

Uživatel:Tpmirchi/Biochemie

Postup

Většinu stanovujeme tak, že analyt + něco nám dá barevný komplex, jehož absorbanci stanovujeme. Koncentraci analytu získáme de facto trojčlenkou – koncentrace standardu (znáte)/absorbance standardu (změříte) = koncentrace analytu (neznáte)/absorbance standardu (změříte)

Nezapomeňte, že absorbance se vždy měří proti něčemu – blanku aka slepému vzorku :)

Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi

- Oxidace hemoglobinu na methemoglobin:
 - $\text{HbFe}^{\text{II}} + [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-} \rightarrow \text{HbFe}^{\text{III}} + [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$
- Přeměna methemoglobinu na kyanmethemoglobin:
 - $\text{HbFe}^{\text{III}} + \text{CN}^- \rightarrow \text{HbFe}^{\text{II}}\text{CN}$

Oxidace dvojmocného železa v hemoglobinu hexakynoželezitanem draselným na trojmocné železo. Vzniklý methemoglobin se s kyanidem draselným přemění na stálý kyanmethemoglobin s jediným širokým absorpčním maximem ve viditelné oblasti při 540 nm. Stanovení fotometricky.

Hodnocení

Referenční rozmezí pro dospělého muže je 130–180 g/l a pro ženu 120–160 g/l.

↑ Dehydratace

↓ Anemie

Stanovení koncentrace celkové bílkoviny v séru.

Stanovujeme **biuretovou reakcí**. V alkalickém prostředí v přítomnosti měďnatých solí vytváří bílkoviny komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb - fialové zbarvení → fotometrické stanovení v oblasti 540–560 nm.

Hodnocení

Referenční rozmezí: Koncentrace celkové bílkoviny v séru (S-celková bílkovina): 65–85 g/l

↑ Dehydratace

↓ Selhání jater

Stanovení koncentrace celkového bilirubinu v séru.

Azokopulační reakce s diazoniovou solí, nejčastěji diazotovanou kyselinou sulfanilovou.

- Ta vzniká **van den Berghovou diazoreakcí** - reakcí kyseliny sulfanilové s dusitanem sodným v HCl
- část bilirubinu, tzv. nepřímý, je nekovalentně navázán na albumin, k jeho uvolnění se přidává do reakce akcelerátor (alkoholy, benzoan sodný, kofein...)
- Přímý (ten co nepotřebuje akcelerátor) i nepřímý bilirubin reaguje s diazoniovými solemi za vzniku intenzivně zbarvených azosloučenin, které stanovujeme fotometricky.

Hodnocení

Koncentrace celkového bilirubinu v séru (fS - celkový bilirubin): do 17 $\mu\text{mol/l}$

↑ ikterus - prehepatální, hepatální nebo posthepatální

Stanovení koncentrace triacylglycerolů v séru.

Několik po sobě jdoucích enzymových reakcí:

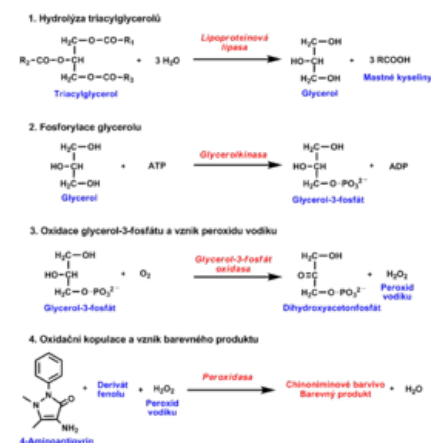
- Lipoproteinová lipáza katalyzuje hydrolýzu triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny.
- Uvolněný glycerol se převádí působením glycerolkinázy v přítomnosti ATP na glycerol-3-fosfát, který je pomocí glycerol-3-fosfát oxidázy oxidován na dihydroxyacetonfosfát.
- Současně vzniklý peroxid vodíku je využíván v další reakci katalyzované peroxidázou k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu s derivátem fenolu. Vzniká chinoniminové barvivo, jehož absorbance se odečítá.

Hodnocení

Koncentrace triacylglycerolů v séru (fS-triacylglyceroly): 0,45–1,7 mmol/l

↑ Životní styl

↓ Nebývá - malnutrice?



Stanovení triacylglycerolů

Stanovení koncentrace celkového cholesterolu v séru.

