betalipoproteinů
2. výskyt anomálního apoproteinu B
3. poruchy v přeměně betalipoproteinů
4. běžná polygenně determinovaná hypercholesterolémie

Mezi nejčastější poruchy metabolismu betalipoproteinů patří

1. vrozené defekty apoB – předpokládá se u velkého procenta pacientů se šlachovými xantomy, kde se dříve myslelo na poruchu LDL receptoru
2. hypobetalipoproteinémie spojená s modifikovanými apo B – abnormální molekuly Apo B (B-25, B-28, B-37, B-39, B-40, B-46) vedou k nižší stabilitě plazmatických lipoproteinů a nižší plazmatické hladině lipidů
3. familiární hypercholesterolémie – nejčastější primární dyslipidémie, heterozygotní forma má frekvenci cca 1/500, homozygotní forma je mnohem vzácnější - má frekvenci cca 1/10⁶; na pokladě poruchy LDL receptorů dochází ke zvýšené produkci LDL, jejich prodloužené cirkulaci a sníženému vychytávání. To vede u heterozygotů ke 2-3x zvýšené plazmatické hladině LDL cholesterolu oproti zdravým, ICHS se u nich rozvíjí během třetího až čtvrtého decenia. U homozygotů jsou hladiny LDL cholesterolu 6-8 vyšší oproti normě a neléčení pacienti většinou umírají na infarkt myokardu před 20 rokem věku. Podkladem onemocnění jsou mutace v LDL receptoru.
4. polygenní hypercholesterolémie – velmi časté civilizační onemocnění, na geneticky predisponovaném terénu dochází sumací určitých environmentálních vlivů (faktory vnějšího prostředí, zejména faktory životního stylu) k hypercholesterolémii. Je zřetelná nutriční závislost, onemocnění lze výrazně kompenzovat dietou.

Mutace R395W způsobuje záměnu argininu za tyrozin v pozici 395, což je podmíněno substitucí GGG→TGG v 9. exonu genu pro LDL-receptor. Tato mutace ruší restrikční místo pro endonukleázu HpaII, takže normální alela po PCR a restrikci poskytuje fragmenty 137, 56 a 30 bp, zatímco restrikce mutantní alely vede k zisku alel 167 a 56 bp. Uvedená mutace patří mezi asi dvacet nejčastějších mutací v LDL receptoru v české populaci.

3. Materiál, metody

PCR: molekulárně-biologická metoda sloužící k amplifikaci fragmentů DNA o definované délce, což umožňuje získat v krátkém čase velké množství kopií příslušné sekvence a tím představuje východisko pro celou řadu dalších molekulárně-biologických postupů. Metoda má tři fáze: 1. denaturace DNA – oddělování dvou řetězců DNA od sebe, 2. annealing – navázání ohraničujících oligonukleotidů (primerů) a 3. elongace – syntéza očekávaných fragmentů DNA.

Roztoky:

H₂O, reakční pufr obohacený o bovinní sérum albumin (RP+BSA)(10xkoncentrovaný), MgCl₂ (25mM), deoxynukleotid trifosfáty-dNTP (směs dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10mM), primer 70 a 71 (10mM), genomová DNA pacienta heterozygotního pro FH, jedince suspektního z FH a zdravého člověka (asi 50ng/μl), Taq polymeráza (5U/μl).

4. Postup

a) Rozpis přípravy mastermixu pro PCR

	na 1 vzorek (v μl)	na 3 vzorky (v μl)
1. H ₂ O	13,3	40
2. RP+BSA	2,5	7,5
3. MgCl ₂	1	3
4. dNTP	0,5	1,5
5. primer 70	1,25	3,75
6. primer 71	1,25	3,75
7. DNA	5	
8. Taq	0,125	0,38
PCR směs	20	
celkem	25	

Do 3 označených eppendorfek napipetujeme 5μl DNA zkoumaného vzorku (A), pacienta heterozygotního pro FH (B) a DNA zdravého člověka (C). Vypočítané množství roztoků 1-6 pro 3 vzorky uvedené v tabulce napipetujeme do zvláštní eppendorfky, nakonec napipetujeme roztok

8 a dobře pipetou promíchejte. Z této směsi odebereme 20µl a přidáme k jednotlivým vzorkům DNA, vše dobře promícháme.

