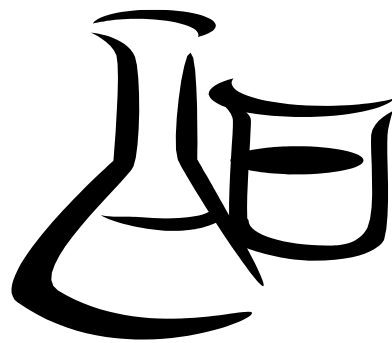


Vyšetření jater a pankreatu

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka, Lenka Fialová



2020/21

Obsah

- 1. STANOVENÍ AKTIVITY ASPARTÁTAMINOTRANSFERÁZY (AST) - 3 -**
- 2. STANOVENÍ AKTIVITY ALANINAMINOTRANSFERÁZY (ALT) - 4 -**
- 3. STANOVENÍ AKTIVITY γ -GLUTAMYLTRANSFERÁZY (GGT) - 5 -**
- 4. STANOVENÍ AKTIVITY AMYLÁZY V SÉRU (S-AMS) - 6 -**
- 5. VYŠETŘENÍ ZÁKLADNÍCH KOAGULAČNÍCH PARAMETRŮ KOAGULOMETREM - 6 -**

1. Stanovení aktivity aspartátaminotransferázy (AST)

Reagencie:

Pro stanovení se použije komerční souprava BioLATest AST-UV L 500 firmy PLIVA-Lachema Diagnostika.

1. **Pracovní roztok** [([malátdehydrogenáza](#) $\geq 12,5$ $\mu\text{kat/l}$, [laktátdehydrogenáza](#) $\geq 12,5$ $\mu\text{kat/l}$, [tris-pufr](#)(pH 7,8) 100,0 mmol/l, [L-aspartát](#) 300,0 mmol/l, [pyridoxal-5'-fosfát](#) 120,0 $\mu\text{mol/l}$)]
2. **Startér** ([2-oxoglutarát](#) 60,0 mmol/l, [NADH](#) 900,0 $\mu\text{mol/l}$)
3. **Sérum** – neznámý vzorek

Pracovní postup:

Startér před analýzou předejde alespoň 5 minut na teplotu 37 °C.

Kyvetu, ve které budeme provádět měření, necháme rovněž alespoň 5 minut vyhřát na 37 °C.

Odměřit v ml do kyvety:	Vzorek
Pracovní roztok	1,000
Sérum	0,100
Promícháme a inkubujeme 5–10 minut při 37 °C a pak přidáme	
Startér	0,250
Promícháme a inkubujeme 1 minutu při 37 °C	

Během jednodominutové inkubace připravíme spektrofotometr k měření nastavením vlnové délky 340 nm a nulové absorbance proti destilované vodě. Po jednodominutové inkubaci změříme absorbanci. Pak pokračujeme v měření absorbancí v jednodominutových intervalech (přesně) po dobu 3 minut v 1cm kyvetě při vlnové délce 340 nm proti destilované vodě.

Výpočet:

Vypočteme průměrný pokles absorbance při 340 nm za minutu (ΔA_{340}).

Katalytickou koncentraci AST vypočítáme

$$S\text{-AST } (\mu\text{kat/l}) = \Delta A_{340} \cdot 35,7$$

2. Stanovení aktivity alaninaminotransferázy (ALT)

Reagencie:

Pro stanovení je použita komerční souprava BIOLATEST® ALT-UV Liquid (Erba Lachema).

1. **Pracovní roztok** [[laktátdehydrogenáza](#) $\geq 26,6$ $\mu\text{kat/l}$, tris-pufr (pH 7,5) 110,0 mmol/l, [L-alanin](#) 567 mmol/l, [pyridoxal-5'-fosfát](#) 100 $\mu\text{mol/l}$, [2-oxoglutarát](#) 17,0 mmol/l, [NADH](#) 0,21 mmol/l]
3. **Sérum** – neznámý vzorek

Pracovní postup:

Pracovní roztok před analýzou alespoň 5 minut předejdeme na teplotu 37 °C.