Několik enzymových reakcí:

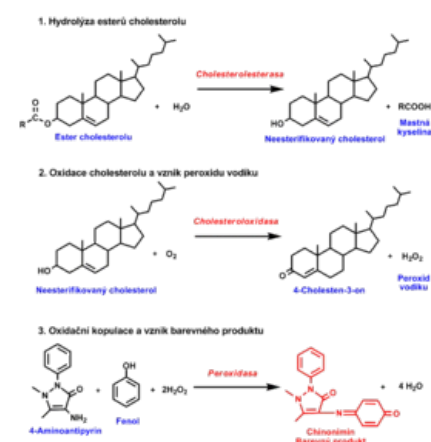
- vlastnímu stanovení celkového cholesterolu předchází hydrolýza esterů cholesterolu na volný cholesterol a mastné kyseliny pomocí enzymu cholesterolesterázy (CE).
- Následuje oxidace neesterifikovaného cholesterolu na 4-cholesten-3-on za současného vzniku peroxidu vodíku v reakci katalyzované cholesteroloxidázou (CHOD).
- Poslední reakce využívá peroxidu vodíku k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu a fenolu v přítomnosti dalšího enzymu peroxidázy (POD). Vzniká barevný produkt, jehož absorbance je úměrná množství cholesterolu

Hodnocení

Koncentrace celkového cholesterolu v séru (S-cholesterol celkový): 2,9–5,0 mmol/l

↑ Životní styl, diabetici, hypothyreóza - vysoký představuje riziko kardiovaskulárních onemocnění

↓ Malnutrice, hyperthyreóza



Stanovení celkového cholesterolu

Stanovení koncentrace močoviny v séru.

- Při **nepřímém stanovení** je močovina nejprve působením enzymu **ureasy** katalyticky rozštěpena na oxid uhličitý a amoniak, který ve vodném prostředí přechází na amonný ion.
- Doporučená rutinní metoda využívá pro stanovení amonných iontů vzniklých v ureasové reakci přeměnu α -ketoglutarátu na glutamát. Reakce je katalyzována **glutamátdehydrogenasou**, která je spřažena s oxidací NADH na NAD⁺ (Warburgův optický test).

Schéma reakce zde:

Reakce katalyzovaná ureázou:
 $\text{Močovina} + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_2$

Reakce katalyzovaná glutamátdehydrogenázou:
 $2 \text{NH}_4^+ + 2\text{-oxoglutarát} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{L-glutamát} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$

Warburgův optický test zde.

Hodnocení

Sérová koncentrace (S-urea): 1,7–8,3 mmol/l

↑ hypoperfuze ledvin

↓ nízký příjem bílkovin

Stanovení koncentrace kyseliny močové v séru.

- **Nepřímé stanovení:** enzym **urikasa**, který přeměňuje kyselinu močovou na allantoin, **peroxid vodíku** a oxid uhličitý.
- Vzniklý peroxid vstupuje do spřažené reakce, katalyzované peroxidasou, při ní oxidační kopulací 4-aminoantipyrinu s derivátem fenolu vznikne chinoniminové barvivo, jehož intenzita zbarvení je úměrná koncentraci kyseliny močové ve vzorku.

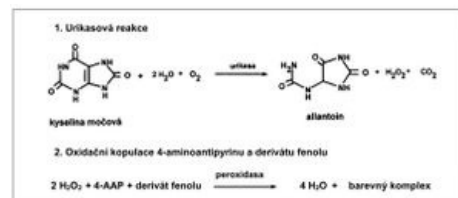
(Při stanovení ruší kyselina askorbová. Proto je askorbát oxidasa v reakční směsi.)

Hodnocení

Koncentrace kyseliny močové v séru (fS-kyselina močová): ženy 120–340 μmol/l, muži 120–420 μmol/l

↑ vyšší příjem purinů ve stravě (maso, vnitřnosti, luštěniny), alkoholi, nižší odpad ledvinami

↓ nízký příjem purinů v potravě



Stanovení kyseliny močové

Stanovení koncentrace glukózy v séru enzymaticky.

- enzym **glukózaoxidáza** katalyzuje oxidaci glukózy vzdušným kyslíkem za vzniku kyseliny glukonové, která přechází ve vnitřní ester glukonolakton. Jako vedlejší produkt glukózaoxidázové reakce vzniká **peroxidu vodíku**
- V reakci katalyzované **peroxidázou** reaguje vznikající peroxid vodíku s 4-aminoantipyrinem, který se oxidaže na reaktivní meziprodukt, a ten s další látkou kopuluje na stálé rozpustné barvivo jehož absorbance se měří.

Hodnocení

3,9–5,6 mmol/l nalačno a po jídle nižší než 10 mmol/l

↑ Diabetes

↓ 3 hodiny praktik chemie bez svačiny

Stanovení koncentrace vápníku v séru.

