

Praktická úloha č. 2

Téma: Fyziológia vylučovania človeka

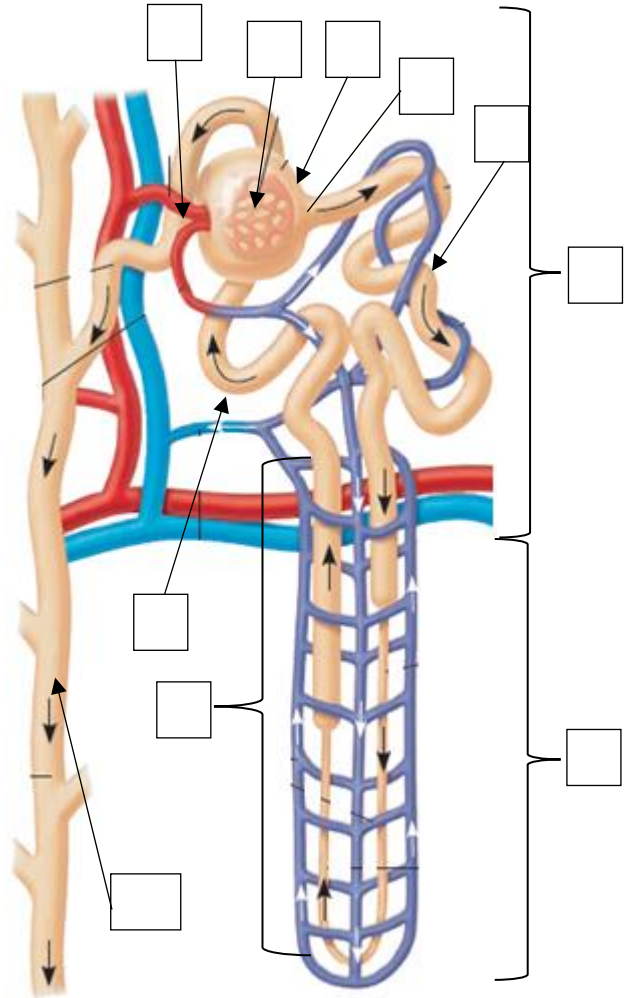
Ľudské telo sa zbavuje odpadových látok pomocou obličiek. Filtráciou krvi cez filtračnú membránu vytvárajú obličky primárny moč, ktorý sa vo viacerých procesoch upravuje - niektoré látky sú do moču ďalej vylučované, iné naopak reabsorbované naspäť do krvi. Samotnú filtračnú membránu tvoria 3 vrstvy – endotel cievnych kapilár, ich bazálna membrána, na ktorej sú „prirastené“ a tzv. podocyty – prvé bunky močových ciest. Tieto vrstvy sú však nesúvislé, a tak v celom filtri nachádzame diery o veľkosti približne 8 nm. Všetko, čo je menšie, ako tieto diery, prejde obličkovým filtrom do primárneho moču – napríklad voda alebo ióny. Primárny moč sa ďalej upravuje v ďalších častiach nefrónu a nakoniec vznikne tzv. definitívny moč. Okrem toho majú obličky aj veľa iných funkcií – podieľajú sa na regulácii krvného tlaku, metabolizme glukózy, udržiavaní správneho zloženia krvnej plazmy, ako aj jej pH. To všetko dokážu robiť aj vďaka tomu, že sú významným endokrinným orgánom.

1. Teoretická časť

1.1. Základnou funkčnou jednotkou obličiek je nefrón – ten vykonáva všetky procesy tvorby moču, ale aj regulácie. Popíšte jednotlivé časti nefrónu na obrázku. Vyberajte z nasledujúcich termínov:

(1)glomerulus, (2) Bowmanovo púzdro, (3) Malpighiho teliesko, (4) proximálny tubulus, (5) distálny tubulus, (6) Henleho kľučka, (7) juxtaglomerulárny aparát, (8) kôra obličky, (9) dreň obličky, (10) zberný kanálik

1.2. Určte, ktoré štruktúry popísané vyššie sa podieľajú na filtrovaní krvi a tvorbe primárneho moču.



1.3. Označte správne výroky o filtrácii a reabsorpcii

- A. Filtračnou membránou prejdú bielkoviny, ktoré sú menšie ako 8nm. Tie sú ďalej v nefróne reabsorbované.
- B. Filtrácia je ovplyvnená aj nábojom filtrovaných látok, keďže filtračná membrána je vďaka proteínom, ktoré sa v nej nachádzajú, záporne nabitá.
- C. Vďaka zápornému náboju neprejdú cez filtračnú membránu anióny.
- D. Cez filtračnú membránu prechádzajú ióny H^+ , čo mení pH krvi.
- E. Voda sa reabsorbuje vo všetkých častiach tubulu.

