

# OBSAH

	<b>TEORETICKÉ PRINCIPY LABORATORNÍCH METOD</b> .....	15
<b>1.</b>	<b>ZÁKLADY LABORATORNÍCH TECHNIK</b> .....	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
<b>2.</b>	<b>FUNKCE JEDNÉ REÁLNÉ PROMĚNNÉ</b> .....	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



<b>3.</b>	<b>VYJADŘOVÁNÍ SLOŽENÍ SMĚSÍ</b> .....	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
<b>4.</b>	<b>CHEMICKÉ ROVNOVÁHY</b> .....	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	Hydrolyza 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
<b>5.</b>	<b>ANALYTICKÉ METODY</b> .....	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	CHROMATOGRAFIE .....	91
5.2.1	Plynová chromatografie .....	92
5.2.2	Kapalinová chromatografie a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	96
5.2.3	Tenkvrstvá 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



	<b>NÁVODY K PRAKTICKÝM CVIČENÍM</b> .....	127
<b>1.</b>	<b>ZOLLINGER-ELLISONŮV SYNDROM</b> .....	128
1.1	PRACOVNÍ POSTUP ANALÝZY .....	129
1.1.1	Standardizace odměrného roztoku hydroxidu sodného na kyselinu šťavelovou .....	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
<b>2.</b>	<b>STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY A MICHAELISOVY KONSTANTY LDH V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU</b> .....	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
<b>3.</b>	<b>ANALÝZA VYBRANÝCH PARAMETRŮ LIPIDOVÉHO METABOLIZMU</b> .....	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



<b>4.</b>	<b>IDENTIFIKACE A STANOVENÍ IZOELEKTRICKÉHO BODU AMINOKYSELIN</b> .....	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
<b>5.</b>	<b>ZÁKLADNÍ PRINCIPY IMUNOCHEMICKÝCH METOD</b> .....	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
<b>6.</b>	<b>KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ A ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ KREVNÍ PLAZMY</b> .....	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



<b>7.</b>	<b>BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ JATERNÍCH FUNKCÍ</b> .....	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	$\gamma$ -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	$\gamma$ -Glutamyltransferáza .....	184
7.2.4	Alkalická fosfatáza .....	185
<b>8.</b>	<b>ANALÝZA MOČI A MOČOVÉHO SEDIMENTU</b> .....	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
<b>9.</b>	<b>PUFRAČNÍ KAPACITA A VYŠETŘENÍ ACIDOBAZICKÉ ROVNOVÁHY</b> .....	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 ACIDOBAZICKÉ 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 <sub>2</sub> .....	210
9.3.4.3	Standardní bikarbonát HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	211
9.3.4.4	Přebytek bází (base excess, BE) .....	211
9.3.4.5	Anion gap (AG) .....	211
9.3.4.6	pO <sub>2</sub> .....	211
10.	<b>ORÁLNÍ GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST (OGTT)</b> .....	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.	<b>TOXIKOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ V MEDICÍNĚ: METABOLICKÉ ASPEKTY PŘÍJMU ETANOLU</b> .....	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 vydechaném vzduchu .....	226
<b>Seznam příloh:</b>		
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
PŘÍLOHA 11: STANOVENÍ KATALYTICKÉ AKTIVITY ALT A AST .....		250
POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA .....		252