

8. Model peptické ulcerace žaludku na zvířeti

Michal Jurajda

1. Cíl

Vysvětlit etiopatogenezi vzniku peptických ulcerací žaludku a dvanáctníku. Demonstrovat na zvířecím modelu ulcerogenní působení nesteroidních antiflogistik a antiulcerózní působení blokátorů H₂ receptorů.

2. Úvod do problematiky

Peptické ulcerace v žaludku a dvanáctníku vznikají při nerovnováze v působení obranných slizničních mechanismů a agresivních žaludečních šťáv. Vznik peptických ulcerací usnadňují látky a stavy, které vedou ke zhoršení trofiky žaludeční sliznice a ke snížené produkci hlenu. Uplatňuje se také zvýšená sekrece žaludečních šťáv. Naopak protektivně působí látky snižující sekreci HCl nebo látky zvyšující sekreci hlenu.

3. Materiál a metody

Laboratorní zvířata (*Rattus norvegicus*) lačná po dobu 24 hodin, indometacin substance, ranitidin (RANITAL, Lek Pharmaceutical), anestetická směs, chirurgické instrumentárium, katetr.

4. Postup

U laboratorních potkanů vyvoláme aplikací suspenze indometacinu do žaludku vznik peptických ulcerací. Porovnáním kontrolní a pokusné skupiny zjišťujeme antiulcerózní působení ranitidinu.

Zvířata uvedeme do lehké inhalační éterové narkózy. Pomocí katetru nasondujeme žaludek a podáme ranital (u kontrolní skupiny fyziologický roztok). Po půl hodině opět v lehké éterové narkóze aplikujeme všem zvířatům suspenzi indometacinu. Experiment vyhodnocujeme po 24 hodinách. Zvířata utratíme předávkováním etheru a vypreparujeme žaludek. Žaludek rozstříhneme podél velké křivatury a sliznici pod tekoucí vodou zbavíme žaludečního obsahu a hlenu s krví. Preparáty žaludku napneme mezi dvěma skly a spočítáme léze. Poté napneme žaludky na korkovou destičku a zafixujeme v 10% formalínu. Trvalé preparáty vyfotíme a vyhodnotíme plochu a počet lézí. K hodnocení můžeme použít program ImageJ.

5. Výsledky

Porovnáme počty a plochy žaludečních lézí mezi pokusnou a kontrolní skupinou. K zjištění statisticky signifikantního rozdílu použijeme nepárový neparametrický test (např. Mann – Whitney U test).

6. Závěr

Několik poznámek k možné interpretaci výsledků (závěr samozřejmě koncipují studenti sami), např. očekávaný nárůst hodnot je... možné zdroje chyb při měření

9. Radiační poškození krevních buněk I. a II.

Lydie Izakovičová Hollá

1. Cíl

Cílem praktického cvičení je zjistit, jak se mění v důsledku celotělového ozáření dávkou 4 Gy u experimentálních potkanů počet, eventuálně další vlastnosti erytrocytů, leukocytů a trombocytů, a to ve dvou různých časových odstupech po ozáření (3 a 20 dní, tj. ve stadiu nejhlubší deprese a ve stadiu regenerace). Dále nás zajímá, zda dochází ke změnám hmotností ozařovaných zvířat a některých jejich orgánů (sleziny).

2. Úvod do problematiky

Po celotělovém ozáření vyšších organismů se rozvíjí tzv. nemoc z ozáření, jejíž projevy závisí na velikosti dávky a na tom, zda šlo o jednorázové ozáření nebo organismus obdržel výslednou dávku v dlouhých časových intervalech. Vedle primárních poruch, vyvolaných vlastním ozářením, probíhají v organismu i sekundární reakce, které mohou dále poškozovat tkáň.

Citlivost na ozáření ionizujícím zářením je u různých tkání rozdílná. Účinky záření se projevují nejvýrazněji u buněk, které se intenzívně dělí. Mezi nejcitlivější buňky patří buňky lymfatické tkáňe a kostní dřeň, dále pak buňky střevní sliznice. Po ozáření se mění krevní obraz, v rané fázi dochází ke vzestupu počtu bílých krvinek v periférii (v důsledku vyplavení nezralých leukocytů z kostní dřeně), po němž následuje jejich prudký pokles, který je charakteristickým rysem klinického stádia onemocnění (je způsoben deplecí prekurzorů ve dřeni). Po ozáření vyššími dávkami se ihned objeví pokles lymfocytů (v důsledku jejich vyšší citlivosti na ozáření a aktivace stresové osy) přetrvávající relativně dlouhou dobu. Rychle také dochází k poklesu počtu trombocytů, později i erytrocytů (jejichž životní doba v cirkulaci je nejdelší, a proto trvá nejdéle, než se projeví „deficit“ erytropoezy v periferní cirkulaci). Množství erytrocytů v periferní krvi je totiž dáno vztahem mezi jejich „přítokem“ (zde kvantifikovaným pomocí retikulocytů) a jejich odtokem (ozářením použitou dávkou nejsou erytrocyty v periférii postiženy), který můžeme považovat za danou dávkou neovlivnitelný, tj. u potkana $100/56 = 1.79\%$ denně, (průměrná délka života erytrocytu u potkana činí totiž 56 dní). Výsledky by měly potvrdit elementární logickou úvahu, že rychlost produkce (zde indikovaná koncentrací retikulocytů) a koncentrace erytrocytů se po ozáření mění každá jinak, i když přirozeně v zákonité souvislosti.

Díky tomu, že u potkana přetrvává tvorba krevních elementů ve slezině i postnatálně, bude se měnit během vývoje nemoci z ozáření i hmotnost a buněčnost sleziny (po prvotní depleci vzroste hmotnost sleziny nad původní úroveň a hemopoeza ve slezině rychle nahrazuje přetrvávající menší deficit hemopoezy v kostní dřeni).

Poznámka: Mezi potkanem a člověkem jsou velké rozdíly jak v radiosenzitivitě (tedy citlivosti na ozáření - potkan je mnohem odolnější a je tedy schopen tolerovat vyšší dávky záření), tak i v krevním obraze (u potkana je obrácený poměr v zastoupení počtů neutrofilů/lymfocytů oproti lidem a kratší životní doba erytrocytů v periférii-kolem 56 dnů – závisí na kmeni potkanů).

3. Materiál a metody

Hayemův roztok, Bürkerova komůrka, světelný mikroskop, mikropipeta 25 μL , kyveta tloušťky 1 cm, fotometr s barevným filtrem pro 530 - 550 nm (SPECOL), transformační roztok podle Drabkina, Türkův roztok, banička s 475 μl prokainového roztoku (20ti násobné zředění), barvicí roztok 1 (Eosin Y + fosfátový pufr pH 6.8), barvicí roztok 2 (Azur II + fosfátový pufr pH 6.8), oplachovací roztok (fosfátový pufr pH 7.2).

4. Postup

a) Stanovení počtu erytrocytů - melanžerová metoda:

Provedení: Do melanžeru pro červené krvinky nasajeme pomocí gumové násavky krev přesně po značku 0.5 (ředění 1:200). Očistíme pečlivě hrot melanžeru od krve a zkontrolujeme výšku sloupce krve. Přitom je nutné, aby byl melanžér ve zcela kolmé poloze. Zcela nepatrně povytáhneme jemným nasátím sloupec krve v melanžeru a kolmo jej vložíme do lahvičky s Hayemovým roztokem. Tento roztok nasajeme s již nasátou krví po značku 101. Potom sejmemme opatrně gumovou násavku, uzavřeme palcem a ukazovákem obě ústí melanžeru a dobře mícháme 2-3 minuty. Po odkápnutí několika kapek z melanžeru vpustíme další kapku krevní suspenze pod krycí sklíčko počítací komůrky, až se kapka rozlije v souvislé vrstvě mezi krycím sklem a spodní plochou komůrky. Cca za 3 minuty počítáme krvinky ve 20 obdélnících:

$$E = \sum 20 \quad \times 10\,000 \text{ při ředění } 1:200 \text{ (počet}/\mu\text{L})$$

b) Stanovení množství hemoglobinu - hemiglobinkyanidová metoda:

Roztokem ferrikyanidu draselného se hemoglobin oxiduje na hemiglobin (methemoglobin). Ten se pomocí kyanidu draselného přemění na hemiglobinkyanid. Stabilní barevný komplex má hnědočervenou barvu a hodí se k fotometrickému stanovení.

Provedení: Do zkumavky se 7 ml transformačního roztoku podle Drabkina přidáme 25 μl krve a po promíchání necháme 10 min stát. Potom měříme extinkci vzorku ve fotometrické kyvetě tloušťky 1 cm oproti Drabkinově roztoku. Současně měříme extinkci standardů o známých koncentracích pro kalibrační přímku. Z této přímky odečteme koncentraci Hb v g/l.

c) Stanovení hematokritu - mikrohematokritová hodnota:

Centrifugujeme kapiláry délky 75 mm s nasátým krevním sloupcem 3 min. při 100 000 g. Oddělený sloupec erytrocytů se odečítá pomocí odečítacího zařízení (tabulka). Z počtu erytrocytů, množství hemoglobinu v krvi a hematokritu je možno spočítat tzv. indexy červené krvinky podle těchto vztahů:

MCV (μm^3) = Hct x 10 / počet ery v miliónech, kde MCV je střední objem erytrocytu v μm^3

MCH (ng) = Hgb x 10 / počet ery v miliónech, kde MCH je střední korpuskulární hemoglobin v ng.

