

# **Priručnik za vježbe iz biokemije** za studente stomatologije

Interna skripta

**Zagreb, 2022.**

Prema 4. obnovljenom i preuređenom izdanju  
**Priručnika za vježbe iz medicinske kemije i biokemije za studente medicine**

Medicinska naklada, Zagreb, 2020.

autora nastavnika i suradnika Katedre za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu – abecednim redom:

doc.dr.sc. Tamara Božina

dr.sc. Danijela Cvijanović

doc.dr.sc. Vladimir Damjanović

prof.dr.sc. Ivančica Delaš

doc.dr.sc. Dragana Fabris

izv.prof.dr.sc. Blaženka Foretić

prof.dr.sc. Svjetlana Kalanj Bognar

doc.dr.sc. Ivana Karmelić

prof.dr.sc. Jasna Lovrić

doc.dr.sc. Kristina Mlinac Jerković

izv.prof.dr.sc. Daria Pašalić

doc.dr.sc. Igor Picek

doc.dr.sc. Slavica Potočki

prof.dr.sc. Jadranka Sertić

prof.dr.sc. Željka Vukelić

Pripremile:

doc.dr. sc. Dragana Fabris

doc.dr. sc. Ivana Karmelić

doc.dr.sc. Kristina Mlinac Jerković

prof. dr. sc. Jasna Lovrić

## Sadržaj

<b>Vježba 1.</b> Proteini.....	1
<b>Vježba 2.</b> Enzimska kinetika.....	6
<b>Vježba 3.</b> Metode u analizi biološkog materijala.....	10
<b>Vježba 4.</b> Ugljikohidrati.....	20
<b>Vježba 5.</b> Porfirini i žučne boje.....	24
<b>Vježba 6.</b> Acido-bazni i mineralni status organizma.....	31
<b>Vježba 7.</b> Lipidi.....	43
<b>Vježba 8.</b> Analiza mokraće.....	49
<b>Vježba 9.</b> Nukleinske kiseline.....	56
<b>Literatura</b> .....	64

## Vježba 1.

### PROTEINI

*Svrha je vježbe upoznati metode kvalitativnog i kvantitativnog određivanja aminokiselina i proteina, te primijeniti jednostavne metode razdvajanja i detekcije aminokiselina u biološkim uzorcima.*

Proteini su, nakon vode, masenim udjelom najznačajniji sastojak svih stanica i krvne plazme. Svi prirodni peptidi i proteini izgrađeni su od 20 aminokiselina, a slijed aminokiselina, a time i struktura proteina kodiran je nukleinskim kiselinama. Pored toga što aminokiseline izgrađuju proteine, one imaju i druge važne funkcije u živim organizmima. U metaboličkim se procesima koriste kao ishodni spojevi za sintezu brojnih biološki značajnih spojeva. U krvi i mokraći je u slobodnom obliku prisutno svih 20 aminokiselina. Koncentracija slobodnih aminokiselina varira u rasponu od 0,30-0,35 g/L. Budući da brojne bolesti izravno utječu na koncentraciju pojedinih aminokiselina u krvi i mokraći, razvijene su jednostavne i automatizirane metode dokazivanja i određivanja količine svih aminokiselina što omogućuje brzu i točnu dijagnostiku.

Kratki polimeri aminokiselina koji sadrže manje od 50 aminokiselina povezanih peptidnom vezom nazivaju se peptidima. Peptidi imaju vrlo bitne biološke uloge. Najpoznatiji peptidi su s jedne strane hormoni (inzulin, oksitocin i dr.), a s druge antibiotici (gramicidin A, tirocidin, bacitracin). Pored toga, peptidi mogu obavljati funkciju neuroprijenosnika ili koenzima. Frederick Sanger je 1953. godine prvi odredio aminokiselinski slijed peptidnog hormona inzulina. Ovim radom prvi puta se dokazalo da protein ima definiran aminokiselinski slijed i da su sve aminokiseline u proteinu L-aminokiseline.

Proteini se od peptida razlikuju po složenosti građe i veličini molekula. Osim što služe kao građevni sastojci svih staničnih struktura, proteini sudjeluju u gotovo svim biološkim procesima stanica i organizma, što govori o njihovim značajnim i raznovrsnim biološkim funkcijama čije je razumijevanje moguće jedino poznavanjem strukture proteina. Patofiziološka stanja organizma praćena su promjenom koncentracije aminokiselina i proteina te aktivnosti enzima. Stoga se određivanjem koncentracije proteina ili aktivnosti pojedinog enzima u biološkom uzorku (krv, plazma, likvor, urin, želučani sok) dobivaju važni dijagnostički podaci.

U vodi se proteinske molekule otapaju stvarajući makromolekularne koloide. Pod utjecajem različitih čimbenika može doći do razaranja native konformacije proteina, što dovodi do gubitka njegove biološke funkcije ili denaturacije. Potpuno denaturirani protein poprima različite nasumične konformacije (konformacija slučajnog klupka) koje su biološki inaktivne. Do denaturacije proteina najčešće dolazi pod utjecajem povišene temperature, promjene pH (pri ekstremno niskim i visokim vrijednostima pH), djelovanjem specifičnih agensa (denaturansa), dodatkom organskih otapala, pri povećanoj koncentraciji soli (taloženje ili isoljavanje proteina), dodatkom teških metala ( $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ) te dodatkom različitih oksidansa i reducensa.

#### **Zadatak 1.** Analiza proteina mucina u slini

Mucini su glikoproteini velike molekulske mase s visokim sadržajem ugljikohidrata (oko 50%). Proteinski dio mucina čini polipeptidni lanac koji je u najvećoj mjeri sastavljen od aminokiselina prolina, serina i treonina. Za razliku od središnjeg dijela na kojem dolazi do intenzivne O-glikozilacije, amino- i karboksi-terminalni krajevi monomera mucina su slabo glikozilirani i bogati su aminokiselinom cisteinom koja je nužna za stvaranje disulfidnih mostova unutar i između monomera mucina.

Mucini su glavni sastojak viskoznog mukusa prisutnog u sekretu gastrointestinalnog, respiracijskog i reproduktivnog trakta. Glavne uloge mucina su zaštita i podmazivanje (lubrikacija) sluznice usta, slinu čini gušćom i ljepljivijom te olakšava gutanje hrane i govor. Također, mucini su uključeni i u antimikrobnu zaštitu usne šupljine i stoga su značajan čimbenik u prevenciji zubnog karijesa.

### 1.1. Određivanje prisutnosti mucina u slini (Molishov test)

#### **Reagensi i pribor**

Otopina  $\alpha$ -naftola u apsolutnom etanolu

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konc.

H<sub>2</sub>O dest.

Uzorak: razrijeđena slina (destilirana voda:slina (v/v) 1:1)

Epruvete i kapalice

#### **Načelo**

Molischov test (Molisch-Udranski) koristi se za dokazivanje slobodnih ili vezanih ugljikohidrata, a u ovoj reakciji služi za dokazivanje šećernih ostataka glikoproteina mucina. Reakcija se temelji na dehidraciji molekula šećera sulfatnom kiselinom pri čemu od pentozna nastaje furfural, a od heksoza 5-hidroksimetilfurfural. Furfural i njegovi derivati s fenolima (timol,  $\alpha$ -naftol, rezorcinol) stvaraju obojene kondenzacijske produkte.

#### **Postupak**

**Ovu reakciju izvodite u digestoru!** U 1 mL razrijeđene sline dodajte nekoliko kapi alkoholne otopine  $\alpha$ -naftola i promiješajte. Pažljivo dodajte 1-2 mL koncentrirane sulfatne kiseline (podlijte uz stijenke epruvete, bez miješanja) do pojave odvojenih slojeva.

Što ste uočili?

### 1.2. Taloženje mucina sline

#### **Reagensi i pribor**

Koncentrirana octena kiselina

Uzorak: razrijeđena slina (destilirana voda:slina (v/v) 1:1)

Epruvete i kapalice

#### **Načelo**

Na krajevima oligosaharidnih bočnih lanaca kod pojedinih mucina nalazi se *N*-acetilneuraminska kiselina koja svojim položajem utječe na topljivost odnosno stabilnost mucina. Zahvaljujući potpunoj disocijaciji karboksilne skupine *N*-acetilneuraminske kiseline ( $pK_a=2,6$ ) onemogućeno je taloženje mucina zbog odbijanja istih naboja koji se nalaze na maloj udaljenosti.

