

OBSAH

	TEORETICKÉ PRINCIPY LABORATORNÍCH METOD	15
1.	ZÁKLADY LABORATORNÍCH TECHNIK	17
1.1	ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	17
1.1.1	Odběr krve	17
1.1.2	Odběr moči	18
1.2	ÚPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	18
1.2.1	Homogenizace a mletí	18
1.2.2	Extrakce	19
1.2.3	Vysolování	20
1.3	CENTRIFUGACE	20
1.4	VÁŽENÍ	22
1.5	MĚŘENÍ OBJEMU KAPALIN	23
1.5.1	Pipetování	27
1.6	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	30
1.7	MÍCHÁNÍ	30
1.8	OHŘEV	31
1.9	SUŠENÍ	31
1.10	ZAŘÍZENÍ CHEMICKÉ LABORATOŘE	32
1.10.1	Materiálové vybavení laboratoře	32
1.10.1.1	Pomůcky ze skla	32
1.10.1.2	Pomůcky z porcelánu	32
1.10.1.3	Pomůcky z gumy a plastu	32
1.10.1.4	Jiné pomůcky	32
1.10.2	Přístrojové vybavení	32
1.11	CHEMIKÁLIE	33
1.11.1	Kvalita chemikálií	33
1.11.2	Toxicita chemikálií	33
1.11.3	Komerční soupravy a jejich využití	35
2.	FUNKCE JEDNÉ REÁLNÉ PROMĚNNÉ	36
2.1	FUNKCE	36
2.2	LINEÁRNÍ FUNKCE	36
2.3	KVADRATICKÁ FUNKCE	37
2.4	HYPERBOLA	38
2.5	EXTRÉMY FUNKCÍ	39
2.6	EXPONENCIÁLNÍ A LOGARITMICKÉ FUNKCE	40
2.6.1	Exponenciální funkce	40
2.6.2	Logaritmická funkce	41
2.6.2.1	Pravidla pro výpočet logaritmů	42

3.	VYJADŘOVÁNÍ SLOŽENÍ SMĚSÍ	44
3.1	HMOTNOSTNÍ ZLOMEK	44
3.2	OBJEMOVÝ ZLOMEK	45
3.3	HMOTNOSTNÍ KONCENTRACE	45
3.4	LÁTKOVÁ KONCENTRACE	46
3.5	ŘEDĚNÍ	48
3.5.1	Hmotnostní zlomek	48
3.5.2	Koncentrace látkového množství	49
3.6	KALIBRAČNÍ KŘIVKA A VÝPOČTY VE SPEKTROFOTOMETRII	50
4.	CHEMICKÉ ROVNOVÁHY	54
4.1	HMOTNOSTNÍ A NÁBOJOVÁ BILANCE	54
4.1.1	Hmotnostní bilance	54
4.1.2	Nábojová bilance	55
4.2	ACIDOBAZICKÉ ROVNOVÁHY	56
4.2.1	Disociační konstanta	56
4.2.2	Iontový součin vody a vodíkový exponent	57
4.2.3	Obecné vztahy mezi složkami v roztocích kyselin a zásad	58
4.2.4	Výpočet pH roztoků silných jednosytných kyselin a zásad	60
4.2.5	Výpočet pH roztoků slabých jednosytných kyselin a zásad	61
4.2.6	Hydrolýza solí	63
4.2.7	Distribuční diagram	66
4.2.8	Pufrační systémy	68
4.2.9	Pufrační kapacita	71
4.2.10	Polyprotické systémy	73
4.3	REDOXNÍ ROVNOVÁHY	75
4.3.1	Podmíněný potenciál $E^{\circ'}$	76
4.4	SRÁŽECÍ ROVNOVÁHY	78
4.4.1	Etylenglykol a močové konkrementy	79
4.4.2	Toxicita sulfidu kademnatého	82
4.5	KOMPLEXOTVORNÉ ROVNOVÁHY	84
5.	ANALYTICKÉ METODY	86
5.1	OPTICKÉ ANALYTICKÉ METODY	86
5.1.1	Ultrafialová a viditelná spektrometrie (UV – VIS)	87
5.1.1.1	Metody a instrumentace	90
5.1.1.2	Analytické využití	91
5.2	CHROMATOGRRAFIE	91
5.2.1	Plynová chromatografie	92
5.2.2	Kapalinová chromatografie a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)	96
5.2.3	Tenkovrstvá chromatografie	98
5.3	ODMĚRNÁ ANALÝZA	99
5.3.1	Provedení titrací	100