MCHC (%) = Hgb / Hct x 100, kde MCHC je střední korpuskulární hemoglobinová koncentrace v %.

d) Počítání leukocytů - melanžerová metoda:

Provedení: Krev odebíráme analogicky jako u červených krvinek příslušným melanžerem, který má dělení 0,5, 1, 11. Krev nasáváme přesně ke značce 0,5 (ředění 1: 20). Pomocí násavky dosajeme ředící roztok pro bílé krvinky po značku 11. Bílé krvinky počítáme v 50 středních čtvercích:

$$L = \sum \quad \times 100 \text{ při ředění 1: 20 (počet}/\mu\text{l)}$$

e) Počítání krevních destiček - dle Pieltových:

Provedení: Do baničky s prokainovým roztokem napipetujeme 25 μl krve. Zředěná krev se nechá stát alespoň 20 minut, aby nastala hemolýza a aby se trombocyty stabilizovaly a zvýraznily. Poté se krev protřepe a napipetuje do prostoru Bürkerovy komůrky. Trombocyty se nechají cca 10 min sedimentovat a potom se počítají při zvětšení 240x, resp. 150x v dobře zacloněném světelném poli.

$$T = \sum 20 \quad \times 1\,000 \text{ (počet}/\mu\text{l)}$$

f) Příprava periferního nátěru:

Kapku krve jsme kápli na podložní sklíčko asi 1 cm od pravého okraje. Druhé sklíčko položíme na toto sklíčko vlevo od kapky krve pod úhlem 30 - 40 °. (Čím je tento úhel ostřejší, tím je nátěr tenčí). Kapku rozetřeme rychlým pohybem ve směru od kapky. Nátěr má být homogenní, rovnoměrný a přiměřeně tenký, což vyžaduje jistý cvik. Dlouhé okraje mají být rovné, na konci nátěru cípaté až do ztracena.

Barvení: Nátěry mají před barvením schnout 0,5-4 hodiny. Barví se pomocí soupravy LEUKODIF 200 (LACHEMA Brno).

Provedení:

- Krevní nátěry se zhotoví obvyklým způsobem na odmaštěná sklíčka a nechají se uschnout volně na vzduchu.
- Roztoky 1-4 se nalijí do vhodných nádobek
- Nátěr se fixuje tak, že se ponoří 5x na 1 sekundu do fixačního roztoku. Po každém ponoření se nechá roztok stéci a jeho přebytek se odstraní otřením kapky o stěnu nádoby
- Fixovaný nátěr se ponoří 3x na 1 s do barvicího roztoku 1. Po každém ponoření se nechá roztok stéci a jeho přebytek se odstraní otřením kapky o stěnu nádoby

- Nátěr se ponoří 6x na 1 s do barvicího roztoku 2. Po každém ponoření se nechá roztok stéci a jeho přebytek se odstraní otřením kapky o stěnu nádoby
- Sklíčko se opláchne oplachovacím roztokem a nechá se zaschnout volně na vzduchu

g) Nátěr na stanovení retikulocytů - nepřímá metoda pomocí brilantkrezolové modři:

Provedení: Nátěr zhotovíme obvyklým způsobem na plochu podložního sklíčka s předem nanesenou zaschlou kapkou 1% brilantkrezolové modři. Nabarvené preparáty necháme řádně uschnout před dalším zpracováním.

h) Počítání retikulocytů:

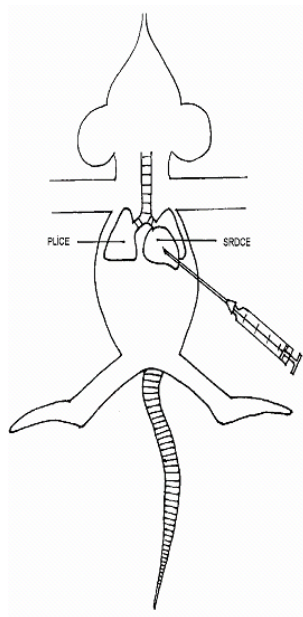
Provedení: Určujeme počet mladých erytrocytů se zbytky ribonukleové kyseliny v plasmě, tzv. substantia reticulofilamentosa (zbytky RNA se pomocí brilantkrezolové modři obarví tmavě modře, takže retikulocyty můžeme odlišit od zralých erytrocytů).

Počítáme s imerzí, při 10-násobném zvětšení objektivu. Určujeme počet retikulocytů připadajících na 1000 erytrocytů a výsledek uvádíme v tisícinách (promile). Z jistého hlediska informativnější je vypočítat z této hodnoty a ze zjištěného počtu erytrocytů absolutní počet retikulocytů (přepočet faktorem $\times 10^9/l$).

i) Diferenciální rozpočet bílých krvinek:

Provedení: Počet jednotlivých druhů určujeme nejméně na 100, lépe na 200 leukocytů, nátěr přitom prohlížíme meandrovitě, protože rozložení jednotlivých subtypů bílých krvinek není v nátěru stejnoměrné. Počet jednotlivých druhů nakonec vyjádříme procentuálně.

Vyšetříme skupinu potkanů kontrolních a 2 skupiny potkanů ozářených (v první budou zvířata ozářena před třemi dny a ve druhé potkani ozářeni před 20 dny). Před začátkem experimentu uvedeme zvířata do lehké anestézie (inhalačním podáním Halotanu), zvážíme je a poté podáme intraperitoneálně (i.p.) Rometar s Narcamonem v dávce 0.5 ml/100 g (roztok získáme smícháním 0.5 ml 2% Rometaru s 10 ml 1% Narcamonu), čímž uvedeme zvířata do celkové anestézie. Torakotomií otevřeme hrudník a odebereme krev ze srdeční komory do 2 ml plastické stříkačky s jehlou namočenou do heparinu.



Obrázek 1: *Odběr krve ze srdečních dutin*

Ihned po skončení odběru odkápneme 2 kapky na 2 podložní sklíčka pro zhotovení krevního nátěru a stanovení retikulocytů (sklíčko pro počítání retikulocytů bude označeno). Zbytek krve vystříkneme do zkumavky s protisrážlivou oxalátovou směsí a jemně promícháme. Po odběru krve zvážíme také vypreparované sleziny, jejichž odběr provádíme ze střední laparotomie.

Poté stanovíme počty jednotlivých krevních elementů (erytrocytů, leukocytů a trombocytů), dále množství hemoglobinu, hematokritu a zhotovíme krevní nátěry pro počítání diferenciálního krevního obrazu a stanovení zastoupení retikulocytů výše uvedenými postupy.

5. Výsledky

Získaná data budou porovnána vzájemně mezi všemi skupinami (tj. budeme sledovat rozdíly mezi skupinou kontrolních zvířat, potkanů ozářených před 3 dny a před 20 dny), abychom mohli posoudit dynamiku změn parametrů krevního obrazu. Statistické zpracování Mann-Whitney testem bude doplněno korekcí na mnohonásobné srovnání vybranou metodou (Holm, Bonferroni).

6. Závěr

Z výsledků praktika vyhodnotíme dosažené změny v krevním obraze a vysvětlíme případné odchylky od předpokládaných výsledků (možné zdroje chyb).

10. Ikterus u laboratorního potkana

Lukáš Pácal

1. Cíl

Cílem praktika je diagnostikovat ikterus a jeho typ.

2. Úvod do problematiky

Ikterus (žloutenka) je žluté zbarvení kůže a sliznic způsobené zvýšenou hladinou bilirubinu v séru. Při mírném zvýšení nemusí být žluté zbarvení zřetelné (subikterus). Pro zvýšenou hladinu bilirubinu v séru se používá termín hyperbilirubinémie. Bilirubin je konečný produkt degradace hemu. Při zániku erytrocytů se z nich uvolňuje hemoglobin, z hemové části je hemoxygenázou odstraněno železo a zbytek je přeměněn na bilirubin. Další zpracování bilirubinu se děje výhradně v hepatocytech. Po vstupu do hepatocytu následuje jeho rychlá konjugace s glukuronovou kyselinou proti koncentračnímu gradientu do žluči. Vzniká ve vodě nerozpustný konjugovaný bilirubin.

Podle mechanismu vzniku dělíme ikterus do tří skupin: prehepatální, hepatální a posthepatální.

Prehepatální ikterus vzniká nadměrnou tvorbou bilirubinu při zvýšeném rozpadu erytrocytů (hemolytické anémie). Hepatocyty nestíhají konjugovat a vyloučit všechny bilirubin, zvyšuje se jeho hladina v séru a jeho ukládání v tkáních způsobuje jejich žluté zbarvení.

Hepatální ikterus je způsoben poruchou metabolismu bilirubinu v játrech (vychytávání, konjugace nebo vylučování z hepatocytu) nebo poškozením až zánikem hepatocytů při jaterních chorobách.

Příčinou vzniku posthepatálního ikteru je cholestáza (porucha odtoku žluči).

3. Materiál a metody

Anestetická směs (1% Narcamon s Rometarem), chirurgické instrumentárium, operační stůl, injekční stříkačky, jehly, nitě, tampony, zkumavky, heparin, reagentie na stanovení bilirubinu v plazmě, proužky na diagnostiku bilirubinu a urobilinogenu v moči.