Taloženje mucina sline provodi se pomoću koncentrirane octene kiseline koja, kao jača kiselina, suzbija disocijaciju karboksilne skupine slabije *N*-acetilneuraminske kiseline.

## Postupak

U 1-2 mL razrijeđene sline dodajte 3 kapi koncentrirane octene kiseline.  
Što ste uočili?

### **Zadatak 2.** Kvantitativne metode određivanja proteina

Najčešće primjenjivane fizikalno-kemijske metode za određivanje koncentracije ukupnih proteina u različitim biološkim uzorcima su kolorimetrijske metode: biuretska metoda, metoda po Lowryju i metoda po Bradfordu. Navedene metode se zasnivaju na kemijskoj reakciji proteina s reagensom pri čemu nastaje karakteristično obojenje otopine čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku. Koncentracija proteina ovisi o broju i sastavu aminokiselina te ovakva mjerenja zahtijevaju primjenu proteinskog standarda čiji je sastav jednak ili sličan proteinu koji se analizira. Izbor metode i postupka ovisi o vrsti i količini ispitivanog uzorka, o pretpostavljenoj koncentraciji proteina u uzorku kao i o potrebnoj preciznosti mjerenja.

#### ***Biuretska metoda***

- temelji se na reakciji iona  $\text{Cu}^{2+}$  u slabo lužnatom mediju sa susjednim atomima dušika peptidnih veza u polipeptidnom lancu;
- nastali ljubičasto obojani kelatni spoj ima maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 540 nm;
- manje osjetljiva na vrstu proteina koji se određuje;
- prikladna za analizu otopina proteina u koncentracijama 1,0 – 10 mg/mL.

#### ***Metoda po Bradfordu***

- brza, jednostavna i niskog praga osjetljivosti;
- temelji se na vezanju boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) na proteine u kiselom mediju što je praćeno promjenom boje iz smeđe u plavu pri čemu se apsorpcijski maksimum pomiče s valne duljine 465 nm na 595 nm;
- prikladna za određivanje koncentracije proteina u sadržaju određene stanične frakcije kao i pri procjeni količine proteina potrebne za gel-elektroforezu;
- donji prag osjetljivosti iznosi 0,5  $\mu\text{g/mL}$  proteina.

#### ***Metoda po Lowryju***

- kombinira biuretsku metodu i reakciju redukcije fosfomolibdata i fosfovolframata u Folin-Ciocalteuovu reagensu djelovanjem fenolnih spojeva (npr. tirozina) dajući plavo-ljubičasti kompleks s maksimumom apsorpcije pri valnoj duljini od 740 nm;
- osjetljivost ove metode je 10-100  $\mu\text{g}$  proteina.

## 2.1. Određivanje koncentracije proteina metodom prema Lowryju

### Reagensi i pribor

A: 2%-tna otopina  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH (bezvodni  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

B: 0,5%-tna otopina  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

C: 2%-tna otopina K, Na-tartarata

Lowryjev reagens: 100 mL otopine A + 1 mL otopine B + 1 mL otopine C

Folin- Ciocalteuov reagens: 1 mL otopine Folin-Ciocalteua + 2 mL destilirane  $\text{H}_2\text{O}$

Standardna otopina: otopina goveđeg serumskog albumina u vodi BSA (eng. *bovine serum albumin*), 1 mg/mL

Uzorak: otopina albumina nepoznate koncentracije

Spektrofotometar, vibracijska miješalica (Vortex), epruvete 12 mm  $\times$  100 mm, automatska pipeta

### Postupak

Prema donjoj tablici pripremite:

- slijepu probu;
  - pet reakcijskih smjesa (1-5) - razrjeđenja standardne otopine (BSA);
  - reakcijsku smjesu uzorka nepoznate koncentracije (proba).
- U svaku epruvetu dodajte po 2,0 mL Lowry reagensa (prema tablici), sadržaj epruveta promiješajte i ostavite 10 minuta na sobnoj temperaturi.
  - U svaku epruvetu brzo dodajte 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteuova reagensa\* uz snažno miješanje na vibracijskoj miješalici. Ostavite na sobnoj temperaturi 30 minuta\*\*.
  - Nakon razvijanja boje izmjerite apsorbanciju prema slijepoj probi na spektrofotometru ( $\lambda=750 \text{ nm}$ ).

Broj epruvete	slijepa proba	1	2	3	4	5	proba
V(standardne otopine, BSA)/ $\mu\text{L}$	–	10	20	30	40	50	–
V(destilirane vode)/ $\mu\text{L}$	200	190	180	170	160	150	–
V(uzorka)/ $\mu\text{L}$	–	–	–	–	–	–	200
V(Lowry reagensa)* /mL	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
inkubacija	10' na sobnoj temperaturi						
V(Folin-Ciocalteu reagens)** /mL	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
inkubacija	30' na sobnoj temperaturi						

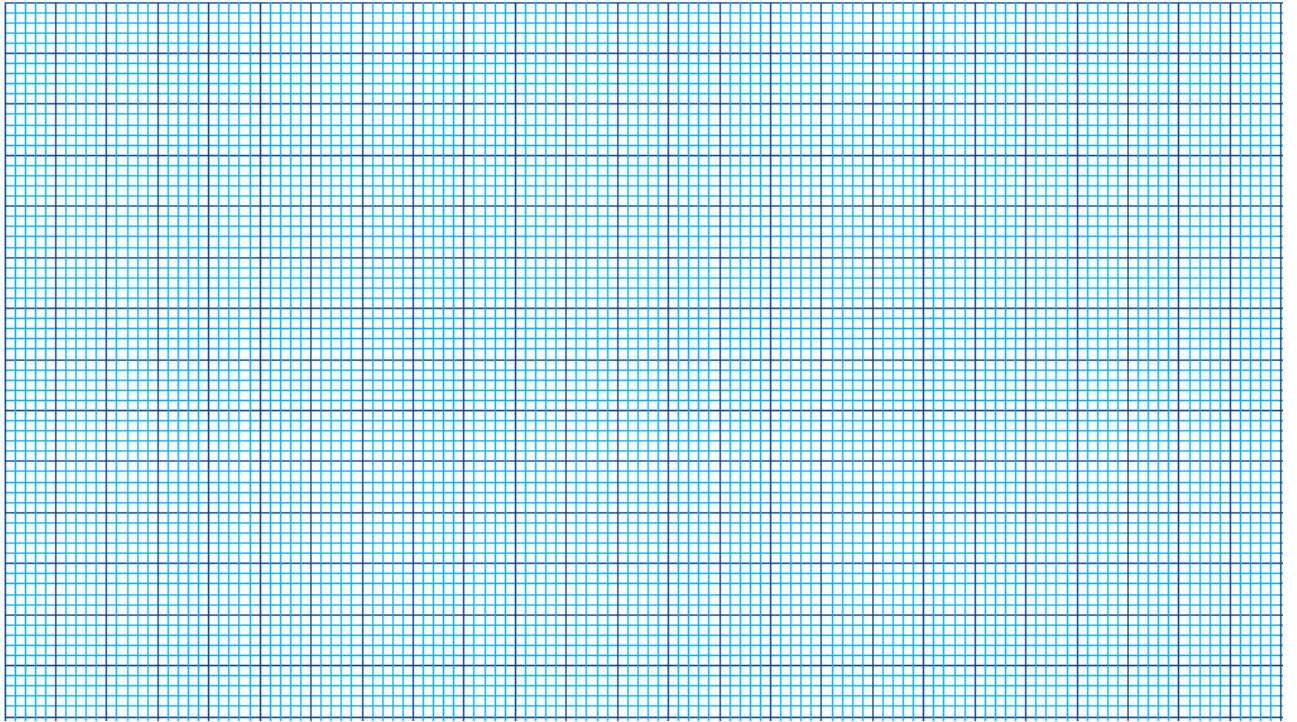
Napomena: \*Folin-Ciocalteuov reagens je nestabilan u jako lužnatoj otopini (Lowry reagens) pa se mora dodati brzo i promiješati; \*\*Boja je postojana unutar intervala 30-60 minuta.

### Rezultati

Izračunajte koncentraciju BSA u svakom pojedinom uzorku standardnog niza i podatke upišite u tablicu. U tablicu upišite i izmjerene vrijednosti apsorbancije uzorka standardnog niza i probe.

