

ÚLOHA Č.3 – STANOVENÍ NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK

STANOVENÍ GLUKOSY

Stanovení glukosy v krevním séru či plasmě má velký význam při diagnostice diabetu.

A) Stanovení proveďte setem Glukosa fy Reanal, a to bez deproteinace. Popište mechanismus provedeného stanovení.

Na enzymové metodě stanovení glukosy lze dokumentovat negativní interferenci kys. askorbové. Při enzymovém stanovení glukosy k pokusu nasad'te blank, standard, vzorek séra a vzorek séra s 50 μ l kys. askorbové. Vysvětlete vliv kys. askorbové.

B) Stanovení koncentrace glukosy ve vlastní kapilární krvi pomocí osobního glukometru.

C) Za použití enzymového analyzátoru stanovte obsah glukosy ve vzorcích séra a vlastní kapilární krvi.

STANOVENÍ GLUKOSY ZA POUŽITÍ ENZYMOVÉHO ANALYZÁTORU ECA 20

Ke stanovení se používají vzorky krve n. krevního séra ředěné v poměru 1:50 (20 μ l + 1 ml tlumivého roztoku).

Příprava měření:

1. Připravte standardní roztok glukosy (ředění zásobního roztoku 1:50). Do eppendorfky odlijte 1.5 ml a vložte do kruhového stojanu přístroje do fialové pozice (pozice označené čarou resp. fialové jamky jsou určeny pro standardní roztoky).

2. Nařed'te do mikrozkušavek připravené vzorky krevního séra výše uvedeným způsobem a vložte do stojanu za standard. Totéž proveďte s kontrolním sérem Exa. Stanovení proveďte v tripletech.

3. Stanovte koncentraci glukosy ve vlastní kapilární krvi. Připravte si mikrozkušavku s 1 ml tlumivého roztoku. Z kapky krve odpipetujte přímo do mikropipety 20 μ l krve a dokonale vypláchněte v nachystaném roztoku. Po promíchání vložte do stojanu.

Přístroj uvedete do provozu přeprnutím tlačítka ze STAND-BY polohy do polohy +. Po stabilizaci přístroje se vlastní měření spouští zmáčknutím tlačítka START/STOP.

STANOVENÍ DUSÍKATÝCH METABOLITŮ V SÉRU – KREATININ

Hlavní dusíkaté odpadní produkty, které se vyskytují v krevním séru, jsou močovina, kreatinin a kyselina močová. Tyto látky vznikají jako konečné produkty metabolismu aminokyselin a nukleových kyselin.

Množství močoviny v séru je závislé na množství odbouraných bílkovin a na vylučovací funkci ledvin. Většina zdravých lidí má koncentraci močoviny v séru v rozmezí 3-8 mmol/l. Tato koncentrace je odrazem složení stravy (příjem bílkovin), a pokud nejsou porušeny funkce jater nebo ledvin, i odrazem katabolismu bílkovin. Zvýšené hladiny se objevují zejména při ledvinových poruchách, otravách, zvýšeném přísunu bílkovin atd., snížené jsou např. při akutním selhání jater.

Množství kreatininu vytvořené v organismu je na rozdíl od močoviny jen velmi málo závislé na přísunu proteinů, kreatinin je produktem metabolismu svalových buněk. Jeho hladina v séru je poměrně konstantní a závislá na množství svalové hmoty organismu, je ovlivňována svalovou prací. Stále hodnoty kreatininu v séru se využívá pro ověření vylučovací funkce ledvin – tzv. ledvinové (kreatininové) clearance. Zvýšené hodnoty kreatininu se objevují zejména při poruchách funkce ledvin, snížení např. při svalové dystrofii.

Obsah kys. močové, která je konečným produktem metabolismu purinů se zvyšuje při nadměrném rozpadu buněk (pneumonie, leukemie, anemie atd.), v těhotenství, při hladovění atd. Při ledvinové nedostatečnosti se její hladina rovněž zvyšuje, ale pomaleji než hladina močoviny a kreatininu.