4. Postup

a) Modelování obstrukčního ikteru podvazem ductus choledochus

Laboratorního potkana zvážíme a uvedeme do celkové anestézie. Hmotnost si zaznamenáme. Potkana fixujeme na operačním stole a provedeme laparotomii. Pomocí rozvěrače otevřeme dutinu břišní a najdeme játra, žaludek a duodenum, ve spojce jater a duodena je spolu s venou

portae ductus choledochus. Ductus choledochus opatrně oddělíme od vena portae a podvážeme. Operační ránu uzavřeme ve dvou vrstvách. Potkana umístíme do klece na břicho. Nakonec umyjeme a uklidíme operační nástroje. Stejný postup mimo podvazu ductus choledochus provedeme u kontrolních potkanů. Další fáze pokusu následuje za týden.

b) Diagnostika ikteru

Potkana uvedeme obvyklým způsobem do narkózy. Porovnáme váhu zvířat před a po operaci, sledujeme zabarvení uší, paciček a ocasu a porovnáme s kontrolními zvířaty. Srdeční punkcí odebereme krev do stříkačky propláchnuté heparinem. Krev ze stříkačky (již bez jehly) opatrně vstříkneme do plastové zkumavky určené k centrifugaci. Po 10 minutách centrifugace (3000 otáček za minutu) získáme plazmu, kterou dále analyzujeme. Sledujeme zabarvení plazmy po centrifugaci. Punkcí močového měchýře odebereme moč. Pomocí indikátorových papírků vyšetříme přítomnost bilirubinu a urobilinogenu.

5. Závěr

Popíšeme pozorované změny. Porovnáme hladiny bilirubinu v plazmě a v moči mezi pokusnými a kontrolními zvířaty.

11. Model venózní trombózy u laboratorního potkana

Dana Bučková

1. Cíl

Porovnat hmotnost trombu vytvořeného ve venózním řečišti v nepřítomnosti a v přítomnosti heparinu a srovnat naměřené hodnoty koagulačních testů v obou skupinách pokusných zvířat.

2. Úvod do problematiky

Trombózou rozumíme vytváření krevních sraženin uvnitř cirkulačního systému. Ke vzniku tohoto stavu vede poškození cévní stěny (zánětem, aterosklerózou), vyšší srážlivost krve (při poruše antikoagulačních faktorů nebo uvolněním koagulačních faktorů z poškozené tkáně) a snížená rychlost průtoku krve (např. u ležících pacientů). K těmto mechanismům přispívá i zvýšená viskozita krve (u polycytémie, dehydratace apod.).

Mezi přirozené antikoagulační faktory patří specifický endotelový protein trombomodulin a plazmatické proteiny jaterního původu (protein C, protein S a antitrombin III). Heparin (ať už tělu vlastní nebo dodávaný za léčebným účinkem) snižuje srážení krve aktivací antitrombinu III.

3. Materiál a metody

anestetická směs (20 dílů 1% Narkamonu a 1 díl 2% Rometaru, 2 ml hypotonického roztoku (25 % roztok fyziologického roztoku), roztok heparinu v Michaelisově pufru, injekční jehly a stříkačky (1 stříkačka na 2 ml s obsahem 0,2 ml natrium citricum), chirurgické instrumentárium, preparační stolek, vlhká komůrka (Petriho miska s filtračním papírem, namočeným ve fyziologickém roztoku), tampony, papírová vata, gáza, SEVATEST aPTT Test, koagulometr KC 4A a příslušenství, centrifuga, zkumavky, automatická pipeta 100 µl, trombinové reagens

4. Postup

Model venózní trombózy u laboratorního potkana dle Hladovce (1986) umožňuje kvalifikovat i kvantifikovat tvorbu trombu ve venózním řečišti, která se dá standardně vyvolat společným působením dvou základních patogenetických mechanismů poškozujících cévní endotel – působením hypotonického roztoku a stagnací krve ve venózním řečišti. Hmotnost trombu je možno modifikovat aplikací heparinu. Aktuální situaci v koagulaci je možno monitorovat pomocí koagulačních testů, např. aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas) a TT (trombinový čas), nebo stanovením koncentrace fibrinogenu.

Anestézie

Laboratorní potkany po úvodní inhalační anestézii uvedeme do celkové narkózy podáním směsi 20 dílů 1% NARKAMONU a 1 dílu 2% ROMETARU i.p. v množství 0,5ml/100g váhy.

Operační výkon

Experimentální zvířata (laboratorní potkani 180-220 g) rozdělíme na dvě skupiny:

- 1. skupina: experimentální venózní trombóza bez antikoagulační terapie
- 2. skupina: experimentální venózní trombóza s antikoagulační terapií

Zvířatům podáme do vena jugularis 2 ml hypotonického roztoku (25% roztok fyziologického roztoku). Ve skupině s antikoagulační terapií přidáme do tohoto roztoku ještě vypočtené množství heparinu tak, aby zvíře dostalo antikoagulační dávku 4 U/kg. Zvíře fixujeme na operačním stolku v poloze na hřbetě. Nůžkami rozstříháme kraniokaudálně kůži cca 1cm laterálně od manubrium sterni tak, aby byla viditelná v. jugularis externa v místě, kde se zanořuje pod m. pectoralis. Cévu nepreparujeme! Jehlu zavedeme kraniálně přes m. pectoralis do v. jugularis tak, aby hrot jehly při jejím mírném zvednutí lehce prosvítal tenkou stěnou žíly. Do vény velmi pomalu aplikujeme fyziologický roztok (bez nebo s heparinem, podle skupiny). Operační ránu uzavřeme v jedné vrstvě několika stehy.

Ze střední laparotomie pomocí očního rozvěrače otevřeme dutinu břišní a tupou preparací opatrně uvolníme cévní svazek abdominální aorty a vena cava inf. tak, aby bylo pod uvolněný cca 2 cm dlouhý segment možno naložit dvě ligatury (horní ligatura pod levou renální vénou, dolní cca 2 cm pod horní). Obě ligatury zatáhneme. Po uplynutí 10 min rozstříháme hrudník ve střeně čáře a provedeme intrakardiální odběr krve do stříkačky s připraveným citrátem (1:9). Dobře promíchanou krev ze stříkačky opatrně stříkneme do plastické zkumavky pro centrifugaci. Po 10 min centrifugace (3000 ot) získáme plasmu, kterou dále analyzujeme.

Po odběru krve ze srdce (zvíře uhyne) vystříháme cévní segment z dutiny břišní a umístíme ho do vlhké komůrky. Segment zvážíme nejprve celý, pak jej rozstříháme, opláchneme fyziologickým roztokem, vysušíme a znovu zvážíme. Z rozdílu obou hmotností vypočítáme hmotnost trombu (tímto postupem se do jisté míry relativizuje rozdíl v délkách segmentů izolovaných na jednotlivých pracovištích).

Laboratorní část

a) aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas)

Do 0,1 ml plasmy přidáme 0,1 ml kefalinkaolinového reagens a stejné množství 0,025 mol/l CaCl₂. Kefalinová složka reagens aktivuje XII. Hagemannův faktor vnitřní koagulační kaskády. Kaolinová zrna standardně imitují membrány krevních destiček, které byly od plasmy odděleny centrifugací. Koagulační faktory obsažené ve vzorku plasmy po aktivaci kefalinkaolinovým reagens a po přidání 0,025 mol/l CaCl₂ začnou srážet fibrinogen v plasmě na fibrin. Dobu srážení (s) registruje koagulometr jako aPTT.

b) Trombinový čas (TT)

Přidání standardního množství trombinu k plasmě způsobí přeměnu fibrinogenu na fibrin v určitém čase, jehož délka závisí na množství a kvalitě fibrinogenu a na přítomnosti případných inhibitorů krevního srážení.

Do 0,2 ml vyšetřované plasmy přidáme 0,2 ml trombinového reagens. Koagulometr měří čas, za kterou se suspenze srazí.

Prodloužený TT je při snížené hladině fibrinogenu, dysfibrinogenémii, v přítomnosti heparinu a při získaných poruchách koagulace (DIC).

c) Stanovení fibrinogenu dle Clausse

Po přidání vysoce koncentrovaného trombinu ke zředěné plasmě (zředění eliminuje vliv inhibitorů koagulace) je doba koagulace přímo úměrná koncentraci fibrinogenu.

K 0,2 ml vyšetřované plasmy ředěné 1:9 fyziologickým roztokem přidáme 0,2 ml trombinového reagens. Koagulometr změří čas srážení. Z kalibrační křivky pak přímo odečteme koncentraci fibrinogenu v plasmě v g/l.

Zvýšené hodnoty bývají u zánětlivých a neoplastických onemocnění a u akutních interních stavů. Snížené hodnoty nacházíme u hypofibrinogenémie, DIC, při fibrinolytické léčbě, při těžkých poruchách jaterního parenchymu.

5. Výsledky

bez heparinu					s heparinem				
	m trombu [mg]	aPTT [s]	TT [s]	Fgen [g/l]		m trombu [mg]	aPTT [s]	TT [s]	Fgen [g/l]
1.					1.				
2.					2.				
3.					3.				
4.					4.				
5.					5.				
6.					6.				

Výsledky zapsané do tabulky srovnáme pomocí neparametrického nepárového Wilcoxonova testu.

9. Závěr

Zhodnotíme výsledky experimentu na základě provedené statistické analýzy.