Broj epruvete	1	2	3	4	5	proba
$\gamma(\text{proteina})/\text{mg/mL}$						
A						

Na osnovi izmjerenih vrijednosti apsorbancije standardnog niza pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 740 nm ( $A_{740}$ ) konstruirajte baždarni dijagram ovisnosti  $A_{740}$  o koncentraciji proteina u otopini. Vrijednost dobivene apsorbancije uzorka ucrtajte u koordinatu baždarnog dijagrama te pomoću baždarnog pravca očitajte koncentraciju proteina u uzorku.



$\gamma$  (proteina) = \_\_\_\_\_ g/L

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_



## Vježba 2.

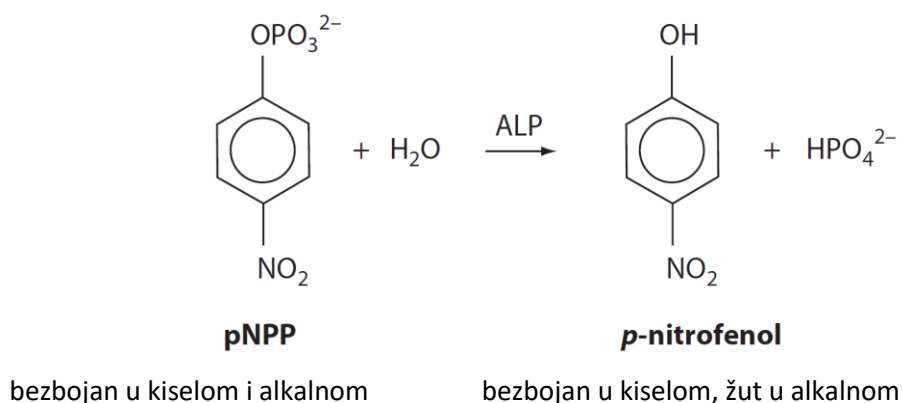
### ENZIMSKA KINETIKA

Svrha je vježbe na primjeru enzima alkalne fosfataze upoznati se s enzimskom kinetikom i čimbenicima o kojima ovisi.

Fosfataze su enzimi grupne specifičnosti iz skupine hidrolaza koji kataliziraju hidrolizu fosfatnih monoestera. Budući da postoje razlike u aktivnosti pojedinih fosfataza ovisno o optimalnoj vrijednosti pH, dijelimo ih u dvije glavne skupine: kisele (ACP, pH 4,9–5) i alkalne (ALP, pH 9,8–10,5). U ljudskom serumu prisutno je više oblika enzima koje nazivamo izoenzimi (iako se ovdje ne radi o klasičnim izoenzimima). Izoenzimi alkalne fosfataze prisutni u serumu u najvećoj mjeri potječu iz kostiju i jetre u omjeru koji je ovisan o dobi, odnosno spolu. Preostali izoenzimi alkalne fosfataze su intestinalnog, placentalnog, žučnog i bubrežnog podrijetla.

#### Zadatak 1. Utjecaj koncentracije supstrata na brzinu enzimске reakcije - određivanje $K_M$ i $V_{max}$

Eksperimentalno određivanje ovih vrijednosti provest ćete na primjeru alkalne fosfataze u serumu. Alkalna fosfataza katalizira reakciju hidrolize fosfomonoestera pri čemu nastaju alkohol i fosfat. Za određivanje aktivnosti fosfataze kao univerzalni supstrat koristi se *p*-nitrofenilfosfat (pNPP).



Nastali *p*-nitrofenol u lužnatom mediju ionizacijom daje žuti *p*-nitrofenolatni ion kojem se koncentracija određuje spektrofotometrijski pri valnoj duljini 400–420 nm. Intenzitet boje razmjernan je koncentraciji nastalog produkta te stoga i aktivnosti fosfataze.

#### Reagensi i pribor

Supstrat: *p*-nitrofenilfosfat,  $c(\text{pNPP}) = 10 \text{ mmol/L}$

Pufer: glicin/NaOH, pH = 10,5

Otopina NaOH,  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$

Uzorak: serum

Stalak s epruvetama, automatske pipete, vibracijska mješalica, termostatirana kupelj, spektrofotometar

#### Postupak

Prema planu pipetiranja priredite šest reakcijskih smjesa koje sadržavaju različite koncentracije supstrata. Obilježene epruvete stavite u kupelj termostatiranu na 37°C.

Nakon desetak minuta u svaku epruvetu dodajte zadani volumen otopine enzima (serum), zabilježite vrijeme početka reakcije i promiješajte reakcijske smjese te **epruvete vratite u kupelj** na 37°C. Nakon **točno** 10 minuta zaustavite reakciju dodatkom 0,50 mL otopine NaOH, promiješajte smjese i izmjerite im apsorbanciju prema vodi pri valnoj duljini od 405 nm.

broj epruvete	1	2	3	4	5	6
V(ot. pNPP)/mL	0,10	0,15	0,20	0,30	0,50	1,00
V(pufer pH 10,5 )/mL	1,35	1,30	1,25	1,15	0,95	0,45
Termostatiranje	10-ak min pri 37°C					
V(serum)/mL	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Vrijeme reakcije	TOČNO 10 min pri 37°C					
V(ot. NaOH)/mL	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

Izračunajte početnu koncentraciju supstrata u svakoj reakcijskoj smjesi.

$$c(\text{pNPP})_1 = \qquad \qquad \qquad c(\text{pNPP})_2 =$$

$$c(\text{pNPP})_3 = \qquad \qquad \qquad c(\text{pNPP})_4 =$$

$$c(\text{pNPP})_5 = \qquad \qquad \qquad c(\text{pNPP})_6 =$$

Za svaku koncentraciju supstrata načinite slijepu probu prema sljedećoj tablici:

broj epruvete	1	2	3	4	5	6
V(ot.pNPP)/mL	0,10	0,15	0,20	0,30	0,50	1,00
V(pufer pH 10,5)/mL	1,35	1,30	1,25	1,15	0,95	0,45
V(ot. NaOH)/mL	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
V(serum)/mL	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Izmjerite vrijednosti apsorbancije slijepih proba prema vodi i oduzmite ih od vrijednosti apsorbancije dobivenih za enzimsku reakciju pri odgovarajućoj koncentraciji supstrata. Vrijednosti upišite u tablicu.

broj epruvete	1	2	3	4	5	6
A(konačna smjesa)						
A(slijepa proba)						
$\Delta A$						

Za svaku se koncentraciju supstrata izračuna vrijednost brzine enzimske reakcije kao promjena koncentracije produkta reakcije u vremenu.

$$v = \frac{\Delta c(p - \text{nitrofenol at})}{\Delta t}$$

Točna koncentracija nastalog *p*-nitrofenolata u reakcijskoj smjesi (volumena 1,50 mL) može se izračunati iz izmjerene apsorbancije *p*-nitrofenolata u konačnoj smjesi (volumena 2,00 mL) preko Lambert-Beerova zakona ako se uvede faktor korekcije za razrjeđenje. Stoga je u izrazu za brzinu reakcije izmjerenu vrijednost apsorbancije *p*-nitrofenolata nužno pomnožiti faktorom korekcije.

$$v = \frac{\Delta A F}{\varepsilon(p\text{-nitrofenolat}) l \Delta t}$$

*v* – brzina enzimske reakcije (mmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>)

$\Delta A$  – apsorbancija produkta (*p*-nitrofenolatni ion) u konačnoj smjesi (razlika apsorbancija konačne smjese i slijepe probe)

*F* – faktor korekcije za razrjeđenje koji iznosi 2/1,5 (omjer volumena konačne smjese nakon dodatka otopine NaOH i reakcijske smjese)

$\varepsilon$  – molarni koeficijent apsorpcije *p*-nitrofenolatnog iona koji iznosi 18,2 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