Spektrofotometrické měření **barevných komplexů**, které vznikají reakcí komplexotvorných látek s kalcium. Např. o-kresoltalexon v alkalickém prostředí s vápenatými ionty poskytuje fialově zbarvený komplex, jehož intenzita zbarvení je úměrná koncentraci vápenatých iontů. Používá se též arsenaso-III

Hodnocení

Sérové kalcium: **2,25-2,75** mmol/l

Vyšší nebo nižší hodnoty mohou být důsledkem dysproteinémie.

Stanovení koncentrace železa v séru.

Reakce železa s komplexotvornou látkou.

- Uvolnění Fe^{3+} z vazby na transferin pomocí kyselin, např. HCl
- Redukce Fe^{3+} na Fe^{2+} kyselinou askorbovou
- Reakce Fe^{2+} s komplexotvorným činidlem (**ferrozin**) obsahujícím reaktivní skupiny $-\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{N}-$ za vzniku barevného komplexu

Hodnocení

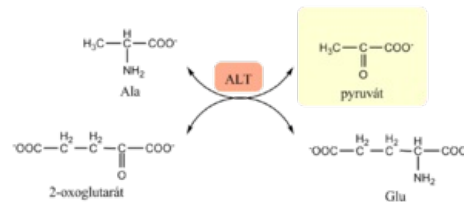
muži: 9–29 μmol/l
ženy: 7–28 μmol/l

↑ hemochromatóza, hemolýza

↓ krevní ztráty, narušená absorpce

Stanovení katalytické koncentrace ALT v séru.

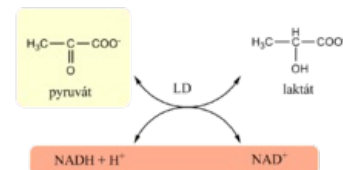
- Podobně jako v případě AST vyžaduje pracovní postup 5-15 minutovou preinkubaci séra v reakční směsi bez 2-oxoglutarátu. Reakce je startována 2-oxoglutarátem.
- ALT katalyzuje reakci alaninu na pyruvát.
- Přidáním NADH a laktátdehydrogenázy se pyruvát redukuje na laktát. Redukce je provázána úbytkem NADH, což se projeví poklesem absorbance při 334, 340 nebo 365nm. Katalytická koncentrace ALT je úměrná poklesu absorbance.



Hodnocení

muži do 0,8 a ženy do 0,6 ukat/l (pamatujte si že pod 1)

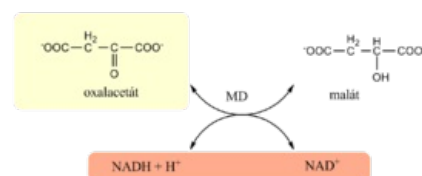
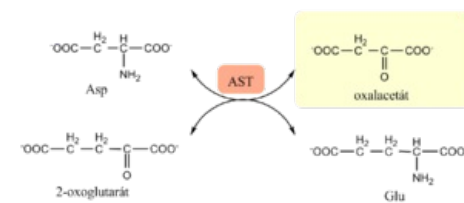
Zvýšené hodnoty odráží poškození jaterních buněk.



Stanovení katalytické koncentrace ALT. LD - laktátdehydrogenáza

Stanovení katalytické koncentrace AST v séru.

- AST katalyzuje reakci, při které se tvoří oxalacetát
- Vzniklý oxalacetát je malátdehydrogenázou redukován na malát za současné oxidace NADH na NAD+. Aktivitu AST stanovíme kineticky na základě rychlosti úbytku NADH v průběhu reakce měřením absorbance při 334, 340 nebo 365nm. Katalytická koncentrace AST je úměrná poklesu absorbance.
- Reakce startuje po preinkubaci přidáním 2-oxoglutarátu a po krátké lag fázi monitorujeme změnu absorbance několik minut v minutových intervalech. Protože počáteční absorbance reakční směsi má vyšší hodnotu, doporučuje se provádět odečet proti slepé zkoušce, kterou může být např. roztok dvojchromanu draselného.



Stanovení katalytické koncentrace AST. MD - malátdehydrogenáza

Hodnocení

muži do 0,85 μ kat/l, ženy do 0,60 μ kat/l (pamatujte si že pod 1)

Zvýšené hodnoty odráží poškození jaterních buněk ale také buněk myokardu, kosterních svalů apod.