12. Experimentálně navozený diabetes mellitus u pokusného zvířete - diagnostický průkaz glukózovým tolerančním testem

Kateřina Kaňková

1. Cíl

Provedení glukózového tolerančního testu k průkazu porušené schopnosti regulace glykémie, popř. manifestního diabetu u pokusného zvířete s experimentálně vyvolaným diabetem. Seznámení se s možnostmi diagnostiky diabetu mellitu a hodnocením nálezů.

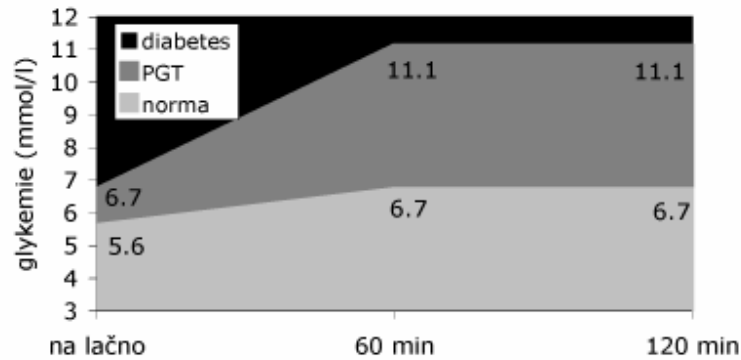
2. Úvod do problematiky

Diabetes mellitus (DM) je syndrom charakterizovaný deficiencí účinku inzulínu. Z hlediska příčin deficitu inzulínu rozeznáváme dva základní typy onemocnění: (1) DM typu I - porucha vzniká v důsledku absolutního nedostatku inzulínu při autoimunitní destrukci β buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu a (2) DM typu II - relativní deficiencie vzniká v důsledku inzulínové rezistence v periferních tkáních normálně citlivých na inzulín (kosterní sval, tuková tkáň, játra).

Při manifestním diabetu je možno zjistit hyperglykémii již nalačno (≤ 6.7 mmol/l v žilní nebo kapilární krvi po osmihodinovém lačnění). Její opakovaný průkaz stačí ke stanovení diagnózy diabetu. Kromě manifestního diabetu ovšem existuje i tzv. porušená glukózová tolerance (PGT), kdy je glykémie nalačno normální, ale po zátěži glukózou dlouho přetrvává hyperglykémie a její maximální hodnota je vyšší než norma (≤ 11.1 mmol/l za dvě hodiny po podání glukózy). K rozlišení sporných případů diabetu a odhalení PGT slouží glukózový toleranční test. U člověka jej v naprosté většině případů provádíme v modifikaci perorální, kdy vyšetřovaný vypije standardní dávku rozpuštěné glukózy (75g) a glykémie se stanovuje v čase 0 (tj. nalačno), za 60 a 120 minut. U pokusného zvířete vzhledem k neschopnosti perorální aplikaci glukózy použijeme modifikaci intraperitoneální. Krev na stanovení glykémie odebíráme z ocasní žíly v čase 0, 30 a 90 minut.

K vyvolání experimentálního diabetu se u zvířat nejčastěji používá alloxan¹ nebo streptozotocin². Obě látky selektivně toxicky poškozují β buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu a vedou v závislosti na dávce k rozvoji různě závažné inzulínopenie, a tedy diabetu typu I. Působení alloxanu podaného intravenózně v dostatečně vysoké dávce je experimentálně dobře popsáno. Alloxan vyvolá nejprve přechodnou stimulaci β buněk, při které dojde k uvolnění intracelulárních zásob inzulínu a vznikne krátkodobá hypoglykémie. Po několika dnech se pak u zvířat objeví inzulínopenie s klasickými příznaky diabetu: hyperglykémie, glykosurie, polydipsie a polyurie. Tíže projevů je závislá na použité dávce: zničení všech β buněk, a tedy kompletní inzulínopenie, je dosaženo dávkou cca 65mg/kg váhy zvířete (potkan), v našem případě volíme záměrně dávku nižší.

Jako průkaz rozvoje DM u potkana provedeme modifikovaný glukózový toleranční test - stanovíme glykémii nalačno a za 30 a 90 min po intraperitoneální aplikaci 20% glukózy.



Obrázek 1. Ukázka hodnocení orálního glukózového tolerančního testu u člověka (plná kapilární, popř. žilní krev)

3. Materiál a metody

Roztok alloxanu ve fyziologickém roztoku (13mg/ml), anestetikum (směs 1% Narkamon + 2% Rometar, 20:1), 20% roztok glukózy, fyziologický roztok, injekční jehly, stříkačky, žiletky, papírová vata, akvárium, éter, operační stolek, nůžky, pinzety, chirurgické jehly, jehlec, šicí materiál, váhy, osobní glukometr, reagenční proužky Glucophan a Ketophan, popř. Diaphan (vše PLIVA Lachema), Petriho miska.

4. Postup

a) Experimentální navození diabetu

Zvíře uvedeme do anestézie (inhalační úvod, anestetická směs 0.5ml/100g i.p.) a fixujeme na operačním stolku v hřbetní poloze. Nůžkami provedeme opatrně incizi kůže na krku ve stř. čáře. Zpřístupníme operační pole v místě, kde se v. jugularis externa zanořuje pod musculus pectoralis a kanylujeme v. jugularis. Cévu nepreparujeme ani jinak netraumatizujeme, intradermální jehlu zavedeme kraniálně přes m. pectoralis a **bez aspirace** aplikujeme roztok alloxanu v objemu 0.1ml/100g váhy zvířete. U kontrolních zvířat stejným způsobem aplikujeme fyziologický roztok. Operační ránu uzavřeme několika stehy. Zvířeti v mezidobí poskytneme náležitou pooperační péči a nutrici, zejm. však dostatečnou hydrataci s ohledem na rozvíjející se hyperglykémii. Další fáze pokusu následuje cca za 5 dní.

b) Glukózový toleranční test

Zvířata obvyklým způsobem uvedeme do narkózy. Okamžitě po nastoupení plné anestézie vyšetříme glykémii nalačno (zvířata jsou v den pokusu lačná). Glykémii stanovíme ze vzorku žilní krve pomocí osobního glukometru dle doporučení výrobce. Potkanovi oťreme proximální část ocasu tamponem navlhčeným v alkoholu. Žiletkou nařízneme příčně kůži v místech, kde probíhá ocasní žíla. Kapku krve opatrně obtiskneme na reagenční zónu proužku. Kapka musí být dostatečně velká, ale nesmí přetéct přes okraje reagenční zóny. Krvácení zastavíme kompresí tamponem. Po změření glykémie nalačno zvířeti aplikujeme 20% glukózu i.p. v dávce 1ml/100g

(tj. 2g/kg). Stejným způsobem změříme glykémii za 30 a 90 minut po podání. V mezičasech mezi měřeními položíme zvíře na břicho a pod pánev vložíme Petriho misku na zachycení moči. Na závěr praktika stanovíme pomocí reagenčních proužků semikvantitativně přítomnost glukózy a ketolátek v zachycené moči.

5. Výsledky

Z jednotlivých naměřených hodnot glykemií zvířat v příslušné skupině (diabetici, kontroly) spočítáme průměry a směrodatné odchylky. Průměrné hodnoty glykemií v jednotlivých časech měření vyneseme do grafu a získáme profily glykemií pro diabetická versus kontrolní zvířata. Statisticky zhodnotíme významnost rozdílu hodnot v 0., 30. a 90. minutě mezi skupinami (neparametrický nepárový test).

6. Závěr

Komentář a interpretace výsledků - došlo působením alloxanu k vyvolání diabetu nebo porušené glukózové tolerance? Co indikuje nález glukózy a ketolátek v moči?

7. Poznámky

¹Alloxan (mesoxalylurea) je organická sloučenina s pyrimidinovou heterocyklickou kostrou. Alloxan je oxidační produkt kyseliny močové, sám je silným oxidačním činidlem. Selektivní působení je umožněno transportem alloxanu do β buněk pomocí GLUT2 (dostává se i do jater, tam je ale detoxifikován). Přechodná hyperinzulinemie je způsobena zvýšením intracelulární hladiny Ca^{2+} (depolarizace membrány alloxanem a inhibice Ca^{2+} -ATP-áz) s následnou stimulací exocytózy inzulinových sekrečních granul. K poruše tvorby a sekrece inzulinu vede jednak inhibice glukokinázy v důsledku její oxidace, ale zejm. vlastní oxidační poškození a destrukce β buněk reaktivními metabolity kyslíku. Při cyklické redukci alloxanu na kyselinu dialurovou a oxidaci zpět na alloxan vzniká superoxid. V dismutační reakci se mění na hydrogenperoxid, který může vstupovat do Fentonovy reakce s Fe^{2+} za vzniku velmi toxického hydroxylového radikálu. Antioxidační kapacita β buněk je narušena zejm. v důsledku oxidace glutathionu alloxanem. Výsledné oxidativní poškození DNA aktivuje reparační enzymy, které pro svou činnost významně spotřebovávají NAD^+ a ATP a narušují tak energetický stav buňky, což může vést k jejímu zániku.

²Mechanismus selektivního účinku streptozotocinu spočívá opět v jeho transportu do β buněk prostřednictvím GLUT2. Vlastním patologickým efektem je alkylace DNA, která podobně jako v případě alloxanu aktivuje reparační pochody sekundárně vyčerpávající buněčný metabolismus.