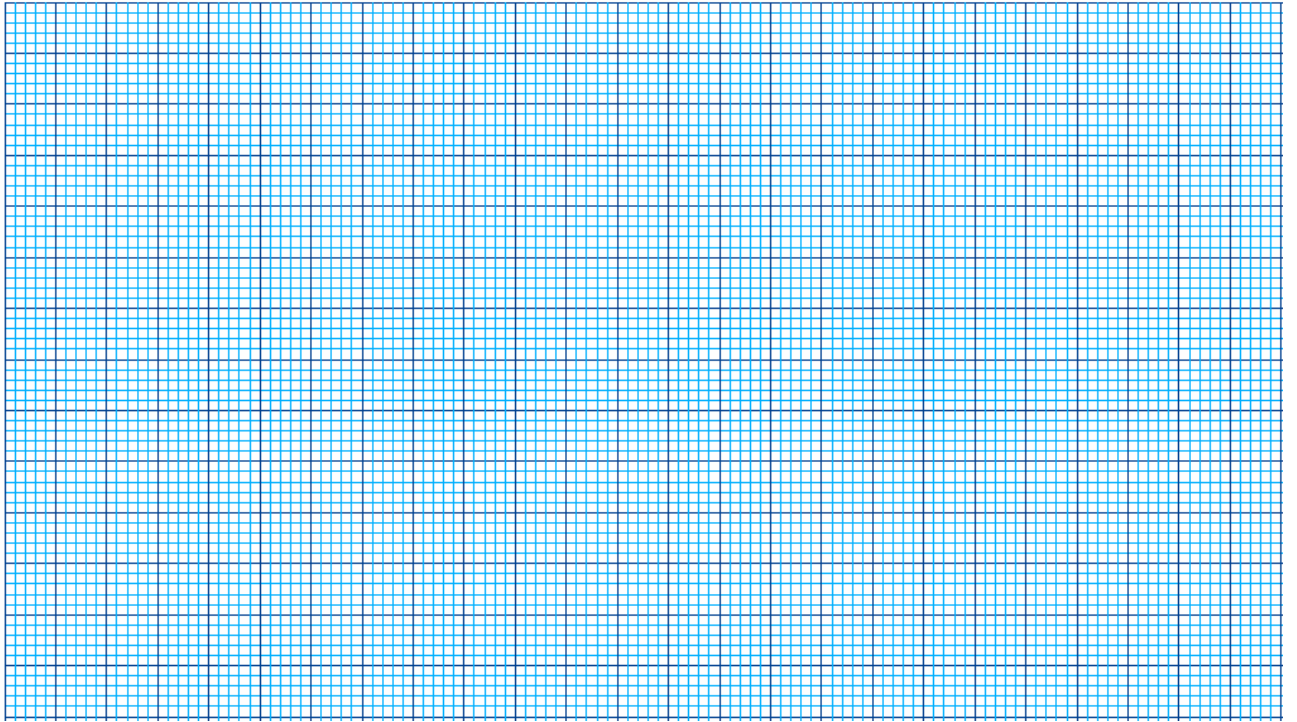
*l* – duljina optičkog puta (1 cm)

*t* – vrijeme reakcije (min)

Napišite Michaelis-Menteninu jednadžbu za brzinu enzimske reakcije i njezin linearni oblik poznat kao Lineweaver-Burkova jednadžba.

Na temelju dobivenih vrijednosti konstruirajte Lineweaver-Burkov dijagram i grafički odredite kinetičke parametre  $K_M$  i  $V_{max}$ .

broj epruvete	$c(pNPP)/\text{mmol L}^{-1}$	$(1/c(pNPP))/\text{L mmol}^{-1}$	$V/\text{mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$(1/v)/\text{min L mmol}^{-1}$
1				
2				
3				
4				
5				
6				



$K_M =$  \_\_\_\_\_

$V_{max} =$  \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_

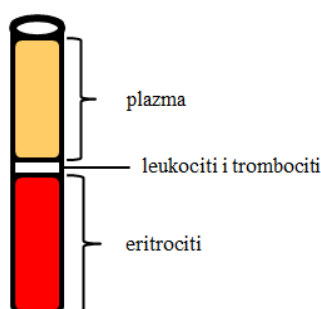
### Vježba 3.

## METODE U ANALIZI BIOLOŠKOG MATERIJALA

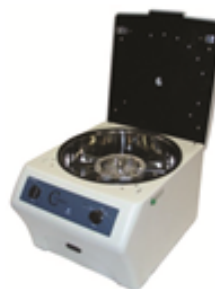
Svrha je vježbe upoznati neke od kromatografskih metoda koje se najčešće primjenjuju za razdvajanje komponenata smjese, kao i upoznati se s imunokemijskim metodama.

Biološki materijal je složena smjesa koja se sadrži brojne sastojke od kojih neki imaju slična, a neki različita fizikalno-kemijska svojstva. U biokemijskim istraživanjima koriste se različite kvalitativne i kvantitativne metode analize sastojaka različitih vrsta biološkog materijala kao što su tjelesne tekućine (puna krv, serum, plazma, slina, urin, amnionska tekućina, cerebrospinalna tekućina (likvor), želučani sok, znoj), homogenati tkiva, kulture stanica i mnoge druge vrste biološkog materijala. Većina biokemijskih analiza najčešće se određuje u punoj krvi te u serumu ili plazmi. Volumen krvi odrasle osobe mase 70 kg iznosi oko 5 L krvi od čega oko 2,5 L otpada na plazmu.

**Krvna plazma** je tekućina koja se dobiva centrifugiranjem krvi pri čemu se uklanjaju krvne stanice uz prethodni dodatak nekog antikoagulansa (EDTA, Na-citrat). **Serum** je vodena faza krvi koja se dobiva centrifugiranjem krvi bez prethodnog dodatka antikoagulansa nakon slobodnog procesa zgrušavanja krvi u trajanju od najmanje 30 minuta. Razlikuje se od plazme jer ne sadrži fibrinogen koji je ušao u sastav ugruška.



Slika 3-1. Sastav krvne plazme



Slika 3-2. Centrifuga

**Centrifugiranje** je postupak kojim je djelovanjem centrifugalne sile moguće odijeliti suspenzije i izdvojiti (sedimentirati) krute tvari iz suspenzije. Primjenjuje se primjerice za razdvajanje stanica, staničnih elemenata, bioloških makromolekula (nukleinske kiseline, proteini) itd. Brzina sedimentacije izražava se kao sedimentacijski koeficijent  $S$ , koji je ovisan o veličini i obliku molekula. Osnovna Svedbergova sedimentacijska jedinica  $S$  iznosi  $1 \times 10^{-13}$  s. Sedimentacijski koeficijent proteina kreće se između  $1 \times 10^{-13}$  i  $2 \times 10^{-15}$  S. Većina laboratorijskih analiza koje uključuju postupak centrifugiranja izvodi se uz precizno određene uvjete centrifugiranja.

**Slina** je bistra seromukozna tjelesna tekućina koja nastaje u žlijezdama slinovnicama. Dnevno se izluči između 500 i 800 mL sline, ali se može izlučiti značajno više i do 1500 mL. Slinu izlučuju 3 para velikih žlijezda slinovnica: parotidna (doušna), submandibularna (podčeljusna) i sublingvalna (podjezična), te veći broj malih žlijezda slinovnica (labijalne, bukalne, lingvalne, palatinalne i faringealne). Slina je tekućina složenog sastava, a sastoji se od oko 98% vode, a ostatak čine elektroliti, enzimi, hormoni, faktori rasta, antimikrobne tvari i antitijela.

Slina se sastoji od dvije osnovne proteinske komponente: serozne komponente koja sadrži  $\alpha$ -amilazu (ptijalin) i mukozne komponente koja sadrži mucin. Parotidne žlijezde izlučuju serozni (rijetki, vodenasti) sekret, sublingvalne mukozni (gust i ljepljiv) sekret, a submandibularna žlijezda ima miješanu funkciju u kojoj prevladava mukozna komponenta. Većina sastojaka sline stvara se unutar žlijezda, a ostale se dopremaju krvotokom. U acinusima se stvara primarna slina čiji je sastav sličan onom u krvnoj plazmi. Primarnom slinom se izlučuju anorganski (elektroliti) i organski sastojci (glikoproteini), a prolaskom kroz izvodne kanaliće žlijezda slinovnica uslijed reapsorpcije natrijevih i kloridnih iona, te zbog izlučivanja kalijevih iona, bitno se mijenja sastav sline. Krajnja slina koja se izliva u usnu šupljinu bogata je proteinima i hipotonična je u odnosu na primarnu slinu. Izlučivanje sline pod kontrolom je autonomnoga živčanog sustava koji određuje volumen i kvalitetu sline. Ukupna slina nastaje miješanjem sline iz slinovnica s drugim tekućinama i tvarima koje dopijaju u usnu šupljinu (sekreti iz dišnih putova, sulkusna tekućina, bakterije i njihovi metaboliti, virusi, gljivice, oljuštene epitelne stanice, ostaci hrane i sl.).