Eppendorfky s amplifikační směsí vložíme do amplifikátoru a spustíme uložený program reakce:

počet cyklů	denaturace (teplota/čas)	annealing (teplota/čas)	elongace (teplota/čas)
1	95°C/5'	62°C/1'	72°C/1'
35	95°C/1'	62°C/1'	72°C/1'
1	95°C/1'	62°C/1'	72°C/5'

b) Restrikce amplifikovaného produktu příslušnou restriktázou

Roztoky: H₂O, restrikční pufr (10x), HpaII (8U/µl)

Provedení:

Rozpis restrikční směsi:

	1 vzorek (µl)	3 vzorky (µl)
1.H ₂ O	7,3	22
2.restrikční pufr	2	6
3.HpaII (restrikční enzym)	0,7	2,1
4.DNA (amplifikační produkt)	10	
celkem	20	

Do označených eppendorfek (A,B,C) napipetujeme 10µl DNA. Ve zvláštní eppendorfce promícháme roztoky 1-3 a směs rozpipetujeme do eppendorfek s DNA.

Restrikční směs umístíme do termostatu (37°C) na min. 2 hod.

c) Elektroforetická separace produktu

Roztoky: 1xTBE pufr (příprava gelu a elektroforetický pufr), nanášecí pufr (bromfenolová modř: ficol, 1:1), etidium bromid

Provedení:

Příprava 2% gelu: 2g NuSieve agarózy rozvaříme ve 100ml 1xTBE, po zchladnutí na 50⁰C přidáme 10μl etidium bromidu, nalijeme na misku s hřebenem a necháme 30 minut ztuhnout, opatrně vysuneme hřeben a gel umístíme do elektroforetické aparatury s 1xTBE pufrem

Vzorky pro nanášení na gel smícháme s nanášecím pufrem na parafínovém filmu takto: 10μl vzorku+5μl nanášecího pufru, celý objem potom nanese pipetou do komůrek na gelu.

Vzorky pro elektroforézu:

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1) DNA A (zkoumaný vzorek) | po amplifikaci |
| 2) DNA A | po amplifikaci a restrikci |
| 3) DNA B (jedince suspektního z FH) | po amplifikaci |
| 4) DNA B | po amplifikaci a restrikci |
| 5) DNA C (zdravého člověka) | po amplifikaci |
| 6) DNA C | po amplifikaci a restrikci |
| 7) DNA | po kontrolní amplifikaci a restrikci |

Po nanesení všech vzorků připojíme elektroforézu ke zdroji, zdroj nastavíme na 90-100V a necháme asi 30 minut elektroforeticky rozdělit fragmenty DNA (DNA je záporně nabitá, putuje ke kladnému pólu, přičemž se do ní navazuje etidium bromid, který v UV svítí oranžově). Po skončení elektroforézy gel prohlížíme na UV transiluminátoru a výsledek vyfotíme.

4. Výsledky

Popis získaného elektroforeogramu ve vztahu k mutaci R935W v genu pro LDL receptor, popis délky jednotlivých alel.

5. Závěr

Stručně popíšeme princip metody. Zhodnotíme, zda zkoumaný pacient byl/nebyl heterozygotem/homozygotem pro mutaci R395W v genu pro LDL a zdůvodníme proč. Podáme vysvětlení výsledků elektroforézy zaznamenaných na kopii fotografie. Zdůvodníme, proč

heterozygotní pacient má po restrikci daný počet fragmentů DNA ve srovnání se zdravým jedincem a amplifikačním produktem .