13. Experimentálně navozená ateroskleróza u pokusného zvířete

Kateřina Kaňková

1. Cíl

- a) Objasnit patogenezi aterosklerózy s důrazem na kauzální efekt endotelového poškození (funkčního i organického) jako důležitého iniciačního faktoru.
- b) Ukázat kumulativní efekt kardiiovaskulárních rizikových faktorů – hypertenze a hypercholesterolemie – na progresi aterosklerózy.

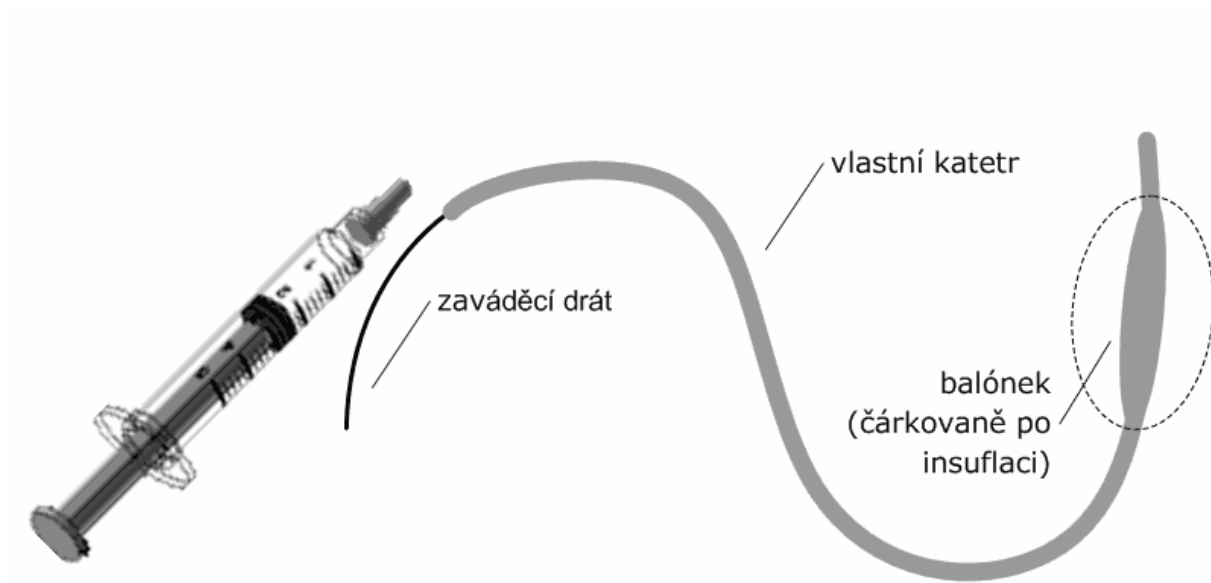
2. Úvod

Jedním z nejdůležitějších a velmi pravděpodobně kauzálních momentů v patogenezi aterosklerózy je poškození endotelu chronickou expozicí chemickým, biologickým i fyzikálním noxiám (např. hypertenze, hypercholesterolemie (zejm. oxidované částice LDL), reaktivní metabolity kyslíku, homocystein, některé mikroorganismy aj.). Zpočátku funkční poškození posléze startuje cévní remodelaci zasahující všechny složky stěny cévy, které je podstatou aterosklerotického procesu. Omezený průtok cévou a obleněná perfúze celé zásobované oblasti, popř. úplný uzávěr aterosklerotickým procesem nebo častěji trombotizací v oblasti aterosklerotického plátu, jsou důvodem klinické manifestace aterosklerózy, nejčastěji v podobě ischemické choroby srdeční, mozku či dolních končetin, akutního infarktu myokardu a cévních mozkových příhod.

3. Materiál a metody

V experimentu budou použiti potkani kmene Wistar. V bodě A, B i C (viz níže Postup) budeme pracovat se dvěma skupinami zvířat – 1) kontrolní (pouze kanylace a. carotis), 2) pokusná (kanylace a. carotis a denudace endotelu). V rámci bodu C budeme srovnávat sledované parametry mezi těmito skupinami zvířat a dále si prohlédneme preparáty zhotovené stejným postupem (body A - C) u dalších dvou exp. modelů: 3) hypertenzní zvířata (operačně navozená hypertenze částečnou ligaturou abdominální aorty, následně kanylace a. carotis a denudace endotelu), 4) hypercholesterolemická zvířata (dietně navozená hypercholesterolemie obohacením potravy o živočišné tuky, následně kanylace a. carotis a denudace endotelu).

Anestetikum, operační stůl a instrumentarium, fyziologický roztok, injekční jehly, stříkačky, Fogartyho arteriální embolektomický katetr 120 602F, 60cm, náplň max. 2ml → Ø 4mm (obr. 1), 0.5% Evansova modř, fixace dle Bouina, alkohol, xylen, parafin, mikrotom, hematoxylin-eosin, protilátky (anti-vWf aj.).

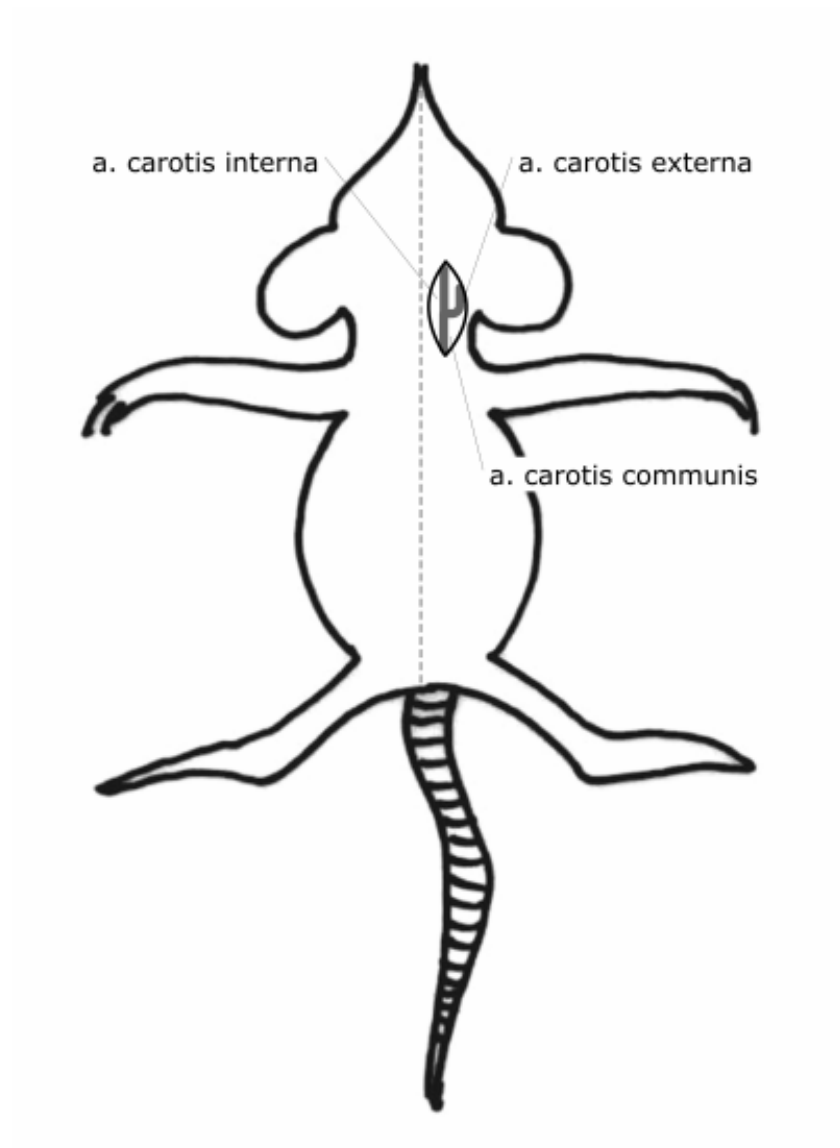


Obrázek 1. Schematicky Fogartyho arteriální embolektomický katetr.