Slina ima brojne funkcije koje su nužne za očuvanje oralnog zdravlja i normalno odvijanje funkcija usne šupljine. Obzirom na laku dostupnosti i neinvazivni način uzorkovanja, slina predstavlja idealni i pouzdan dijagnostički uzorak za ranu detekciju bolesti. Pri odabiru sline kao uzorka za korištenje u dijagnostičke svrhe potrebno je obratiti pozornost na više parametara koji mogu utjecati na ishod analize kao što su: dob i spol, vrijeme uzimanja sline, konzumacija hrane ili pića, žvakanje žvakaćih guma ili pranje zubi prije uzorkovanja. Slinu je najbolje sakupljati ujutro, a ispitanici bi se trebali suzdržati od jela, pića i pušenja. Za sakupljanje sline potrebno je koristiti pouzdanu i ponovljivu metodu. Metode za sakupljanje sline su: istjecanje, pljuvanje, usisavanje i upijanje od kojih posljednje dvije djelomično stimuliraju slinu zbog prisustva cjevčice odnosno vaterolice u ustima.

**Tablica 3-1.** Glavne uloge sline i njezinih sastojaka

Cilj	Uloga	Sastojak sline
Zubi	inhibicija demineralizacije	MUC
	remineralizacija	PRP, staterin, $\text{Ca}^{2+}$ , fosfati
	podmazivanje, elastičnost, ljepljivost i viskoznost	PRP, MUC5B, MUC7
	održavanje vrijednosti pH	$\text{HCO}_3^-$ , fosfati, proteini
Hrana	probava	SAA, lipaze, proteaze, DNaze, RNaze
	osjet okusa	$\text{Zn}^{2+}$
	povezivanje sažvakane hrane u kuglasti oblik	MUC
Mikroorganizmi	protuvirusno djelovanje	MUC5B, MUC7, IgA, cistatin A
	protubakterijsko djelovanje	MUC5B, MUC7 lizozim, laktoferin, laktoperoksidaze, histatini, cistatin A, katalaze

IgA - imunoglobulin; MUC - mucin; PRP - proteini bogati prolinom; MUC5B - mucin tip 5B; MUC7 - mucin tip 7; SAA - salivarna alfa-amilaza.

**Kromatografija** je metoda razdvajanja tvari iz smjese na skupine komponenata ili pojedinačne komponente. Naziv potječe od grčkih riječi  $\kappa\rho\omicron\mu\alpha$  = boja i  $\gamma\rho\alpha\phi\epsilon\iota\nu$  = risati ili pisati.

Razdvajanje se temelji na različitoj razdiobi tvari između dviju faza sustava. Kromatografski sustav čine: **nepokretna (stacionarna) faza**, **pokretna (mobilna) faza** i uzorak, tj. smjesa tvari. Komponente uzorka koje se kromatografski razdvajaju moraju biti topljive u pokretnoj fazi, ali također moraju na neki način biti u interakciji s nepokretnom fazom. Sam proces razdvajanja može se zasnivati na adsorpciji, topljivosti, elektrostatskoj interakciji i sl.

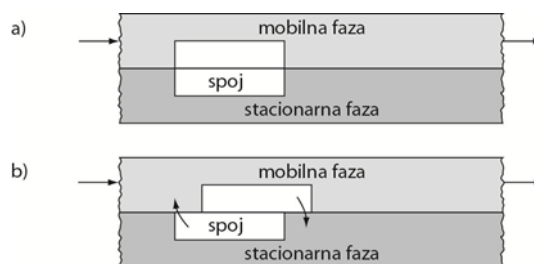
Kromatografske se metode prema mehanizmu odvajanja komponenti dijele na:

- a) *gel-filtracijsku kromatografiju* – razdvajanje na temelju veličine komponenata,
- b) *ionsko-izmjenjivačku kromatografiju* – razdvajanje na temelju ukupnog naboja komponenata,
- c) *afinitetnu kromatografiju* – razdvajanje prema specifičnom afinitetu komponenata prema vezanju određenog niskomolekularnog spoja,
- d) *adsorpcijsku kromatografiju* – razdvajanje na temelju polarosti komponenata,
- e) *ostale kromatografske metode*.

Prema agregacijskome stanju stacionarne i mobilne faze između kojih dolazi do raspodjele komponenata smjese, kromatografiju dijelimo na: **kruto-tekućinsku** (kromatografija na stupcu i tankoslojna kromatografija), **tekućinsko-tekućinsku** i **tekućinsko-plinsku kromatografiju** (plinska kromatografija).

Za razumijevanje procesa kromatografije treba uočiti važnost uspostavljanja dinamičke ravnoteže neke tvari između dviju faza, od kojih se jedna kreće, a druga miruje (sl.1.3.). Pri uspostavljanju ravnoteže promatrana se tvar raspodjeljuje na dio koji se nalazi vezan na nepokretnu fazu i na dio koji se nalazi otopljen u pokretnoj fazi. Zbog gibanja pokretne faze narušava se ravnotežno stanje. Kretanje tvari zasniva se na neprekidnom vezanju tvari na nepokretnu fazu i prelasku tvari u pokretnu fazu uz stalno održavanje "ravnoteže" između dviju faza. Što su interakcije između određenih vrsta tvari (iona, molekula) i nepokretne faze jače, to je vrijeme zadržavanja tvari u sustavu dulje. Nasuprot tome, tvari koje pokazuju veliki afinitet prema pokretnoj fazi kreću se brže kroz sustav.

U biokemiji se u različite svrhe primjenjuju gotovo sve kromatografske metode koje se rabe i u ostalim granama kemije, a izvedba same metode mora se u svakome pojedinačnom slučaju prilagoditi uvjetima u kojima su zadane biološke molekule stabilne. Danas su razvijeni materijali i metode upravo za razdvajanje bioloških makromolekula.



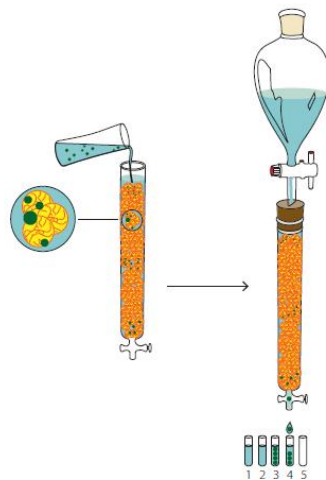
**Slika 3-3.** Početak kromatografskog procesa: kretanjem pokretne faze dolazi do narušavanja ravnotežnoga stanja u zoni u kojoj se nalazi spoj

Kromatografskom analizom često je moguće postići razdvajanje dvaju ili više kemijski sličnih spojeva koji se drugim postupcima ne mogu odijeliti. Ovisno o kromatografskoj metodi, za analizu je potrebna vrlo mala količina uzorka, od 20 do 500  $\mu\text{g}$ , a za neke je metode dovoljno nekoliko pg. Ako je udio pojedine komponente u smjesi jako malen, potrebno je prije kromatografske analize primijeniti druge analitičke postupke kao što su taloženje, ekstrakcija, destilacija i sl. Izbor kromatografskog postupka ovisi o različitim čimbenicima kao što su hlapljivost tvari, postojanost (stabilnost) tvari, mogućnost detekcije tvari, itd.

Prema načinu izvođenja razdvajanja tvari iz smjese kromatografije se dijele na **tankoslojnu kromatografiju** i **kromatografiju na stupcu**. Kod tankoslojne kromatografije nepokretna faza nanosena je u tankom sloju na čvrstu podlogu, a pokretna faza se kreće djelovanjem kapilarnih sila. U slučaju kromatografija na stupcu nepokretna faza ispunjava kolonu kroz koju prolazi pokretna faza djelovanjem gravitacijske sile ili primjenom visokog tlaka koji potiskuje mobilnu fazu kroz kolonu.

**Kromatografija na stupcu** naziva se još i kolonskom kromatografijom. Od kromatografija na stupcu najčešće se primjenjuju adsorpcijska, ionsko-izmjenjivačka i gel-filtracijska kromatografija.