5.3.2	Druhy titrací.....	100
5.3.3	Indikace bodu ekvivalence.....	101
5.3.4	Acidobazické titrace.....	101
5.3.5	Chemická indikace bodu ekvivalence.....	102
5.3.5.1	Volba indikátoru.....	103
5.3.6	Indikace bodu ekvivalence instrumentálními metodami.....	103
5.3.7	Titrační křivky acidobazických titrací a titrace polyprotických systémů .	104
5.3.8	Výpočet koncentrace stanovované látky při acidimetrických titracích .	107
5.4	POTENCIOMETRIE.....	108
5.4.1	Druhy elektrod.....	108
5.4.1.1	Skleněná elektroda.....	109
5.4.2	Analytické využití potenciometrie.....	110
5.5	IMUNOCHEMICKÉ METODY.....	110
5.5.1	Kvalitativní imunoprecipitační křivka.....	111
5.5.2	Imunoprecipitační metody.....	111
5.5.3	Imunoprecipitační reakce v gelu.....	111
5.5.3.1	Jednoduchá radiální imunodifúze dle Manciniové.....	112
5.5.3.2	Elektroimunodifúze.....	112
5.5.3.3	Dvojitá radiální imunodifúze dle Ouchterlonyho.....	113
5.5.3.4	Imunoelektroforéza.....	113
5.5.4	Imunoprecipitační reakce v roztoku.....	114
5.5.5	Imunometody s markery.....	115
5.5.5.1	Enzymová imunoanalýza.....	115
5.5.5.2	Radioimunoanalýza.....	116
5.5.5.3	Fluorescenční imunoanalýza.....	117
5.5.5.4	Luminiscenční metody.....	117
5.5.6	Další imunochemické techniky.....	118
5.6	ELEKTROMIGRAČNÍ METODY.....	119
5.6.1	Dělení elektroforetických metod.....	119
5.6.1.1	Dle efektivity pohyblivosti separované látky.....	119
5.6.1.2	Dle plošného uspořádání gelu.....	121
5.6.1.3	Dle povahy gelu.....	122
5.6.2	Vyhodnocení elektroforézy.....	124
5.6.2.1	Detekce.....	124
5.6.2.2	Sušení a uchovávání gelů.....	124
5.6.2.3	Vyhodnocování pomocí denzitometru.....	125
5.6.3	Praktické využití elektroforetických metod.....	125

	NÁVODY K PRAKTICKÝM CVIČENÍM	127
1.	ZOLLINGER-ELLISONŮV SYNDROM	128
1.1	PRACOVNÍ POSTUP ANALÝZY.....	129
1.1.1	Standardizace odměrného roztoku hydroxidu sodného na kyselinu šťávelovou.....	129
1.1.1.1	Stanovení vylučování kyseliny chlorovodíkové.....	131
1.2	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	132
1.2.1	Standardizace odměrného roztoku NaOH	132
1.2.2	Výpočet hodnot BVK a MVK.....	133
2.	STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY A MICHAELISOVY KONSTANTY LDH V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU	135
2.1	LAKTÁTDEHYDROGENÁZA: KLINIKA A METABOLIZMUS.....	135
2.2	OBECNÉ PRINCIPY IZOLACE PROTEINŮ	138
2.2.1	Homogenizace.....	138
2.2.2	Extrakce.....	138
2.2.3	Precipitace	138
2.2.4	Centrifugace.....	138
2.3	IZOLACE LAKTÁTDEHYDROGENÁZY ZE SRDEČNÍHO SVALU.....	139
2.4	STANOVENÍ KATALYTICKÉ AKTIVITY A MICHAELISOVY KONSTANTY LDH PRO LAKTÁT	140
2.4.1	Příprava vzorku pro stanovení aktivity a Michaelisovy konstanty LDH pro laktát.....	140
2.5	ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH EXPERIMENTÁLNÍCH DAT.....	141
2.5.1	Stanovení aktivity LDH	141
2.5.2	Stanovení Michaelisovy konstanty LDH pro laktát	141
3.	ANALÝZA VYBRANÝCH PARAMETRŮ LIPIDOVÉHO METABOLIZMU	143
3.1	LIPIDOVÝ METABOLIZMUS	143
3.2	PŘÍPRAVA VZORKU K ANALÝZE	145
3.2.1	Stanovení hladiny celkového cholesterolu	146
3.2.2	Stanovení hladiny HDL cholesterolu.....	146
3.2.3	Stanovení hladiny triacylglycerolů.....	148
3.2.4	Stanovení hladiny LDL cholesterolu	149
3.3	ELEKTROFORÉZA LIPOPROTEINŮ	150
3.3.1	Agarózový gel	150
3.3.2	Příprava a aplikace vzorku	150
3.3.3	Příprava a provedení elektroforézy.....	150
3.3.4	Ukončení elektroforézy	150
3.3.5	Barvení a odbarvování.....	151
3.3.6	Promývání a sušení	151
3.3.7	Skenování	151
3.4	INTERPRETACE ELEKTROFOREOGRAMU.....	151
3.4.1	Klasifikace podle Fredricksona.....	151

