**Cvičenie č. 7**

|  |  |
| --- | --- |
| **Meno, odbor:** | Kristína Hurajová, 3MBb  Simona Ihnátová, 3FBb  Nikola Kurucová, 3MBb  Samuel Nalevanko, 3FBb  Daniela Šabaková, 3MBb |
| **Dátum:** | 23.03.2020 |
| **Téma:** | Stanovenie hemoglobínu, hematokritu a celkovej koncentrácie bielkovín v sére. |
| **Úloha 1:** | **Stanovenie hemoglobínu kyán-hemoglobínovou metódou** |
| **Princíp:** | Hemoglobín (Hb) je najdôležitejšou súčasťou erytrocytov, v ktorých tvorí približne 35% objemu. Je schopný viazať a uvoľňovať O2 a zúčastňuje sa transportu CO2. Medzi základné hematologické vyšetrenia patrí stanovenie množstva Hb.  Normálne hodnoty:   * u ženy – 139 g/l (120-158 g/l) * u muža – 152 g/l (135-170 g/l)   Množstvo hemoglobínu sa stanovuje farebnými zmenami jeho zlúčenín využitím kolorimetrických metód. Sahliho metóda je jedna zo základných metód, využívajúca reakciu Hb s HCl, čím vzniká kyslý hematín hnedej farby.  Kyán-hemoglobínová metóda je druhou kolorimetrickou metódou. Hemoglobín je ferikyanidom draselným oxidovaný na methemoglobín. Ten reaguje s kyanidom draselným za vzniku kyánmethemoglobínu (hemoglobín kyanidu) hnedočerveného sfarbenia).  Na zistenie množstva hemoglobínu sa využíva absorpcia svetla roztokom, čo je možné merať spektrofotometrom, s využitím vlnovej dĺžky 540 nm, alebo kalorimetrom so žlto-zeleným filtrom. Absorbancia vzorky, daná rozdielom prichádzajúceho a vychádzajúceho svetla, sa následne udáva do pomeru s absorpciou transformačného roztoku – blank podľa vzorca: |
| **Materiál:** | spektrofotometer, mikropipeta, Drabkinov roztok, štandardný roztok Hb (14,8%), skúmavky, stojan na skúmavky, krv, geometrické pomôcky, jednorazové rukavice, vatové štvorce |
| **Postup:** | * Do skúmavky napipetujte 5ml Drabkinovho roztoku. * Jemne premiešajte skúmavku s krvou a napipetujte objem 20μl, prebytočnú krv z vonkajšej strany odstráňte vatovým štvorcom. * Krv pridajte do roztoku, dobre premiešajte a nechajte stáť 15 minút. * Skúmavku s Drabkinovým roztokom, ktorý predstavuje blank, preneste do kyvety a pri 540nm kalibrujte na nulu. * Zmes Drabkinovho roztoku a krvi preneste do kyvety a odmerajte pri 540nm absorbanciu oproti blanku. * Vypočítajte koncentráciu hemoglobínu (viď. Princíp). * Zostrojte kalibračnú krivku pre Hb kván-hemoglobínovou metódou. |
| **Výsledky:** | Obr. 1  Tab. 1 Hodnoty pre zostrojenie kalibračnej krivky   |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | | TT No. | Štandard [ml] () | Drabkinov roztok [ml] | Zriedenie štandardu | Absorban-cia | Konc. Hb | | 1 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | | 2 | 1 | 4 | 0,2 | 0,06 | 2,9 | | 3 | 2 | 3 | 0,4 | 0,13 | 5,9 | | 4 | 3 | 2 | 0,6 | 0,19 | 8,9 | | 5 | 4 | 1 | 0,8 | 0,26 | 11,8 | | 6 | 5 | 0 | 1,0 | 0,32 | 14,8 |   Obr. 2 Kalibračná krivka |
| **Diskusia/Záver:** | V Tab. 1 sú zapísané hodnoty pre zostrojenie kalibračnej krivky. Koncentrácia Hb pre všetky vzorky sa počíta podľa vzorca pre výpočet koncentrácie hemoglobínu v krvi (Obr. 1). Pomocou spektrofotometra bolo potrebné odmerať absorbanciu všetkých vzoriek. Z hodnôt, ktoré vyšli sa dá zostrojiť graf kalibračnej krivky, ktorý určuje závislosť absorbancie od koncentrácie hemoglobínu (Obr. 2). |

