

Biochemie II praktická cvičení Příprava pracovního materiálu

Biochemistry II Practical Exercises Working Material Preparation

Jiří Štěpán

1. Úvod

Výuka předmětu Biochemie II praktická cvičení má na LF MU dlouhou tradici, s propracovanou náplní včetně moderních skript. Jádrem předmětu je seznámení studentů s klinickobiochemickými metodami ve zdravotnictví a s dodržováním správné laboratorní praxe. Jelikož se jedná o studenty druhého ročníku, kteří teprve vstřebávají preklinické obory, je pro ně klinickobiochemická problematika značně složitá a tápou ve výběru pro ně podstatných věcí. Z toho důvodu byla připravena sada doplňujících pomocných studijních materiálů, které by jim studium mohly usnadnit. Jedná se zejména o: *Biochemie II - protokoly*, jejichž smyslem je zjednodušit a zefektivnit přípravu studentů na praktická cvičení, sjednotit formu a grafickou úpravu vypracovávaných protokolů a urychlit tímto způsobem vyučujícímu opravu protokolů. Tyto materiály byly zavedeny vloni a v příspěvku je srovnána výuka bez nich a s nimi viz odstavec 4. Závěr.

2. Základní stavba materiálu

Při tvorbě zmíněných materiálů se vycházelo ze struktury jednotlivých kapitol skript TÁBORSKÁ, E., aj. *BIOCHEMIE II : praktická cvičení*. 2. přeprac. vyd. 2005. ISBN 80-210-3645-1.¹ Jedná se celkem o 12 materiálů v rozsahu 6 - 11 stran podle rozsahu příslušné laboratorní úlohy. Celkový rozsah všech materiálů je 95 stran. Vše je dostupné studentům ke stažení na <http://portal.med.muni.cz/multimedialni-ucebni-pomucky>.²

Zde je základní stavba materiálu:

- cvičení x: název cvičení (x je pořadové číslo cvičení 1 - 12),
- úvod,
- jednotlivé úkoly x.1, x.2, atd.,
- problémy související s tímto tématem (myslí se téma příslušného cvičení).

3. Ukázky rozsáhlejších částí materiálu

Název cvičení je dán ve skriptech.

Úvod je zestručněný úvod ze skript zaměřený pouze na vyšetřované parametry, co se týká fyziologie, odkazuje na příslušné učebnice. Úvod obsahuje nutné minimum teorie, které je po studentech v praktickém cvičení vyžadováno a jsou z něho namátkově přezkušováni. Byl zařazen z důvodu, aby někteří studenti neopisovali celé strany ze skript.

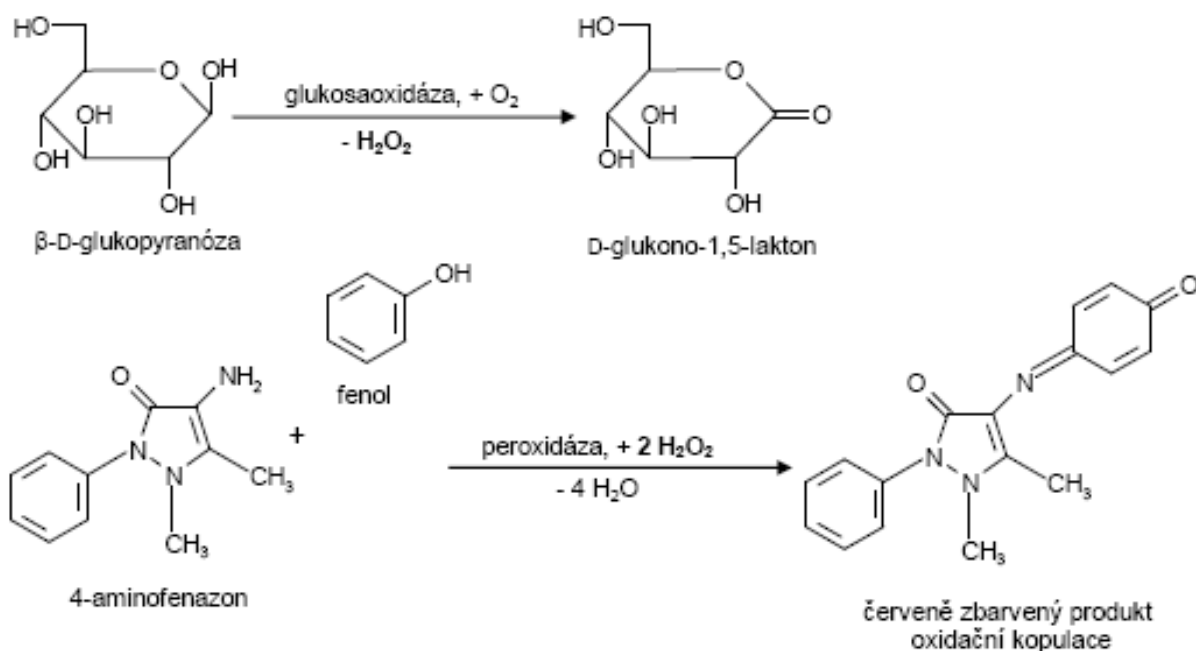
Zde budou ukázány především *jednotlivé úkoly* a zmíněny i *problémy související s tímto tématem*.