4.	IDENTIFIKACE A STANOVENÍ IZOELEKTRICKÉHO BODU	
	AMINOKYSELIN	154
4.1	KLINICKÉ A PATOBIOCHEMICKÉ ASPEKTY METABOLIZMU	
	AMINOKYSELIN	154
4.2	ELEKTROCHEMICKÉ VLASTNOSTI AMINOKYSELIN	154
4.2.1	Izoelektrický bod aminokyselin	155
4.3	DĚLENÍ AMINOKYSELIN CHROMATOGRAFIÍ NA TENKÉ VRSTVĚ	155
4.4	POTENCIOMETRICKÁ TITRACE AMINOKYSELIN	155
4.5	IDENTIFIKACE NEZNÁMÉ AMINOKYSELINY POMOCÍ TLC	156
4.6	POTENCIOMETRICKÁ TITRACE NEZNÁMÉ AMINOKYSELINY	157
4.7	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	158
4.7.1	TLC	158
4.7.2	Potenciometrická titrace neznámé aminokyseliny	158
5.	ZÁKLADNÍ PRINCIPY IMUNOCHEMICKÝCH METOD	161
5.1	IMUNOCHEMICKÉ METODY PRECIPITAČNÍ	161
5.1.1	Imunoprecipitace v roztoku	161
5.1.2	Imunoprecipitace v gelu	162
5.2	IMUNOCHEMICKÉ METODY S MARKERY	162
5.3	DALŠÍ IMUNOCHEMICKÉ METODY	162
5.4	URČOVÁNÍ DRUHOVÉ PŘÍSLUŠNOSTI	162
5.4.1	Příprava agarózového gelu k analýze	162
5.4.2	Ředění vzorku geometrickou řadou	163
5.4.3	Ouchterlonyho metoda dvojité imunodifuze	163
5.5	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	165
5.6	STANOVENÍ KREVNÍCH SKUPIN	165
5.1	STANOVENÍ C-REAKTIVNÍHO PROTEINU	167
6.	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ A ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ KREVNÍ	
	PLAZMY	170
6.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ K ANALÝZE	170
6.1.1	STANOVENÍ PROTEINŮ	170
6.1.1.1	Stanovení celkové bílkoviny biuretovou reakcí	171
6.1.1.2	Stanovení bílkovin dle Lowryho	172
6.2	ELEKTROFORÉZA SÉROVÝCH PROTEINŮ	173
6.2.1	Agarózový gel	173
6.2.2	Příprava a aplikace vzorku	173
6.2.3	Vlastní elektroforéza	173
6.2.4	Ukončení elektroforézy	173
6.2.5	Barvení a odbarvování	173
6.2.6	Promývání a sušení	174
6.2.7	Skenování	174
6.3	INTERPRETACE ELEKTROFOREOGRAMU	175