- F. V zbernom kanáliku sa už zloženie moču nemení.
- G. Výsledný objem moču je ovplyvňovaný aldosterónom a antidiuretickým hormónom.
- H. Ľudia so zvýšenou glykémiou môžu mať v moči glukózu. Tá, vďaka svojej polarite „ťahá“ vodu a zvyšuje dennú produkciu moču.

2. Praktická časť – stanovenie koncentrácie proteínov vo vzorkách

V nemocnici sa odobrali vzorky krvnej plazmy a moču dvom pacientom, ale žiaľbohu neboli správne označené. Vašou úlohou bude zistiť, ktorá vzorka patrila ktorému pacientovi. **Pacientovi č. 1** bola diagnostikovaná glomerulonefritída – závažné ochorenie obličiek, ktoré sa vyznačuje poškodením filtračnej membrány. **Pacient č. 2** by mal mať zdravé obličky.

Materiál a pomôcky: destilovaná voda (dH₂O), štandardný roztok proteínov (BSA - 100µg/ml), Bradfordovej činidlo (B), vzorky plazmy (P1, P2), vzorky moču (M1, M2), automatické pipety, špičky na pipety, spektrofotometrické kvety, kadička na odpad, skúmavky, milimetrový papier

2.1. Vytvorenie kalibračnej krivky

Postup:

1. Označte si 5 skúmaviek číslami 1-5
2. Vypočítajte, aký objem zásobného roztoku proteínov s koncentráciou 100 µg/ml máte napipetovať do skúmavky, aby vo výslednom objeme (2ml), bola požadovaná koncentrácia proteínov (podľa Tabuľky 1)
3. Dopočítajte objem destilovanej vody, ktorý treba pridať k vami vypočítanému objemu zásobného roztoku proteínov tak, aby súčet objemov destilovanej vody a zásobného roztoku bol 200 µl.

Skúmavka	Koncentrácia proteínov v 2ml (c ₁)	V(dH ₂ O)	V(BSA – 100 µg/ml)	V (B)	Absorbancia (Abs)	Pomer Abs/c ₁
		200 µl				
		2 ml				
1	0			1,8 ml	0	--
2	2 µg/ml			1,8 ml		
3	4 µg/ml			1,8 ml		
4	6 µg/ml			1,8 ml		
5	10 µg/ml			1,8 ml		
					Priemer (k)	

Tabuľka1

4. Do každej skúmavky následne napipetujte vami vypočítané objemy vody a zásobného roztoku.
5. Potom pridajte 1800 µl Bradfordovej činidla a premiešajte.
6. Nechajte inkubovať 5 minút pri izbovej teplote.

7. Prepipetujte vzorky do kyvety a merajte absorbančiu pri vlnovej dĺžke 595 nm. Kyvetu po použití opláchnite destilovanou vodou a osušte. Zmeranú absorbančiu zapíšte do Tabuľky 1. Vzorka 1 vám slúži ako blank (nulová hodnota pre vašu kalibračnú krivku)
8. Vypočítajte pomer Absorbancia/Koncentrácia proteínov a zapíšte ho do Tabuľky 1. Vypočítajte priemer jednotlivých pomerov.
9. Na milimetrový papier naneste jednotlivé **body** vyjadrujúce funkciu závislosti **absorbancie od koncentrácie**(v hrubo zvýraznených stĺpcoch Tabuľky 1), nespájajte ich. Dbajte na to, aby mal graf všetky formálne náležitosti. Použite pravítko a správne písacie potreby.
10. Potom naneste do toho istého grafu priamku závislosti absorbancie od koncentrácie podľa funkcie $y = kx$, pričom „k“ je vami vypočítaný priemer v Tabuľke 1. Práve ste vytvorili kalibračnú krivku 😊.
11. **Privolajte vedúceho úlohy**, ktorý určí, či je vaša kalibračná krivka v poriadku a môžete s ňou pokračovať do ďalšej časti. Ak nie, vedúci pre vás zabezpečí autorskú kalibračnú krivku. Vami vytvorená kalibračná krivka bude ale stále hodnotená.