**Gel-filtracija** se temelji na razdvajanju komponenata iz smjese prema veličini molekula. Stupac se ispuni česticama inertne tvari koje imaju umreženu strukturu s porama. Veličina pora može varirati te se komercijalno proizvode gelovi točno određenih raspona veličina pora (engl. *mesh*). Kada se na kolonu nanosi smjesa koja se želi razdvojiti na komponente, molekule čija je veličina manja od veličine pora čestica nepokretne faze ulaze u pore i tu se zadržavaju, dok veće molekule brže putuju jer prolaze između čestica gela (sl. 1.4.). Na taj način s kolone prvo izlaze frakcije s velikim molekulama, a što je veličina molekula manja, to će zaostajanje biti veće. Kao i kod ostalih kromatografija na koloni, eluat se sakuplja u malim frakcijama. Nakon analize se frakcije koje sadržavaju istovrsnu tvar spajaju.



**Slika 3-4.** Shematski prikaz postupka kromatografije na gelu

Gel je trodimenzionalna mreža, često nasumične strukture, a kao i druga molekularna sita sastoji se od umreženih polimera. Polimeri su najčešće inertni, što znači da ne vežu niti ne reagiraju s analiziranim uzorkom. Gelovi koji se danas najčešće rabe u vodenim otopinama sadržavaju jedan od triju polimera: dekstran, agarozu ili poliakrilamid.

**Tankoslojna se kromatografija (engl. *thin layer chromatography*, TLC),** zasniva na različitoj razdiobi tvari između krutog adsorbensa i tekućeg eluensa. Tehnika je dobila ime po tome što se kromatografski proces zbiva na tankome sloju adsorbensa, koji može biti nanesen na neku čvrstu podlogu. Prema načinu izvođenja kromatografskoga procesa, tankoslojna se kromatografija dijeli na **uzlaznu** (za koju se vrlo često kaže da je obratna kolonska kromatografija) i **silaznu**.

Tijekom razdvajanja tvari uzlaznom tankoslojnom kromatografijom pokretna faza se zbog kapilarnih sila uspinje po krutom adsorbensu (sl. 1.5.). Kromatografija na tankome sloju može se izvoditi jednodimenzionalno i dvodimenzionalno. Kod dvodimenzionalne se kromatografije nakon završetka kromatografskoga procesa u jednome smjeru pločica ponovno kromatografira, ali u smjeru okomitom na smjer prvoga procesa uz drugu pokretnu fazu. Kombinacijom otapala različite polarosti postiže se dobro razdvajanje sličnih spojeva, npr. aminokiselina ili lipida.





**Slika 3-5.** Tankoslojna kromatografija

Pri tankoslojnoj kromatografiji kao nepokretna faza najčešće se rabe adsorbensi silikagel i aloks koji su nanoseni u vrlo tankom sloju (0,1 – 2 mm) na staklenu, metalnu ili plastičnu pločicu. Pokretnu fazu čini otapalo ili smjesa otapala. S pomoću kapilare se na adsorbens, 1 cm od donjeg ruba pločice, nanese mala količina otopljenе smjese (1 – 5  $\mu\text{L}$ ) i ostavi da otapalo ispari. Eluens se ulije u staklenu posudu (čahu) s poklopcem (komora za razvijanje) toliko da pokrije dno posude, nakon toga se pločica uroni u eluens, ali tako da uzorak ostane iznad razine otapala. Zbog utjecaja kapilarnih sila eluens se uspinje po adsorbensu, otapa komponente uzorka koje se razdvajaju zbog različite brzine putovanja. Mjesto na koje se nanosi uzorak naziva se **startom**, a **frontom** se naziva zona najveće udaljenosti eluensa od starta. Kada fronta eluensa dođe na 0,5 cm od gornjeg ruba pločice, pločica se izvadi iz komore za razvijanje i osuši. Nakon toga se detektiraju zone pojedinih komponenti. Detekcija i kvantifikacija mogu se obavljati na pločici ili nakon uklanjanja materijala s pločice. Uklanjanje zone s pločice postiže se skidanjem sloja adsorbensa, a nakon toga se može primijeniti bilo koja prikladna tehnika detekcije, od kolorimetrije do spektrometrije masa. Kako bi se zone na pločici, u slučaju da nisu vidljive okom, mogle detektirati, nužno ih je učiniti vidljivima. U tu se svrhu primjenjuju fizikalne, kemijske ili enzimsko-biološke metode. Fizikalne metode temelje se na sposobnosti spojeva da apsorbiraju svjetlost određene valne duljine. Kemijske metode temelje se na reakciji između spoja i reagensa koji se raspršivačem nanosi na pločicu, a mrlje pri tom postaju crne, obojene ili fluoresciraju. Enzimске metode se upotrebljavaju za vizualizaciju enzima. Tako se primjerice kod kromatografije enzima amilaze pločica prska otopinom škroba i joda. Mjesta na kojima se nalazi amilaza pojavljuju se kao bijele mrlje na plavoj pozadini.

Kromatografska pokretljivost pojedine komponente uzorka definira se kao  $R_f$  vrijednost (engl. *related to front*) koja predstavlja omjer duljine prijeđenog puta komponente ( $x$ ) od starta i duljine prijeđenog puta otapala ( $y$ ) (sl. 1.7.).

$$R_f = \frac{x}{y}$$

$R_f$  vrijednosti mogu se upotrijebiti za identifikaciju tvari pod strogo određenim uvjetima. Niska  $R_f$  vrijednost upućuje da je tvar jače adsorbirana, dakle ostvaruje slabije interakcije s pokretnom fazom.

Uporaba je tankoslojne kromatografije raznovrsna. Ponajprije se ta metoda primjenjuje u kvalitativnoj analizi, rjeđe u kvantitativnoj, ali se često rabi i za praćenje kemijske reakcije. Uz određene modifikacije (deblji sloj adsorbensa) može služiti i u preparativne svrhe.

## Zadatak 1. Gel-filtracija – razdvajanje albumina od $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

### Načelo

Primjenom tzv. molekularnih sita, umreženih polimernih gelova definirane veličine pora, moguće je kromatografijom na koloni razdvojiti molekule prema njihovoj veličini, pri čemu se s kolone brže eluiraju velike molekule, dok je za izlazak manjih molekula s kolone potreban veći volumen eluenta, tj. pokretne faze.

### Reagensi i pribor

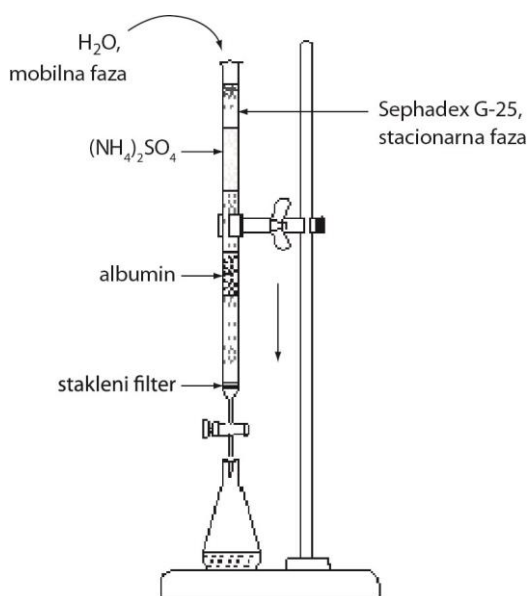
Gel za kromatografiju (nepokretna ili stacionarna faza): Sephadex G-25 (prethodno namočen-nabubren)

Otopina za eluciju (pokretna ili mobilna faza): destilirana voda

Uzorak: koloidna otopina proteina u otopini  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  volumena 100 mL

Reagens za dokaz sulfata: otopina  $\text{BaCl}_2$

Kolona za kromatografiju, malo vate, stativ i klema, graduirane epruvete, spektrofotometar, kvarcna kiveta



Slika 3-6. Gel-filtracija - razdvajanje albumina od  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Kolona za kromatografiju pričvrstite na stativ (sl. 1.5.). Na dno kolone stavite malo navlažene vate. U kolonu polagano ulijte suspenziju gela koja je prethodno dobro promućkana. **Pazite da mjehurići zraka ne uđu u kolonu!** Otvorite stezaljku i pustite da voda polako kaplje dok se istodobno gel taloži u koloni, pri čemu nastaje homogeni stupac. Nakon ispiranja gela s oko 2 mL vode, zatvorite stezaljku, promijenite epruvetu ispod kolone te oprezno nanesite uzorak na gel. **Pri nanošenju uzorka treba paziti da se površina gela ne uzmuti.** Nakon nanošenja uzorka na kolonu, stezaljku polagano otvorite i započnite s eluiranjem, odnosno ispuštanjem pokretne faze od po 2 mL u epruvete. **Pazite da površina gela nikada ne ostane suha!**

Ovako dobivene frakcije potrebno je analizirati na prisutnost proteina i sulfatnog iona.