Kyvetu, ve které budeme provádět měření, necháme rovněž alespoň 5 minut vyhřát na 37 °C.

Odměřit v ml do kyvety:	Vzorek
Pracovní roztok	1,00
Sérum	0,10
Promícháme a inkubujeme 1 minutu při 37 °C	

Během jednominutové inkubace připravíme spektrofotometr k měření nastavením vlnové délky 340 nm a nulové absorbance proti destilované vodě. Po jednominutové inkubaci změříme absorbanci. Pak pokračujeme v měření absorbancí v jednominutových intervalech (přesně) po dobu 5 minut v 1cm kyvetě při vlnové délce 340 nm proti destilované vodě.

Výpočet:

Vypočteme průměrný pokles absorbance při 340 nm za minutu (ΔA_{340}).

Katalytickou koncentraci ALT vypočítáme

$$\text{S-AST } (\mu\text{kat/l}) = \Delta A_{340} \cdot 29,08$$

3. Stanovení aktivity γ -glutamyltransferázy (GGT)

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava BioSystems Gamma-Glutamyltransferase

1. **Pracovní roztok** ([L- \$\gamma\$ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid](#) 6,5 mmol/l v pufru složeném z [glycylglycinu](#) 165 mmol/l a hydroxidu sodného 104 mmol/l, pH 7,9) \diamond
2. **Sérum** – neznámý vzorek

Pracovní postup:

Pracovní roztok a kyvetu předehřejeme 5 minut na 37° C. Dále postupujeme podle tabulky.

Do kyvety odměříme v ml	Vzorek
Pracovní roztok	1,0
Sérum	0,1

Promícháme, inkubujeme přibližně 30 s při 37 °C a pak změříme v 1cm kyvetě proti roztoku dvojchromanu draselného počáteční absorbanci (A_0) při 405 nm. Dále pokračujeme v jednodominutových intervalech po dobu 3 minut v odečítání dalších absorbancí (A_1 – A_3).

Výpočet:

Vypočteme průměrný vzestup absorbance při 405 nm za minutu (ΔA_{405}).

Koncentraci katalytické aktivity GGT v séru vypočítáme podler vzorce:

$$\text{GGT } (\mu\text{kat/l}) = \Delta A_{405} \cdot 18,52$$

4. Stanovení aktivity amylázy v séru (S-AMS)

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava α -amylase-direct (BioSystems)

1. **Pracovní činidlo** (MES 50 mmol/l, chlorid vápenatý 5 mmol/l, chlorid sodný 300 mmol/l, thiokyanát sodný 450 mmol/l, 2-chloro-4-nitrofenylmaltotriosid 2,25 mmol/l, pH 6,1)
2. **Sérum – neznámý vzorek**
3. **Standard – standardní sérum s aktivitou AMS 3 μ kat/l**

Pracovní postup:

Pracovní roztok a kyvetu předejdeme 5 minut na 37 °C. Dále postupujeme podle tabulky.

Odměříme v ml:	Vzorek	Standard	Blank
Pracovní činidlo	0,80	0,80	0,80
Vzorek	0,02	–	–
Standard	–	0,02	–
Destilovaná voda	–	–	0,02

Promícháme, inkubujeme přesně 2 minuty při 37 °C a pak změříme v 1 cm kyvetě proti blanku absorbancí při 405 nm

Výpočet:

$$S\text{-pAMS} = a_{\text{standard}} \cdot A_{\text{vzorek}} / A_{\text{standard}}$$

$$S\text{-pAMS} = 3 \mu\text{kat/l} \cdot A_{\text{vzorek}} / A_{\text{standard}}$$

5. Vyšetření základních koagulačních parametrů koagulometrem

Bude demonstrováno vyučujícím.