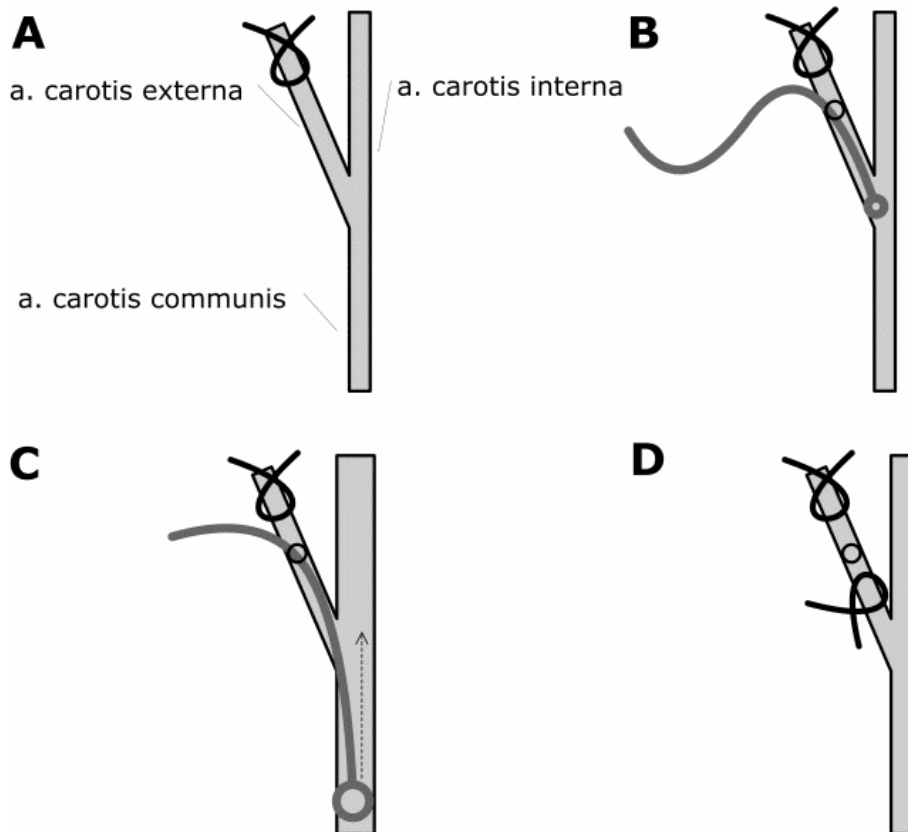
4. Postup

a) Experimentální navození aterosklerózy

Zvíře uvedeme do anestézie (inhalační úvod, anestetická směs 0.5ml/100g i.p.) a fixujeme na operačním stolku v hřbetní poloze. Nůžkami provedeme opatrně incizi kůže na krku poněkud laterálně od střední čáry. Zpřístupníme operační pole v místě, kde se z. a. carotis communis rozděluje na a. externa carotis interna a externa (viz obr. 2). Podvážeme a. carotis ext., zavedeme Fogartyho katetr a provedeme denudaci endotelu nafouknutým balónkovým katetrem (postup detailně viz obr. 3). Poté podvážeme a. carotis externa pod místem vpichu. U kontrolních zvířat postupujeme stejným způsobem ovšem bez nafouknutí balónku. Operační ránu uzavřeme v jedné vrstvě několika jednotlivými stehy. Zvířeti v mezidobí poskytneme náležitou pooperační péči a nutriční.



Obrázek 2. Schéma operačního přístupu a topografie tepen krku.



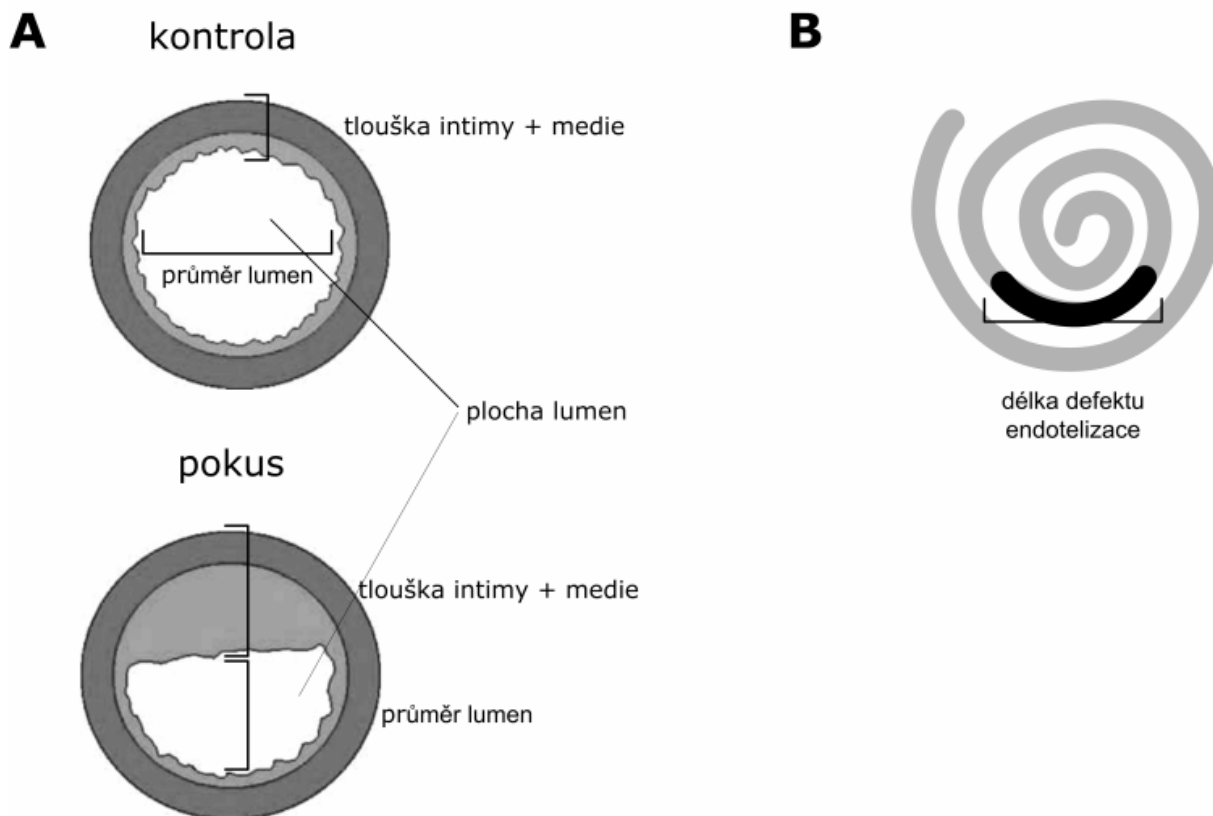
Obrázek 3. Praktické provedení úvodní části experimentu. A – podvaz a. carotis externa, B – zavedení Fogartyho katetru, C – zavedení katetru do a. carotis communis, inflace balónku a deendotelizace zpětným tahem, D – uzavření místa punkce podvazem a. carotis ext.

b) Euthanasie a zhotovení preparátů cév

Zvířata budou utrácena v časových intervalech 3, 14 a 28 dní po provedení denudace endotelu. U poloviny zvířat v každé skupině (nativní preparáty) aplikujeme 1 hodinu před euthanasií Ewansovu modř i.v. do ocasní žíly (1mg/kg). Před euthanasií provedeme pro účely fixace preparátů cév tlakovou perfúzi (proplach fyziol. roztokem a násl. fixace Bouinovou tekutinou po dobu 16-ti hodin). Poté vystříháme cévy, odvodníme, zalijeme do parafinu a krájíme mikrotomem řezy tloušťky $\sim 4\mu\text{m}$. Barvíme přehledně hematoxylin-eosinem a speciálními protilátkami – anti-von Willebrandův faktor (endotel), anti-elastin (tunica media).

c) Hodnocení histologických preparátů cév

Obarvené preparáty prohlédneme ve světelném (H-E, elastin) a fluorescenčním (anti-vWf/DAB/fluorescein) mikroskopu a hodnotíme následující parametry: (i) tloušťku intimy a medie (mm), (ii) průměr lumen, (iii) plochu lumen (mm^2) na příčných řezech cévou a (iv) délku defektu endotelu (mm) na podélných řezech cévou. Schematické znázornění sledovaných parametrů ukazuje obr. 4.



Obrázek 4. Hodnocení sledovaných parametrů na histologických preparátech cév. A – parametry hodnocené na příčných řezech cévou (hematoxylin-eosin), B – podélný řez cévou (technika “roláda”) ukazující (ne)kompletní reendotelizaci (Evansova modř, anti-vWf).

5. Výsledky

U jednotlivých naměřených hodnot (viz tab. 1) spočítáme deskriptivní statistiku (průměry a směrodatné odchylky) a graficky znázorníme (sloupcové, popř. krabicové grafy). Statisticky zhodnotíme významnost rozdílu hodnot v intervalech 3, 14 a 28 dní mezi skupinami kontrolních a pokusných zvířat skupiny 1 a mezi pokusnými zvířaty skupin 1, 2 a 3 (neparametrické nepárové testy).

	kontrola	pokusná 1 (normo TK/CH)	pokusná 2 (↑TK)	pokusná 3 (↑CH)	dny
tloušťka intimy + medie (mm)					3
					14
					28
Ø lumen (mm)					3
					14
					28
plocha lumen					3

(mm²)					14
					28
délka defektu endotelu (mm)					3
					14
					28

6. Závěr

Komentář a interpretace výsledků – došlo v důsledku denudace endotelu k nastartování aterosklerotického procesu? Jak byla progresse aterosklerózy ovlivněna působením dalších kardiovaskulárních rizikových faktorů (hypertenze a hyperlipidemie)? Jakým způsobem se endotel za fyziologických okolností podílí na udržení normálních morfologických a funkčních poměrů v cévě?

14. EKG a arytmie na zvířecím modelu - změny EKG při adrenergní stimulaci, hypokalcemii a hyperkalemii

Kateřina Kaňková

1. Cíl

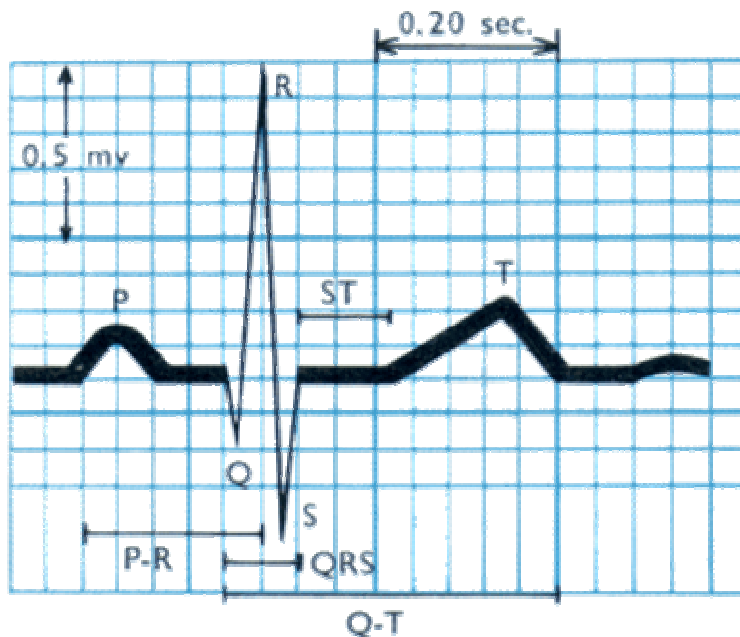
Popsat a vysvětlit příčinu změn EKG při adrenergní stimulaci, hypokalcemii a hyperkalemii, experimentálně vyvolané podáním adrenalinu, blokátorů Ca-kanálů (verapamil) a KCl, jako modelových situací a potenciálně život ohrožujících patofyziologických stavů v humánní medicíně.