1. Eluat iz svake pojedine epruvete ulijte u kvarcnu kivetu i na spektrofotometru izmjerite apsorbanciju pri valnoj duljini od 280 nm prema destiliranoj vodi.

2. U svakoj pojedinoj frakciji potrebno je provesti i test na sulfatni ion otopinom  $\text{BaCl}_2$ . Nakon mjerenja apsorbancije, uzorak vratite u epruvetu i provedite kvalitativan test na sulfat, koji se izvodi dodavanjem nekoliko kapi otopine barijeva klorida u eluat. U slučaju pozitivne reakcije pojavljuje se bijeli talog barijeva sulfata.

Napišite reakciju taloženja barijeva sulfata. Napišite reakciju otapanja barijeva sulfata te izraz za produkt topljivosti barijeva sulfata.

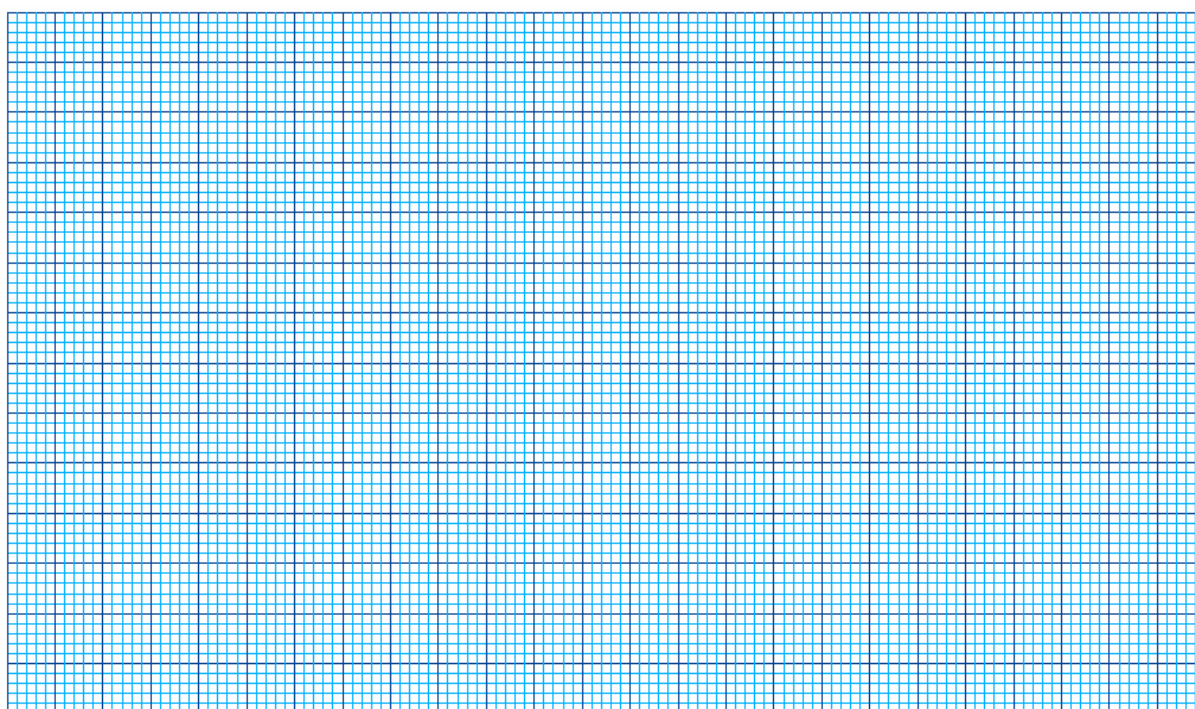
### Napomena

Otopine proteina apsorbiraju elektromagnetsko zračenje, tj. svjetlost valnih duljina od 215 nm (peptidne veze) i 280 nm (aromatski prstenovi u bočnim ograncima aminokiselina). Metoda je vrlo osjetljiva, a većinom se apsorbancija mjeri pri valnoj duljini od 280 nm. Na taj je način moguće vrlo jednostavno odrediti ukupnu koncentraciju proteina u uzorku.

### Rezultat i grafički prikaz

Redni broj frakcije:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proteini $A_{280}$										
$SO_4^{2-}$	pozitivni (+)									
	negativni (-)									

Grafički prikžite ovisnost  $A_{280}$  o rednom broju frakcije ili volumena eluata.



### Zadatak 2. Određivanje sastava smjese šećera tankoslojnom kromatografijom

#### Reagensi i pribor

Pločica za tankoslojnu kromatografiju (silikagel)

Pokretna faza: etilni acetat, octena kiselina, metanol i voda u volumnom omjeru 60:15:15:10

Reagens za razvijanje boje: 6% etanolna otopina orcinola + 1% otopina  $FeCl_3$  u 10% otopini  $H_2SO_4$ , u volumnom omjeru 1:10

Standardna otopina šećera

Uzorak: smjesa šećera

#### Postupak

Na pločici za tankoslojnu kromatografiju lagano grafitnom olovkom povucite početnu (startnu) liniju 1 cm od donjeg ruba pločice. Na startnoj liniji označite dva mjesta duljine 0,5–1 cm na koje ćete nanijeti standard i uzorak (iste duljine) počevši 1 cm od lijevog ruba pločice s međusobnom udaljenošću 0,5–1 cm. Naposljetku povucite liniju fronte (do koje će putovati pokretna faza) 0,5 cm od

gornjeg ruba pločice. Otopinu standarda i uzorka nanosite kapilarom na označena mjesta na startnoj liniji pločice. Prije uranjanja u komoru za kromatografiranje (komora za razvijanje) pločica se mora dobro osušiti. U komoru za kromatografiranje (laboratorijska čaša) ulijte svježe pripremljenu pokretnu fazu (debljina sloja oko 0,5 cm) i u nju okomito uronite pločicu te komoru poklopite. Zbog kapilarnih sila smjesa otapala putuje povlačeći šećere koji zaostaju na različitim udaljenostima od startne linije. Nakon otprilike 30 minuta ili kada je fronta otapala došla do 0,5 cm od gornjeg ruba pločice, pločicu izvadite iz komore i ostavite da se osuši. Suhu pločicu poprskajte otopinom za razvijanje boje te grijte na 100°C oko 3 minute u sušioniku, do pojave obojenih frakcija šećera (tabl. 1.3.). Na temelju boje i izračunatih  $R_f$  vrijednosti odredite koji su šećeri prisutni u uzorku.

**Tablica 3-2.** Obojene reakcije na šećere

šećer	anisaldehyd-sulfatna kiselina	orcinol-sulfatna kiselina
riboza	plava	Siva
ksiloza	siva	svijetlo plava
arabinoza	žutozelena	plavosiva
fruktoza	ljubičasta	tamno crvena
manozna	zelena	svijetlo plava
glukoza	svijetlo plava	sivoplava
galaktoza	sivozelena	sivoplava
saharoza	ljubičasta	crvenosmeđa
laktoza	zelenkasta	crvenoljubičasta

standard	$R_f$	uzorak	$R_f$
1. ksiloza			
2. glukoza			
3. saharoza			
4. laktoza			

Napomena: šećeri su u tablici navedeni prema kromatografskoj mobilnosti, od najpokretljivijeg (1) do najmanje pokretljivog (4).

Prisutnost kojih ugljikohidrata ste dokazali u uzorku?

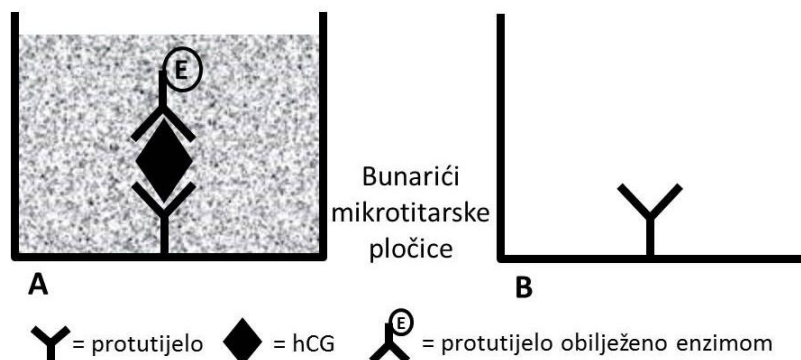
Crtežom prikažite rezultat tankoslojne kromatografije!