3.1 Podrobnější struktura jednotlivých úkolů

Následující obrázky přinášejí přetisky vybraných úkolů.

3.1 Enzymové stanovení glukózy v séru

Metoda end-point (do ustálení reakční rovnováhy).



Provedení (viz skripta)

Výpočet koncentrace glukózy v krevním séru: $c_x = \frac{A_x}{A_{STD}} * c_{STD}$

A_xabsorbance vzorku při 495 nm (bezrozměrné číslo)

A_{STD} absorbance standardu při 495 nm (bezrozměrné číslo)

c_x koncentrace glukózy ve vzorku (mmol dm^{-3} nebo-li mmol l^{-1})

c_{STD}koncentrace glukózy v kalibračním roztoku (mmol dm^{-3} nebo-li mmol l^{-1})

Výsledek:

Obr. 1: Enzymové stanovení glukózy v séru – princip a výpočet

Hodnocení vypočteného výsledku (viz pravidla níže):

Hodnocení

Porovnání výsledku s referenčním intervalem koncentrace glukózy nalačno u zdravých dospělých. Referenční hodnoty se liší podle typu zpracovávaného materiálu.

	Venózní	Kapilární
Krev	3,1 - 5,0	3,3 - 5,6
sérum, plazma	3,3 - 5,6	3,9 - 6,3

⇒

Hypoglykemie (pod $2,8 \text{ mmol l}^{-1}$ klinické příznaky [\downarrow Glc pro mozek, aktivace sympatiku])

Normoglykemie

Hyperglykemie

Stanovení diagnózy diabetu z hodnoty glykemie

Rozhodovací analýza - porovnání zjištěné koncentrace s hraniční hodnotou koncentrace glukózy + současná přítomnost klinických příznaků (polyurie, polydipsie, úbytek hmotnosti, ketonurie). Bezpříznakový nemocný - nejméně 2 × překročení hraniční hodnoty.

	Plná krev		Plazma	
	venózní	kapilární	venózní	kapilární
Nalačno	7		8	
Kdykoli po jídle	10	11	12	

Obr. 2: Enzymové stanovení glukózy v séru – hodnocení

Komentář:

do protokolu je zařazen princip metody enzymového stanovení glukózy v séru formou vyčíslených chemických rovnic s chemickými strukturálními vzorci a názvy jednotlivých zúčastněných chemikálií. Na rozdíl od skript jsou zavedeny chemické strukturální vzorce, protože řada studentů je už od zkoušky z Biochemie I pozapomněla a schémata psaná slovně nebo pouze principy metod popsané v textu jsou pro ně příliš abstraktní.

Co se týká stanovovaného parametru jsou zdůrazněny u jednotlivých veličin jejich jednotky, protože někteří studenti v této oblasti tápou. U složitějších výpočtů než jsou v tomto příkladu uvedené, je se studenty probíráno odvození příslušných jednotek. Pokud má veličina více možných jednotek, na prvním místě jsou uvedeny jednotky upřednostňované ve fyzikální chemii, na druhém místě jednotka používaná v klinické biochemii. Na výpočet s výsledkem je ponechané potřebné místo.

