

Úloha č.3

STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATASY

Alkalická fosfatasa v séru pochází především z kostní tkáně (osteoblastů) a mikrosomů jaterních buněk, její aktivita v séru stoupá v důsledku nemocí těchto orgánů. Jako jeden z mála enzymů je alkalická fosfatasa vylučována žlučí do trávicího traktu, její zvýšená hladina v séru tedy může indikovat sníženou průchodnost žlučových cest (cholestasis). Aktivita tohoto enzymu se určuje nejčastěji na základě jeho schopnosti štěpit syntetický substrát p-nitrofenylfosfát, produkt p-nitrofenol má intenzivní žluté zbarvení.

Změřte aktivitu alkalické fosfatasy několika níže uvedenými způsoby současně posuďte vliv aktivátoru a inhibitoru.

Reagencie:

roztok 1: 5.5 mM p-nitrofenylfosfát v glycinovém pufru

roztok 2: 5.5 mM p-nitrofenylfosfát + 1 mM $MgSO_4$ v glycinovém pufru

roztok 3: 5.5 mM p-nitrofenylfosfát + 0.1 M KH_2PO_4 v glycinovém pufru

1. *Dvoubodové stanovení*

Postupujte podle následujícího schématu :

| | vzorek | blank |
|-----------------------------|--------|-------|
| roztok substrátu (roztok 1) | 1 ml | 1 ml |
| sérum | 0.1 ml | - |

inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě

| | | |
|-------------|-------|--------|
| 0.02 M NaOH | 10 ml | 10 ml |
| sérum | - | 0.1 ml |

Po promíchání změřte absorbanci proti blanku při 400 nm.

Současně proveďte s aktivátorem - Mg^{2+} -ionty (roztok 2) a inhibitorem - fosfátem (roztok 3). Vypočtete aktivitu alkalické fosfatasy v kataltech, jestliže extinkční koeficient $\epsilon = 18.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Posuďte vliv inhibitoru a aktivátoru.

Jako vzorek použijte kontrolní sérum EXA E nebo Precinorm E.

2. *Kinetické stanovení*

Kinetická stanovení ALP proveďte setem fy Lachema Alkalická fosfatasa mikro, při použití vlnové délky 420 nm. Stanovení proveďte opět s kontrolním sérem a neznámým vzorkem (2x).

STANOVENÍ CHOLESTEROLU

Cholesterol představuje jednu z nejdůležitějších složek lipidů krevního séra. Největší diagnostický význam má skutečnost, že zvýšená hladina cholesterolu je důležitým rizikovým faktorem pro vznik arteriosklerozy. V případě hypercholesterolemie se častěji setkáváme se srdeční nedostatečností a infarkty myokardu. Změny v koncentracích cholesterolu a dalších lipidů v krevním séru doprovázející různé patologické stavy organismu shrnuje následující tabulka:

| | celkové lipidy | triacyl-glyceroly a mastné kys. | cholesterol | fosfolipidy |
|----------------------------|----------------|------------------------------------|-------------|-------------|
| hypothyroidismus | | N | ++ | + |
| diabetes mellitus | + | ++ | + | + |
| nefrotický syndrom | + | + | + | + |
| chronická pankreatitida | + | ++ | + | + |
| alkoholismus | + | | + | |
| obstrukční poškození jater | + | N | ++ | ++ |
| akutní virová hepatitida | | | + | + |
| Aterosklerosa | + | ++ | ++ | + |

Do pořadí zájmu vstoupilo vyšetřování cholesterolu v lipoproteinových frakcích, zejména HDL a LDL. Protože hladina cholesterolu je ovšem také výrazem hladiny lipoproteinů a obě uvedené frakce jsou cholesterolem bohaté, může cholesterol svědčit o poruše metabolismu lipoproteinů (HDL transportují cholesterol do jater a tím umožňují jeho odbourávání. Nízká hodnota cholesterolu v HDL je nepříznivým prognostickým znamením; ukazuje zvýšenou možnost srdečního infarktu).

K nízké hladině cholesterolu v HDL se zpravidla druží vysoká hodnota cholesterolu v LDL a naopak. U zdravých lidí ve věku 18 - 35 let je průměrně 29.3 % cholesterolu v HDL, u lidí po infarktu bylo nalezeno jen 14.1 % cholesterolu v HDL.

Úkoly:

Stanovte koncentraci triacylglycerolů v kontrolním séru REPROCHOL setem fy Sera-Pak; celkovou hladinu cholesterolu setem fy. Lachema a Chemelex a její frakci obsaženou v HDL setem HDL Cholesterol fy Chemelex.