2. Úvod do problematiky

Autonomní nervový systém (sympatický prostřednictvím β_1 adrenergních receptorů a parasympatický prostřednictvím M2 cholinergních receptorů) moduluje především rychlost geneze akčního potenciálu v pacemakerových buňkách SA uzlu (chronotropní efekt) a vedení AV junkcí (dromotropní efekt). Adrenergní stimulace má rovněž vliv na kontraktilitu myokardu (inotropní efekt).

Bilance vápníku v organismu je udržována jeho přiměřenou resorpcí z potravy ve střevě (nabídka, vitamin D), regulovanou exkrecí v ledvině (parathormon) a rovnováhou mezi resorpcí a novotvorbou kosti (parathormon, kalcitonin). Celková plazmatická hladina Ca ($2.2 - 2.7 \text{ mmol/l}$) je zhruba z poloviny tvořena ionizovaným, a tedy fyziologicky relevantním, vápníkem; zbytek je vázán na bílkoviny (zejm. albumin) a komplexy s bikarbonátem, fosfátem aj. Ionizace kalcia je ovlivněna pH. Velký vliv na plazmatickou $[\text{Ca}^{2+}]$ mají fosfáty, součin koncentrace kalcia a fosfátů je zhruba konstantní. Pokles hladiny ionizovaného Ca vede ke zvýšení nervosvalové dráždivosti. Hypokalcémie prodlužuje repolarizaci, hyperkalcémie ji naopak zrychluje. Mimo to má kalcium pozitivní inotropní účinek.

Bilance draslíku v organismu ($3.8 - 5.5 \text{ mmol/l}$ v ECT) je určena jeho příjmem potravou a exkrecí ledvinami. Na regulaci exkrece ledvinami se podílejí kromě samotné plazmatické hladiny kalia hormony aldosteron, inzulin a adrenalin. Při zachovalé funkci ledvin nedojde ani při značně zvýšeném příjmu kalia potravou k jeho retenci a hyperkalemii. Závažná hyperkalcémie ($>7 \text{ mmol/l}$) se rozvíjí zpravidla v oligoanurické fázi akutního renálního selhání a při chronickém selhání ledvin, pokud není snížen jeho příjem potravou; k snížení exkrece draslíku dále dochází při hypokortikalismu (např. m. Addison) a při předávkování diuretiky šetřícími K. Nejvýznamnějším projevem hyperkalcémie jsou změny převodu v myokardu, které mohou vyústit v srdeční zástavu.



Obrázek 1. Součásti EKG křivky – záznam jednoho elektrického srdečního cyklu.

3. Materiál

Monitory EKG, zařízení pro záznam EKG, operační stůl pro potkana, skleněné akvárium (inhalační narkóza), narkotikum (směs 1% Narkamon + 2% Rometar, 20:1), kanyly, stříkačky, roztoky: adrenalin 1mg/ml (Epinefrin Léčiva inj., 1mg/ml), verapamil 20mg/ml (Isoptin Abbot, 40mg/tbl.), KCl 12.5% (Kalium chloratum, plv.).

4. Postup

Zvíře uvedeme do celkové anestézie. Po úvodní inhalační narkóze aplikujeme směs Narkamon + Rometar v dávce 0.5 mg/100 g hmotnosti zvířete i.p. Potkana fixujeme na operační stůl, umístíme končetinové EKG svody (jehly jednotlivých končetinových elektrod zavedeme podkožně) a natočíme klidový záznam EKG. Zavedeme intraperitoneální kanylu (periumbilikálně). Do stříkačky natáhneme 2ml roztoku látky pro konkrétní model (adrenalin, verapamil nebo KCl) a pomalu podáme 0.5ml do kanyly i.p. Sledujeme rozvoj EKG změn. Za kontinuálního sledování EKG takto frakcionovaně (po 0.5ml/každých 5-7min) podáme celý objem roztoku (tj. 2ml).

5. Výsledky

Popis výchozí fyziologické EKG křivky, popis časových změn u jednotlivých modelů při kumulativní expozici účinnou látkou.

6. Závěr

Vysvětlení patofyziologického mechanismu elektrofyziologických změn při nadměrné adrenergní

stimulaci, hypokalcémií a hyperkalémií.

15. Model peritoneální dialýzy na laboratorním potkanovi

Julie Bienertová Vašků

1. Cíl

Demonstrovat využití difúzních vlastností peritonea pro ovlivnění hodnot draslíku v organismu. Demonstrovat účinnost peritonea při terapeutickém ovlivňování hyperkalémie při akutním renálním selhání (ARS).

2. Úvod do problematiky

Při peritoneální dialýze se užívají obdobné principy (difúze a filtrace) jako při dialýze klasické, dialyzační membránou je přitom peritoneum, jehož plocha se rovná přibližně ploše tělesného povrchu, průtok krve činí zhruba 70 ml/min. Velkou výhodou peritoneální dialýzy je vyšší kvalita života pacienta a absence krevních ztrát, nebezpečím je zejména zvýšené riziko peritonitidy.

Úkolem je sledování EKG změn po podání dialyzačního roztoku o různé koncentraci K⁺ u laboratorního potkana, jehož ledviny jsou nefunkční (v důsledku působení toxické noxy) a u nějž se tedy v důsledku ARS rozvíjí hyperkalémie.

3. Materiál a metody

Anestetická směs (1% Narcamon s Rometarem), injekční stříkačky, inj. jehly, kanyla (pro periferní žílu člověka), nitě, 2 pinzety, preparační stolek, chirurgické instrumentárium, tampony, papírová vata, gáza, EKG monitor se svody, roztok pro peritoneální dialýzu, 7,5% roztok KCl, roztok 0,1M HCl, bromfenolová červeň (indikátor pH 5.0 - 6.8), kapilára na stanovení Astrupova vyšetření

4. Postup

Cílem je u experimentálního zvířete navodit toxickým poškozením akutní renální selhání s manifestní hyperkalémií a sledovat efekt peritoneální dialýzy na rozvoj této hyperkalémie. Laboratorního potkana uvedeme do celkové anestézie obvyklým způsobem pomocí diethyletheru, intraperitoneálně 1% Narcamonu a Rometaru (0,5ml/100g). Nejdříve provedeme odběr krve z ocasní žíly na stanovení normálních hodnot acidobasické rovnováhy. Po provedení kožního řezu aplikují studenti pracující s kontrolní skupinou zvířat přes musculus

pectoralis do v. jugularis fyziologický roztok a studenti pracující s experimentální skupinou roztok ethylenglykolu v množství 0,15ml/100 g tělesné hmotnosti. Po 15 min asi v polovině vzdálenosti mezi spina iliaca anterior a pupkem zavedeme kanylu s jehlou, po proniknutí břišní stěnou jehlu odstraníme a kanylu zasuneme ještě asi o 1 cm hlouběji do dutiny břišní a zafixujeme leukoplastí.. Z roztoku pro peritoneální dialýzu a roztoku KCl připravíme roztoky o koncentraci 0, 4 a 10 mmol/l. Potkany připojíme k EKG a provedeme výchozí záznam před aplikací dialyzačního roztoku. Posluchači změní pravítkem na EKG 10 komplexů QRS a spočítají průměrnou hodnotu v mm. Kontrolní skupina provede dialýzu s roztokem o koncentraci 4 mmol/l, další 2 skupiny s koncentracemi 0 a 10 mmol/l (celkové množství roztoku vpraveného do dutiny břišní je až 30 ml). Studenti budou kontinuálně sledovat EKG a po nástupu změn provedou zápis EKG křivek. U jednotlivých EKG změn bude zaznamenán čas od podání dialyzačního roztoku do vzniku příslušných změn, které studenti popíší. Po zachycení nesporných známek hyper- nebo hypokalémie na EKG se provede odběr venózní krve z ocasní žíly na stanovení parametrů ABR. Nakonec studenti po otevření hrudníku provedou intrakardiální odběr 1,5 ml srážlivé krve. Otevřením hrudníku a punkcí srdce zvíře uhynie. Krev zcentrifugujeme (10 min při 3000 ot/min), stáhneme plasmu a provedeme acidimetrické stanovení alkalické rezervy. Ke vzorku 500 µl plasmy přidáme 10 µl indikátoru (bromfenolová červeň) a titrujeme 0,1M HCl po 1,0 µl. Zaznamenáme spotřebu HCl a orientačně porovnáme alkalickou rezervu.