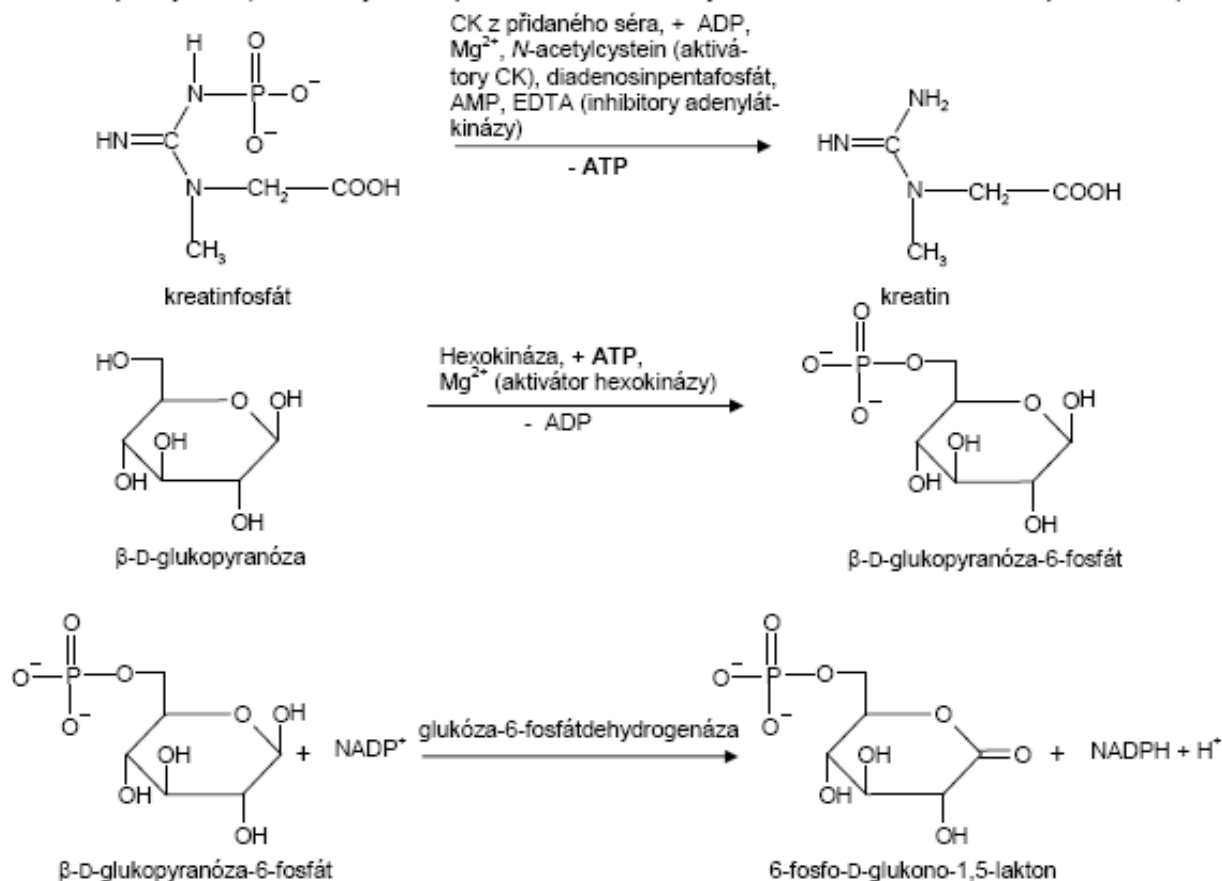
Co se týká klinického hodnocení, provedou ho studenti na základě níže uvedených pravidel převzatých ze skript, popřípadě u některých úloh doplněných z další literatury. Pravidla jsou uvedena ve zhuštěné podobě, je vždy zdůrazněno, o který ze tří typů interpretace výsledků se jedná (porovnání výsledků s referenčním intervalem, rozhodovací analýza, kritický rozdíl). Zdánlivá maličkost, která ovšem také může činit problémy.

6.1 Stanovení katalytické koncentrace kreatinkinázy v séru

Kreatinkináza (CK) - cytoplazmatický a mitochondriální enzym katalyzující fosforylaci kreatinu. 2 podjednotky: B (brain), M (muscle) \Rightarrow 3 izoenzymy: CK-MM (kosterní, srdeční svalstvo), CK-MB (ze 40% celkové CK v srdečním svalu, v kosterním jen z 1 - 2 % celkové CK), CK-BB (hlavně mozek, hladká svalovina dělohy, některé nádory).

Kinetická metoda.

Optický test (měří se rychlost přírůstku NADPH \sim rychlost vzrůstu absorbance při 340 nm).



Provedení (viz skripta)

Výpočet katalytické koncentrace CK v krevním séru:

$$\text{katal. konc. CK } (\mu\text{kat } \text{dm}^{-3}) = \frac{\Delta A_{340}}{\Delta t} * 108,47$$

ΔA_{340}změna absorbance vzorku při 340 nm (bezrozměrné číslo)

Δt doba za kterou došlo ke změně absorbance o ΔA_{340} (min)

Vztah platí pro objem séra 0,02 ml a celkový objem reakční směsi (čínidlo + sérum) 1,02 ml.

Výsledek:

Obr. 3: Stanovení katalytické koncentrace kreatinkinázy v séru – princip a výpočet

Hodnocení

Porovnání výsledku s referenčním intervalem katalytické koncentrace CK
0,41 - 3,16 $\mu\text{kat l}^{-1}$ (muži), 0,41 - 2,83 $\mu\text{kat l}^{-1}$ (ženy).