Úkol:

Sety fy Reanal stanovte koncentraci kreatininu v neznámém vzorku séra, ve dvou vzorcích moči a v kontrolním séru. Vyhodnoťte funkci ledvin na základě kreatininové clearance při denní produkci moči 1.5 litru.

HEMOGLOBIN A JEHO DERIVÁTY

Základní typy hemoglobinů nacházejících se v krevním řečišti oxyhemoglobin HbO_2 a jeho deoxygenovaná forma deoxyhemoglobin – deoxyHb se liší svými absorpčními spektry v oblasti 500 - 600 nm. HbO_2 vykazuje dvě výrazná absorpční maxima při 541 a 576 nm, zatímco deoxyHb v této oblasti pouze jediný široký absorpční pás (555 nm).

Dalším modifikovaným hemoglobinem v krvi je toxický karboxylhemoglobin (karboxyHb, HbCO). CO se fyziologicky v malém množství tvoří odbouráváním bilirubinu, vyšší koncentrace v inhalovaném vzduchu způsobují otravu. Afinita hemoglobinu k CO je 218 krát vyšší než ke kyslíku (při koncentraci 0.1 % CO v inhalovaném vzduchu je přes 50 % hemoglobinu zablockováno). Ačkoli CO "reaguje" s hemoglobinem podstatně pomaleji než kyslík, vzniklá jednotka je velmi stálá a CO se z molekuly uvolňuje 10 000 krát pomaleji než kyslík.

Absorpční spektrum HbCO je velmi podobné spektru oxyhemoglobinu (maxima 539 a 568 nm). Rozlišení obou spekter lze docílit přidáním redukčního činidla, který vyčerpá z roztoku kyslík a HbO_2 přejde na deoxyHb. Absorpční spektrum HbCO se nemění.

Methemoglobin (metHb) je oxidovaná forma hemoglobinu (oxy- či deoxy-), ve které je Fe^{2+} oxidováno na Fe^{3+} . MetHb není schopen reverzibilně vázat kyslík a není schopen ho ani transportovat. Fyziologicky vzniká autooxidací hemoglobinu, jeho koncentrace v krvi je však nižší než 1 %. Ve vysokých koncentracích vede k cyanóze.

Princip stanovení hemoglobinu v krvi

Z hemoglobinu se reakcí s KCN v přítomnosti $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ připraví stabilní derivát kyano-methemoglobin, který vykazuje ve viditelné oblasti jediné absorpční maximum při 540 nm, $\epsilon = 11\,000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Příprava hemolyzované krve

Do Eppendorfy odpipetujte 0.5 ml nesrážlivé krve a zcentrifugujte (5 min). Krevní plasmu odlijte a buňky promyjte fyziologickým roztokem. Opět zcentrifugujte. K sedimentovaným buňkám přidejte 1 ml destilované vody a intenzivně protřepejte a zcentrifugujte.

Do dvou zábrusných zkumavek se 2 ml vody pipetujte vždy 250 μl supernatantu. První poslouží jako HbO_2 , z druhé připravíte HbCO.

B. Příprava karboxylhemoglobinu

COHb připravte těsně před měřením spekter.

CO se připraví rozkladem kys. mravenčí kyselinou sírovou. Do odsávací nádoby nalijte 30 ml kys. mravenčí, opatrně připusťte 50 ml konc. kys. sírové, případně opatrně krouživým pohybem promíchejte. Vyvíjejícím se plynem opatrně probublávejte jednu ze zkumavek. Pozorujte ztmavnutí hemolyzované krve.

Ostatní formy hemoglobinu

K oxidaci hemoglobinu na **metHb** použijete $K_3[Fe(CN)_6]$, k přípravě **deoxyHb** dithioničitan sodný.

C. Měření spekter

Přímo do měřicí kyvety pipetujte 2 ml dest. vody + definované množství hemolyz. krve (cca 200 μ l). Jednotlivá spektra proměřte v rozmezí 500 - 600 nm.

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 1. HbO ₂ | 4. HbCO |
| 2. + dithioničitan | 5. + dithioničitan |
| 3. + $K_3[Fe(CN)_6]$ + KCN (jed!) | 6. + $K_3[Fe(CN)_6]$ + KCN |