2.2 Stanovenie koncentrácie proteínov v neznámych vzorkách

2.2.1 Očakávaná (fyziologická) koncentrácia proteínov v krvnej plazme je **60-80 g/l**. Vaša kalibračná krivka má však rozmedzie 0-10 µg/ml. Koľkokrát musíte nariediť vzorky plazmy, aby ste mohli merať ich koncentráciu? Myslite na to, že vzorka sa zase nariedi ešte 10x pridaním Bradfordovej činidla.

- A. 100x
- B. 1 000x
- C. 10 000x
- D. 100 000x

Postup:

1. Plazmu nariedte destilovanou vodou toľkokrát, koľko ste určili v úlohe 2.2.1. Vzorky moču nariedte 10x. Na riedenie použite rezervné skúmavky. Pokiaľ nedokážete riediť v jednom kroku, zriedte roztok vo viacerých krokoch (napríklad pre 100 násobné riedenie môžete roztok najprv zriediť 10x, odobrať z neho malú časť a tú zas 10x zriediť). Dajte pozor, aby výsledný nariedený roztok mal **aspoň 200 µl** – minimálny objem potrebný pri ďalšom postupe.
2. Následne napipetujte do nových skúmaviek 200 µl vami nariedených vzoriek plazmy a moču, pridajte k nim 1,8 ml Bradfordovej činidla a premiešajte.
3. Nechajte inkubovať 5 minút pri izbovej teplote.
4. Prepipetujte vzorky do kyvety a merajte absorbančiu pri vlnovej dĺžke 595 nm. Kyvetu po použití opláchnite destilovanou vodou a osušte. Zmeranú absorbančiu zapíšte do Tabuľky 2. Ako blank použite vzorku 1 z úlohy 2.1.
5. Pre každú absorbančiu zistite koncentráciu a zapíšte ju do Tabuľky 2. Môžete ju zistiť buď odčítaním z grafu kalibračnej krivky, alebo vypočítaním pomocou *Priemeru (k)* z Tabuľky 1.

Skúmavka	Objem riedenej vzorky	V (B)	Absorbancia (Abs)	Koncentrácia v kvete (c_2)	Koncentrácia v pôvodnej vzorke
1	--	--	0	0	--
P1	200 μ l	1,8 ml			
P2	200 μ l	1,8 ml			
M1	200 μ l	1,8 ml			
M2	200 μ l	1,8 ml			

Tabuľka 2

2.2.2 Koľkokrát ste zriedili vzorky pridaním Bradfordovej činidla? _____

2.2.3 Koľkokrát ste celkovo zriedili moč? _____

2.2.4 Koľkokrát ste celkovo zriedili plazmu? _____

2.2.5 Na základe celkového riedenia vzoriek moču a plazmy vypočítajte, akú koncentráciu mala každá vzorka predtým, ako ste ich zriedili. Výsledky zapíšte do Tabuľky 2. Potom **privolajte vedúceho úlohy**, ktorý určí, či sú vami namerané a vypočítané hodnoty v poriadku a môžete s nimi pokračovať do ďalšej časti. Ak nie, dostanete autorské hodnoty.

3 Vyhodnotenie praktickej úlohy

3.1 Porovnajzte vami zistené výsledky s fyziologickými hodnotami. (Plazma: 60-80 g/l, v moči by sa bielkoviny nachádzať nemali)

3.2 Viete, že **Pacient č.1** trpel glomerulonefritídou a **Pacient č.2** mal zdravé obličky. Priradte jednotlivé vzorky (P1, P2, M1, M2) jednotlivým pacientom:

	Moč	Plazma
Pacient č.1		
Pacient č.2		

3.3 Je známe, že v definitívnom moči by sa nemali nachádzať žiadne bielkoviny. U pacienta č.2 sa napriek tomu, že má určite zdravé obličky, ako aj celý močový systém, v definitívnom moči bielkoviny vyskytli. Vedeli by ste určiť prečo?

3.4 Prečo má Pacient č. 1 takú koncentráciu proteínov v plazme, akú má?

Autor: Ján Hunák

Recenzia: Mgr. Tomáš Augustín, PhD.