|  |  |
| --- | --- |
| **Úloha 2:** | **Stanovenie hematokritu mikrocentrifugáciou** |
| **Princíp:** | Hematokrit udáva percentuálny pomer medzi objemom bunkovej časti krvi (erytrocytov) a celkovým objemom krvi. U zdravej dospelej ženy je hodnota hematokritu 39±4 % (35-43 %) a u zdravého dospelého muža 44±5 % (39-49%).  U novorodenca je hematokrit vyšší, u tehotných žien sú hodnoty nižšie. Hodnota hematokritu pri fyziologických podmienkach stúpa po pobyte vo vyšších nadmorských výškach. Stanovenie hematokritu sa využíva na testovanie ochorení ako sú anémia a polycytémia, ktoré sa prejavujú odchýlkami od normálnych hodnôt.  Centrifugáciou sa krvné elementy rozdelia na základe ich hmotnosti do troch vrstiev: červené krvinky (najťažšie), biele krvinky + krvné doštičky a plazma (najľahšia). |
| **Materiál:** | krv, sklené heparinizované mikrokapiláry so stupnicou, plastelína, mikrocentrifúga |
| **Postup:** | * Krv v skúmavke premiešajte a nasajte do tenkej sklenej heparinizovanej kapiláry do výšky 10 cm tak, aby v nej neboli vzduchové bubliny. * Jeden koniec upchajte plastelínou a vložte do mikrocentrifúgy tak, aby upchatý koniec smeroval von. Pre vyváženie vložte oproti inú skúmavku. * Centrifugujte 30 minút pri 3000 rpm. * Výšku stĺpca krviniek a plazmy porovnajte so stupnicou a odčítajte hodnotu hematokritu, zapíšte. |
| **Výsledky:** | Obrázok, na ktorom je vnútri, sedenie, gitara, písací stôl  Automaticky generovaný popis  Obr. 3 Hematokrit a) nákres (vľavo), b) výsledok po centrifugácii (vpravo)  Výška stĺpca krviniek (Obr. 3, vpravo): 4,3 |
| **Diskusia/Záver:** | Červené krvinky ostali v spodnej časti kapiláry, sivá vrstva s bielymi krvinkami a doštičkami bola medzi erytrocytmi a plazmou, v hornej časti bola žltkastá plazma. Hodnota hematokritu bola 43%, teda v norme.  Pre získanie správneho výsledku je potrebné určiť správnu rýchlosť a čas centrifugácie, použitá krv nesmie byť hemolyzovaná a pred nasatím sa musí dobre premiešať. Taktiež je dôležité správne odčítanie zo stupnice kapiláry.  Otázky:   1. Po dvoch dňoch bez vody je organizmus dehydratovaný, čo sa odzrkadlí na zvýšenej hustote krvi. Krvnú plazmu tvorí prevažne voda (91-92 %) a pri dehydratácii jej množstvo klesá, a tak v hematokrite bude vyšší podiel erytrocytov, čo znamená vyššiu hodnotu hematokritu. 2. Vo vyššej nadmorskej výške je menej kyslíka, na čo telo reaguje zvýšením množstva erytrocytov, teda zníži sa množstvo plazmy. Vo výsledku bude hematokrit vyšší. |

|  |  |
| --- | --- |
| **Úloha 3:** | **Stanovenie celkovej koncentrácie bielkovín biuretovou metódou** |
| **Princíp:** | Bielkoviny krvnej plazmy sa rozdeľujú do niekoľkých skupín: albumíny, globulíny a fibrinogén. Ich funkciami sú: udržiavanie objemu plazmy, pH krvi, transport látok (tukov, hormónov, farbív, minerálov, vitamínov...), zúčastňujú sa obrany pred infekciami, zrážania krvi. Štandardný celkový obsah bielkovín v plazme je 60-80 g/l (u novorodencov 50-60 g/l). Výkyvy môžu nastať pri poškodení pečene, dehydratácii, ...  Biuretova metóda je založená na reakcii bielkovín so soľami dvojmocnej medi v alkalickom prostredí za vzniku purpurového komplexu (maximálna absorbancia ∼ 545 nm).  Na stanovenie celkovej koncentrácie bielkovín biuretovou metódou sa využíva set ANAMOL, ktorý obsahuje biuretovo činidlo 100 ml a štandardný roztok (koncentrácia c = 6 g/dl) |
| **Materiál:** | sérum, set ANAMOL(obsahuje štandardný roztok bielkovín a biuretovo činidlo), skúmavky, pipety, spektrofotometer, časovač  zloženie biuretovho činidla v sete ANAMOL: síran meďnatý 12 mmol/l, vínan sodno-draselný 31,9 mmol/l, jodid draselný 30,1 mmol/l, hydroxid sodný 0,6 mmol/l  zloženie reakčnej zmesi: síran meďnatý 11,8 mmol/l, vínan sodno-draselný 31,3 mmol/l, jodid draselný 29,5 mmol/l, hydroxid sodný 0,59 mmol/l |
| **Postup:** | * Pripravte si tri skúmavky a označte ich (vzorka, blank, štandard) (Obr. 4) * Do skúmavky so slepou vzorkou (blank) napipetujete 1 ml biuretovho činidla * Do skúmavky so štandardnou vzorkou napipetujete 1 ml biuretovho činidla a 0,01 ml štandardného roztoku * Do skúmavky s pokusnou vzorkou napipetujete 1 ml biuretovho činidla a 0,01 ml vyšetrovaného séra * Obsah skúmaviek premiešate, necháte inkubovať presne 5 minút pri teplote 37 °C * Po 5 minútach zmeriate absorbanciu (A) štandardnej a pokusnej vzorky oproti slepej vzorke pri 546 nm v rozmedzí do 30 minút * Vypočítate a zapíšete koncentráciu bielkovín vo vyšetrovanom sére |
| **Výsledky:** | c(štandard) = 6 g/dl = 60 g/l  A(blank) = 0,073  A(štandard) = 0,150  A(pacient) = 0,196\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_    Obr. 4: Nákres jednotlivých skúmaviek s označením |
| **Diskusia/Záver:** | Vypočítaná koncentrácia (78,4 ) sa môže líšiť od koncentrácie na prístroji (78,49 ) z toho dôvodu, že prístroj môže rátať s oveľa väčšou presnosťou, pričom poskytnuté čísla absorbancií, na manuálne prerátanie môžu byť zaokrúhlene, a teda aj výsledok manuálnym prerátaním môže byť zaokrúhlený, čo môže spôsobovať nepresnosti. Chyby pri postupe mohli nastať pri pipetovaní, ak by sa dostala vzduchová bublina do špičky, čo môže skresliť výslednú hodnotu absorbancie, a teda aj koncentrácie. Obsah bielkovín v plazme vyšetrovaného séra bol , čo je v norme (60-80), teda vyšetrovaný pacient bol pravdepodobne zdravý. |