Ke studiu: význam stanovení kreatinkinázy pro diagnostiku infarktu myokardu

↑ CK - při IM po 3 - 6 h, vrchol obvykle po 24 h, pozor možnost uvolnění CK z kosterního svalu (fyzická námaha, křeče, poranění svalů, i.m. inj.) ⇒ CK je nespecifický a málo významný ukazatel IM, pro potvrzení diagnózy stanovit CK-MB a další markery IM (myoglobin, troponin)

Obr. 4: Stanovení katalytické koncentrace kreatinkinázy v séru – hodnocení

Komentář:

je obdobný jako u předešlého příkladu. Zde a u jiných úkolů, kde je složitější reakční směs (viz první reakce přeměna kreatinfosfátu na kreatin) je u všech složek uvedena jejich funkce. Ve skriptech to studenti uvedeno nemají a zvědavější jedinci zde naleznou potřebné informace.

3.2 Podrobnější struktura části „Problémy související s tímto tématem“

Tato část je zcela převzata ze skript. Změny a doplnění jsou uvedeny v komentáři. Příklady jsou vybrány ze cvičení 7: *Vyšetření bílkovin v krevním séru*. Opět je uveden přetisk materiálu.

- ▶ 2. Které změny ve spektru sérových proteinů nastávají při chronických zánětlivých onemocněních?
 -
 -
- ▶ 3. Jaký nález ve spektru sérových proteinů lze očekávat při chronických hepatopatiích?
 - ↓ albumin, ↑ γ -globuliny, ↓ α_1 -globuliny, ↓ protrombin (Quickův test), ↓ cholinesteráza (ale při steatóze ↑), (při cholestáze ↑ α_2 - a β - globuliny)
- ▶ 4. Uvedte, jaké změny (↑ zvýšené, ↓ snížené, N normální) v bílkovinném spektru lze předpokládat u pacienta s těžkým bronchiálním astmatem. (Uvažujte pouze z hlediska bílkovin probíraných v tomto cvičení).
 -
 - Další lab. diagnostika: častá eozinofilie, eozinofily ve sputu i v lavážní tekutině získané při bronchoskopii (bronchoalveolární laváž, BAL)

Obr. 5: Příklady otázek v části „Problémy související s tímto tématem“

Komentář:

změny oproti skriptům jsou následující:

- doplněné odrážky, naznačující počet odpovědí na otázky, na které studenti při pečlivém prostudování dané kapitoly ve skriptech mohou nalézt odpověď,
- doplněné odpovědi na otázky, na které není možné nalézt ve skriptech odpověď, (toto bude možná lépe zaměnit za konkrétní literární pramen, kde lze odpověď nalézt),
- doplnění další odrážky s další laboratorní diagnostikou, aby si studenti uvědomili, že klinickobiochemické vyšetření není jedinou možnou laboratorní diagnostikou.

4. Závěr

Materiály *Biochemie II - protokoly* přinesly následující výhody:

- zefektivnění přípravy studentů na praktická cvičení,
- lepší vhled do chemismu jednotlivých vyšetření,
- unifikaci protokolů,
- úsporu času pro studenty,
- úsporu času pro vyučujícího.

Studenti také v průběhu semestru odhalovali drobné překlepy, které mohly být hned odstraněny.

Použité zdroje

1. TÁBORSKÁ, E., aj. *Biochemie II : praktická cvičení*. 2. přeprac. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2005. 110 s. ISBN 80-210-3645-1.
2. ŠTĚPÁN, J. *Biochemie II – protokoly* [online]. Aktualizováno 16. 2. 2007 [cit. 2007-03-01]. Dostupný z WWW: < <http://portal.med.muni.cz/multimedialni-ucebni-pomucky>>.
3. CHROMÝ, V., aj. *Bioanalytika : analytická chemie v laboratorní medicíně*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2002. 268 s. ISBN 80-210-2917-X.
4. DZÚRIK, R., aj. *Štandardná klinickobiochemická diagnostika*. 2. aktualiz. a rozšíř. vyd. Martin (SK) : Osveta, 1996. 465 s. Edícia pre postgraduálne štúdium lekárov a farmaceutov. Dérerova zbierka. Sv. 127. ISBN 80-217-0256-7.

PharmDr., RNDr. Jiří Štěpán, Ph.D.
Biochemický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity
Komenského nám. 2, 662 43 Brno, Česká republika
E-mail: jirs@med.muni.cz
Telefon: + 420 549 496 853