7.	BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ JATERNÍCH FUNKCÍ.....	177
7.1	JÁTRA A JEJICH FUNKCE.....	177
7.1.1	Biochemické vyšetření jater.....	177
7.1.2	Testy propustnosti a integrity membrán hepatocytu.....	178
7.1.3	Testy na poruchy produkce a vylučování žluče.....	178
7.1.3.1	Alkalická fosfatáza.....	178
7.1.3.2	γ -Glutamyltransferáza.....	179
7.1.3.3	Bilirubin.....	179
7.1.4	Biochemické vyšetření nutričního stavu.....	179
7.1.4.1	Malnutrice.....	180
7.1.4.2	Obezita.....	180
7.1.4.3	Plazmatické proteiny.....	180
7.2	STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE JATERNÍCH ENZYMŮ.....	181
7.2.1	Alaninaminotransferáza.....	181
7.2.2	Aspartátaminotransferáza.....	181
7.2.3	γ -Glutamyltransferáza.....	184
7.2.4	Alkalická fosfatáza.....	185
8.	ANALÝZA MOČI A MOČOVÉHO SEDIMENTU.....	188
8.1	MĚŘENÍ GLOMERULÁRNÍ FILTRACE A STANOVENÍ CLEARANCE ENDOGENNÍHO KREATININU.....	190
8.1.1	GFR a clearance kreatininu.....	190
8.1.2	Stanovení kreatininu Jaffeho metodou.....	191
8.1.3	Fyzikální vyšetření moči.....	192
8.1.4	Chemické vyšetření moči.....	192
8.1.5	Vyšetření močového sedimentu.....	192
8.1.6	Základní pravidla pro správný odběr moči.....	192
8.2	PRACOVNÍ POSTUP EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI.....	193
8.2.1	Stanovení clearance endogenního kreatininu Jaffeho metodou.....	193
8.2.2	Fyzikální vyšetření moči.....	194
8.2.3	Chemické vyšetření moči.....	194
8.2.3.1	Chemické vyšetření diagnostickými proužky.....	194
8.2.3.2	Chemické vyšetření moči mokrou cestou.....	195
8.2.4	Vyšetření močového sedimentu.....	197
8.2.5	Porovnání rozpustnosti vápenatých solí v kyselém a zásaditém prostředí.....	198
9.	PUFRAČNÍ KAPACITA A VYŠETŘENÍ ACIDOBÁZICKÉ ROVNOVÁHY.....	201
9.1	STANOVENÍ PUFRAČNÍ KAPACITY FOSFÁTOVÉHO PUFRU.....	201
9.1.1	Titrační křivka.....	201
9.1.2	Fosfátový a bikarbonátový pufr.....	202
9.1.3	Bílkovinné pufrační systémy.....	203
9.1.4	Pufrační kapacita krve.....	204
9.2	PRACOVNÍ POSTUP.....	204

9.3	VYŠETŘENÍ ACIDOBÁZICKÉ ROVNOVÁHY DLE ASTRUPA	209
9.3.1	Pracovní postup	209
9.3.2	Uspořádání experimentu.....	210
9.3.3	Odběr kapilární krve.....	210
9.3.4	Interpretace parametrů ABR:	210
9.3.4.1	pH.....	210
9.3.4.2	pCO ₂	210
9.3.4.3	Standardní bikarbonát HCO ₃ ⁻	211
9.3.4.4	Přebytek bází (base excess, BE)	211
9.3.4.5	Anion gap (AG)	211
9.3.4.6	pO ₂	211
10.	ORÁLNÍ GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST (OGTT)	213
10.1	PROVEDENÍ OGTT.....	213
10.2	HODNOCENÍ OGTT	214
10.3	STANOVENÍ GLYKÉMIE	216
10.4	NÁPLŇ PRAKTICKÉHO CVIČENÍ	217
10.4.1	OGTT.....	217
10.4.2	Fotometrické stanovení glukózy v plazmě	218
10.5	VYHODNOCENÍ.....	219
11.	TOXIKOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ V MEDICÍNĚ: METABOLICKÉ ASPEKTY PŘÍJMU ETANOLU	222
11.1	FUNKCE JATER Z POHLEDU BIOCHEMIE	222
11.1.1	Biotransformační a detoxikační funkce	223
11.2	METABOLIZMUS ETANOLU	224
11.2.1	Akutní účinky etanolu	225
11.2.2	Alkoholtestery.....	225
11.3	NÁPLŇ PRAKTICKÉHO CVIČENÍ	226
11.3.1	Důkaz přítomnosti etanolu ve vydechovaném vzduchu	226
Seznam příloh:		
	PŘÍLOHA 1: DVOJITĚ RECIPROKÉ VYNESENÍ	229
	PŘÍLOHA 2: ANALÝZA TITRAČNÍ KŘIVKY METODOU TEČEN	231
	PŘÍLOHA 3: ANALÝZA TITRAČNÍ KŘIVKY METODOU SEČEN	234
	PŘÍLOHA 4: SYCENÍ SÍRANEM AMONNÝM	235
	PŘÍLOHA 5: ORIENTAČNÍ FYZIOLOGICKÉ HODNOTY VYBRANÝCH ANALYTŮ.....	236
	PŘÍLOHA 6: MATERIÁLOVÉ VYBAVENÍ LABORATOŘE	238
	PŘÍLOHA 7: PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ LABORATOŘE	241
	PŘÍLOHA 8: NÁVOD NA POUŽITÍ SPEKTROFOTOMETRU SPEKOL 1300	243
	PŘÍLOHA 9: LABORATORNÍ ŘÁD A BEZPEČNOST PRÁCE V LABORATOŘI	246
	PŘÍLOHA 10: PRVNÍ POMOC PŘI ÚRAZECH V LABORATOŘI.....	248
	POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA	250