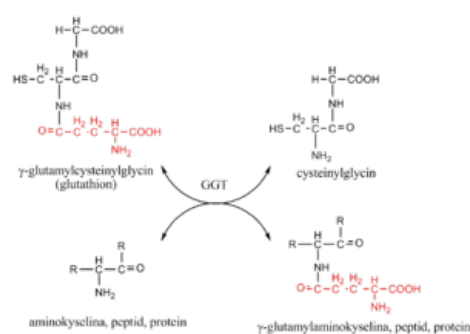
Stanovení katalytické koncentrace γ -glutamyltransferázy v séru.

Stanovení kopíruje reakci, kterou GGT katalyzuje v organismu: přenos γ -glutamylového zbytku ze substrátu (L- γ -glutamyl-p-nitroanilid nebo L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid) na akceptor glycyglycin. V průběhu reakce se po přenosu γ -glutamylového zbytku na akceptor uvolňuje barevný p-nitroanilin (ze substrátu L- γ -glutamyl-p-nitroanilidu) nebo 5-amino-2-nitrobenzoát (ze substrátu L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu), jejichž přírůstek je přímo úměrný aktivitě GGT ve vyšetřovaném vzorku.

Hodnocení

Fyziologické hodnoty fS-GGT: muži 0,14–0,84 μ kat/l, ženy 0,14–0,68 μ kat/l (pamatujte si, že pod 1)

Zvýšené GGT značí obstrukci ve žlučových cestách a zvýšené je rovněž při abusu alkoholu



Reakce katalyzovaná GGT

Stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatázy v séru.

Principem reakce je katalýza štěpení 4-nitrofenylfosfátu na 4-nitrofenol a fosforečnan, kdy sledujeme nárůst absorbance na spektrofotometru při 405nm v několika minutových intervalech, která je přímo úměrná příbytku množství 4-nitrofenolu a tudíž přímo úměrná aktivitě ALP.

Hodnocení

muži 0,7–2,1 μ kat/l a ženy 0,9–2,2 μ kat/l

Stejně jako GGT je ALP marker cholestázy. Zvýšená je také u některých kostních chorob

Spektrofotometrie mozkomíšního moku.

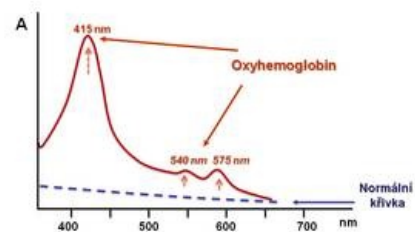
obsáhleji v originálním návodu zde (<https://el.lf1.cuni.cz/p92772110/>)

Spektrofotometrie mozkomíšního moku ve viditelné části spektra (370-600nm) umožňuje rozlišit na základě rozdílných absorpčních maxim:

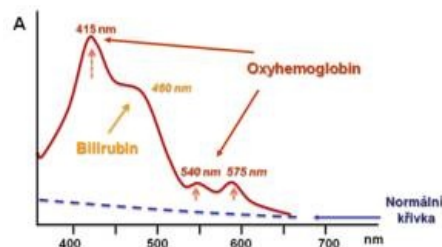
- oxyhemoglobin (při 415nm)
- methemoglobin (při 405nm)
- bilirubin (při 420-460nm)

Hodnocení

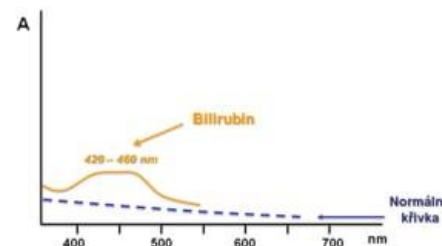
- **Fyziologicky** - plochá nebo mírně klesající křivka
- **Oxyhemoglobin**
 - Absorpční maximum při 415nm a dva menší vrcholy při 540 a 575nm
 - čerstvé subarachnoidální krvácení
- **Methemoglobin**
 - Maximum při 415nm se posouvá směrem ke kratším vlnovým délkám s maximem při 406nm. Nalézáme ho jako součást sumačních křivek, kde se absorbance jednotlivých pigmentů překrývají. Dá se však prokázat přidavkem KCN do vzorku. Pokud je přítomen methemoglobin, vznikne kyanmethemoglobin s absorpčním maximem v oblasti 419nm; v případě, že se nevyskytuje, ke změně nedojde.
 - Znamka starších změn hemoglobinu
- **Bilirubin**
 - Absorbční maximum při 460nm, konjugovaný bilirubin má max v oblasti 420nm
 - Starší krvácení do likvorových cest



Spektrofotometrická křivka oxyhemoglobinu



Spektrofotometrická sumační křivka



Spektrofotometrická křivka bilirubinu