5. Závěr

Vysvětlit patofyziologický mechanismus hyperkalémie při ARS, statistické zhodnocení výsledků (formulace nulové a alternativní hypotézy, výběr vhodného statistického testu)

16. Stanovení kinetiky vylučování inulinu ledvinami

Michal Jurajda

1. Cíl

Vysvětlit princip stanovení glomerulární filtrační rychlosti (GFR) pomocí stanovení ledvinné clearance inulinu. Demonstrovat na zvířecím modelu změny GFR při snížení počtu funkčních glomerulů podvazem jedné renální arterie.

2. Úvod do problematiky

Glomerulární filtrační rychlost udává množství glomerulárního ultrafiltrátu (primární moče) vyprodukovaného za jednotku času. Pokles GFR je významným ukazatelem poškození funkce ledvin – ledvinného selhání. Stanovení clearance inulinu umožňuje určit GFR při nemožnosti kvantitativního sběru moče vyšetřovaného subjektu.

3. Materiál a metody

Inulin, spektrofotometr, kyvety, operační instrumentárium, anestetická směs (1% Narcamon s Rometarem), roztok polyfruktosanu (25mg/1,5ml fyziologického roztoku), 75 mmol/l roztok kyseliny beta-indolyloctové v methanolu, koncentrovaná kyselina chlorovodíková, 0,5 % roztok Tritonu X-100, spektrofotometr, centrifuga, pipety, injekční stříkačky, inj. jehly, nitě, 2 pinzety, preparační stolek, tampony, papírová vata, gáza.

4. Postup

Laboratorního potkana uvedeme do celkové anestézie obvyklým způsobem pomocí diethyletheru, poté podáme intraperitoneálně směs 1 % Narcamonu a Rometaru (0,5ml/100g). Provedeme střední laparotomii v linea alba, izolujeme v. cava inferior a podvlečeme ligaturu pod arteria renalis sinistra. Studenti pracující s kontrolní skupinou potkanů nechají ligaturu nezataženou, studenti pracující s experimentální skupinou zaváží ligaturu, a tím zruší přítok krve do levé ledviny. Dále provedeme chirurgické zpřístupnění v. jugularis, kam aplikujeme polyfruktosan (PFS 25mg/1.5ml fyziologického roztoku). V předem stanoveném intervalu (po 5, 10, 15 a 30 min) otevřeme hrudník a intrakardiálně odebereme 1,5 ml srážlivé krve. Otevřením hrudníku a punkcí srdce zvíře uhynie.

Krev zcentrifugujeme (10min při 3000ot/min). Do zkumavek pipetujeme 50 ml roztoku indolyloctové kyseliny (75mmol/l), 1,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 50 ml biologického materiálu (sérum). Promícháme, inkubujeme při 60°C 10 min a pak přidáme 50 µl Tritonu X-100 (0,5 %). Po ochlazení měříme v kyvetě při 520 nm, absorbanci testu odečítáme

proti kompenzaci testu. Výpočet koncentrace PFS ve vzorku se provede běžným způsobem ze změřených absorbancí testu, standardu a známé koncentrace standardu. Protože známe křivku závislosti koncentrace standardně zředěného inulinu na absorbanci, je možné odečíst koncentraci vzorku i z grafu. Pokles plazmatických koncentrací probíhá v exponenciální závislosti na čase, takže nanese-li jednotlivé body na semilogaritmický papír, dostáváme přímku.

5. Výsledky

Stručný návod k hodnocení daného praktika – poznámky ke statistice.

6. Závěr

Několik poznámek k možné interpretaci výsledků, např. očekávaný nárůst hodnot je... možné zdroje chyb při měření, atd.

17. Renální ischemie, vznik reninu v ledvině

Julie Bienertová-Vašků

1. Cíl

Ischemizace ledviny u laboratorního potkana, zhodnocení makroskopických změn a mikroskopické sledování granul reninu v ischemizované a neischemizované ledvině.

2. Úvod do problematiky

Omezení perfúze parenchymu ledvin je spojeno s aktivací systému renin- angiotenzin- aldosteron (RAAS). V důsledku protražované těžké ischemie se snížením nutričního průtoku (a velmi často s morfologickými změnami) vzniká ischemické akutní renální selhání. Na vzniku ischemického ARS se podílejí čtyři hlavní mechanismy:

1. pokles průtoku krve, zejména kúrou ledviny
2. snížení permeability glomerulární kapilární stěny
3. reflux filtrátu z tubulů do intersticia ledvin
4. tubulární obstrukce

Dlouhodobá ischemie endotelu v renálních cévách snižuje produkci vazodilatačních působků (NO, prostacyklin) a stimuluje uvolnění vazokonstrikčních látek typu endotelinu. Poškození buněk tubulů a ztráta resorpční schopnosti vede k nadměrnému přísunu solutů do oblasti macula densa distálního tubulu s aktivací tubuloglomerulární zpětné vazby a konstrikcí aferentních arteriol ústící v pokles glomerulární filtrace.

3. Materiál a metody

Anestetická směs (1% Narcamon s Rometarem), injekční stříkačky, inj. jehly, kanyla (pro periferní žílu člověka), nitě, 2 pinzety, preparační stolek, chirurgické instrumentárium, tampony, papírová vata, gáza, EKG monitor se svody, váhy, preparáty, mikroskop.

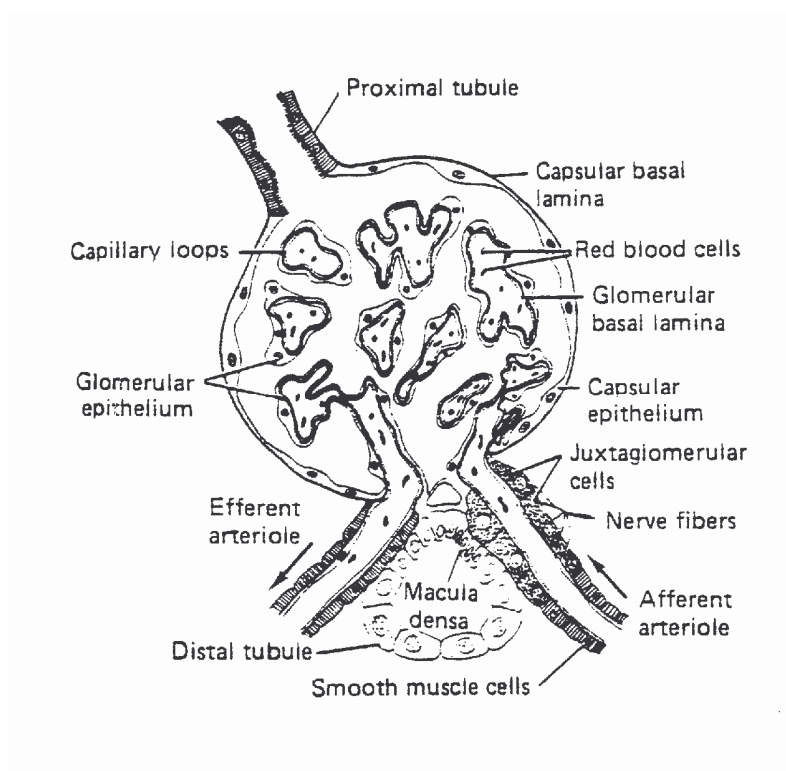
4. Postup

Levá a. renalis odstupuje z aorty distálněji než pravá. Proto je experiment modifikován tak, že stenosa se provádí na aortě mezi odstupem obou renálních tepen. Při provádění stenosis aorty musíme dbát na přítomnost odstupující a. mesenterica a podvaz volit tak, aby byl umístěn mezi a renalis sin. a a. mesenterica. Pravá ledvina je intaktní. Tato ledvina hypertrofuje, zatímco hypoperfundovaná levá ledvina se zmenšuje. Laboratorní potkan po výkonu přežívá cca jeden měsíc.

Laboratorního potkana uvedeme do celkové anestézie obvyklým způsobem pomocí diethyletheru, intraperitoneálně 1% Narcamonu a Rometaru (0,5ml/100g). Potkana upevníme v poloze na zádech na pracovní stůl a provedeme laparotomii ve střední rovině od processus xiphoideus po symfýzu. Rozevřeme operační ránu a jemnou tupou pinzetou odpreparujeme v. cava inf. od aorty v místě mezi oběma aa. renales. Peánem provedeme tupou preparaci abdominální aorty a opatrně protáhneme pod aortou šicí vlákno. Na aortu jemně přiložíme připravenou otupělou jehlu o průměru 0.5 mm, paralelně s osou cévy a naložíme několika uzly ligaturu aorty s jehlou. Jehlu odstraníme. Dutinu břišní po vrstvách zavřeme (sval- pokračovací steh, kůže- jednotlivé stehy).

Po třech týdnech provedeme oboustrannou nefrektomii. Očistíme obě ledviny, společně s myokardem zvážíme a zapíšeme do protokolu.

Následuje histologická analýza přítomnosti epiteloidních buněk v ledvině u potkana kontrolního a experimentálního a histochemický průkaz zvýšené produkce reninu v ischemizované ledvině.



Obrázek 1: Detail juxtaglomerulárního aparátu ledvin

5. Závěr

Vysvětlit patofyziologický mechanismus hypertenze při ischemickém akutním renálním selhání, statistické zhodnocení výsledků (formulace nulové a alternativní hypotézy, výběr vhodného statistického testu pro porovnání váhy ischemizované a neischemizované ledviny u pokusného zvířete). Stručný popis Goldblattova pokusu dvou a jedné ledviny.