### Zadatak 3. Dokazivanje prisutnosti korionskog gonadotropina (hCG) u mokraći - test trudnoće

Humani korionski gonadotropin (hCG, prema engl. Human chorionic gonadotropin) je peptidni hormon koji izlučuju stanice sinciotrofoblasta posteljice. Njegova najvažnija uloga je osiguravanje funkcije žutog tijela koje luči progesteron, a time i održavanje normalne trudnoće. Budući da se hCG može utvrditi u krvi i urinu već desetak dana nakon začeća, određivanje hCG primjenjuje se za potvrđivanje trudnoće. U ovom zadatku ćete primjenom imunokemijske metode utvrditi u kojem je od uzoraka prisutan hormon hCG.

#### Načelo

Metoda kojom se dokazuje prisutnost humanog korionskog gonadotropina (hCG) je izravna ELISA (engl. *enzyme-linked-immunosorbent assay*). Specifično protutijelo koje prepoznaje peptidni hormon hCG pričvršćeno je za podlogu (bunarići mikrotitarske pločice). Ako se u uzorku nalazi specifični antigen (hCG), dolazi do vezanja protutijela i antigena. Vizualizacija reakcije antigen-protutijelo izvodi se dodavanjem protutijela obilježenog enzimom (alkalna fosfataza) i odgovarajućih supstrata (BCIP, 5-bromo-4-kloro-3'-indolil-fosfat; NBT, nitrotetrazolijev klorid). Djelovanjem alkalne fosfataze na supstrate u otopini nastaje plavo obojenje koje potječe od obojenog netopljivog spoja NBT-diformazana. Pozitivna reakcija označuje prisutnost povećane koncentracije hCG u mokraći, odnosno upućuje na trudnoću.



**Slika 3-7.** Princip imunokemijske metode ELISA. **A)** U slučaju prisutnosti hCG-a u uzorku, hCG se veže na protutijelo koje se nalazi pričvršćeno na podlozi. Na hCG se tada veže drugo protutijelo obilježeno enzimom (ovdje alkalnom fosfatazom). Nakon dodatka supstrata za alkalnu fosfatazu (BCIP i NBT, nisu prikazani), dolazi do nastajanja obojenja. **B)** U slučaju da u uzorku nije prisutan hCG, ne može ni doći do vezanja protutijela obilježenog enzimom i obojenje izostaje.

#### Reagensi i pribor

Uzorci mokraće

Pufer za razvijanje boje: 0,1 M Tris-HCl, 100 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 9,5

Monoklonsko protutijelo na humani korionski gonadotropin (hCG) obilježeno alkalnom fosfatazom

Supstrat BCIP (5-bromo-4-kloro-3'-indolil-fosfat), 50 mg/mL (stock-otopina)

Supstrat NBT (nitrotetrazolijev klorid - nitrotetrazolium blue chloride, nitroblue), 10 mg/mL (stock-otopina)

Mikrotitarske pločice, automatske pipete

### Postupak

1. U bunariće prethodno pripremljene mikrotitarske pločice nanosite:

- pozitivnu kontrolu
- negativnu kontrolu
- uzorak

*(Napomena: kod pipetiranja koristite čiste nastavke za pojedini uzorak!)*

2. U svaku jamicu dodajte 84  $\mu\text{L}$  pufera za razvijanje boje.

*(Napomena: pipetirajte pufer istim nastavkom, ali pazite da se nastavak ne uroni u otopinu u jamici!)*

3. U svaku jamicu dodajte 8  $\mu\text{L}$  BCIP i 8  $\mu\text{L}$  NBT.

*(Napomena: kod pipetiranja supstrata koristite čiste nastavke za pojedini supstrat!)*

	V(uzorka)/ $\mu\text{L}$	V(pufera)/ $\mu\text{L}$	V(BCIP)/ $\mu\text{L}$	V(NBT)/ $\mu\text{L}$
<b>pozitivna kontrola</b>	5	84	8	8
<b>negativna kontrola</b>	5	84	8	8
<b>uzorak</b>	5	84	8	8

Opišite rezultat:

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_

## Vježba 4.

### UGLJIKOHIDRATI

*Svrha je vježbe upoznati metode određivanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u slini, odrediti produkte razgradnje škroba djelovanjem salivarne  $\alpha$ -amilaze kao i upoznati metodologiju određivanja koncentracije glukoze u krvi.*

$\alpha$ -amilaza je enzim iz skupine hidrolaza koja razgrađuje škrob. Katalizira hidrolizu  $\alpha$ -1,4 glikozidne veze pri čemu se škrob kida do oligosaharida veličine 6 do 7 glukoznih jedinica. Duljim djelovanjem  $\alpha$ -amilaze razgrađuju se oligosaharidi dalje do maltoze i izomaltoze. pH optimum djelovanja  $\alpha$ -amilaze jest 6,9–7,0. Najveća je koncentracija prisutna u gušterači i slinovnicama (salivarnu  $\alpha$ -amilazu izlučuju uglavnom parotidne žlijezde slinovnice).  $\alpha$ -amilaza iz sline (salivarna  $\alpha$ -amilaza ili ptijalin) započinje hidrolizu škroba dok je hrana u ustima i jednaku, a u želucu njezino djelovanje prestaje.

Uloga salivarne  $\alpha$ -amilaze je djelomična razgradnja škroba unesenog hranom (kao konačni produkti razgradnje nastaju maltoza, maltotriosa, manje količine glukoze te dekstrini, molekule s 1,6 glikozidnim vezama koje salivarna  $\alpha$ -amilaza ne može pocijepati) pri čemu je stupanj razgradnje određen vremenom izloženosti škroba djelovanju  $\alpha$ -amilaze. Škrob iz ostataka hrane zaostalih u usnoj šupljini (posebno u među-zubnim prostorima) izložen je produljenom djelovanju salivarne  $\alpha$ -amilaze i kao konačni produkt razgradnje stvara se glukoza koju bakterije iz usne šupljine mogu koristiti kao supstrat u svom metabolizmu. Na taj način osim probavne uloge, salivarna  $\alpha$ -amilaza ima bitnu ulogu i u složenoj patofiziologiji nastanka karijesa.  $\alpha$ -amilaza iz sline se može vezati na nekoliko vrsta oralnih bakterija, a pronađena je i u strukturi zubnog plaka gdje zadržava svoju enzimsku aktivnost. Stoga djeluje kao posrednik u vezanju bakterija na površinu zuba i enzimskom aktivnošću priskrbljuje vezanim bakterijama supstrat (glukozu) za njihov metabolizam, te pogoduje nastanku karijesa. Kada se vezanje  $\alpha$ -amilaze s bakterijama iz usne šupljine odvija u slini smanjuje se mogućnost razvoja karijesa jer takvo vezanje ograničava kolonizaciju bakterija na površinu zuba i pospješuje uklanjanje bakterija iz usne šupljine gutanjem. U slini  $\alpha$ -amilaza postoji u obliku više izoenzima koji se razlikuju samo po optimalnoj pH-vrijednosti djelovanja (od 5,9 do 6,8). Pri različitim vrijednostima pH u usnoj šupljini neki od izoenzima salivarne  $\alpha$ -amilaze biti će aktivan i hidrolizirati će škrob.

Blago alkalni uvjeti u dvanaesniku (duodenumu) pospješuju djelovanje gušteračne (pankreasne)  $\alpha$ -amilaze koja razgrađuje dekstrine do disaharida.

Određivanje aktivnosti amilaze u serumu i mokraći ima najveće značenje u dijagnostici gušteračnih bolesti.

#### **Zadatak 1.** Dokazivanje $\alpha$ -amilaze u slini

##### **Načelo**

Škrob s elementarnim jodom daje produkt intenzivno modre boje. Molekule joda ugrađuju se u međuprostor uzvojnice amiloze koju su stvorile jedinice glukoze, pa takav adsorpcijski spoj pokazuje jaku apsorpciju svjetlosti. Enzimskom razgradnjom škroba s  $\alpha$ -amilazom, raspada se adsorpcijski spoj amiloze i joda i gubi se boja, što služi za dokazivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze.

### Reagensi i pribor

1%-tna otopina škroba

Lugolova otopina: I<sub>2</sub> otopljen u otopini KI daje u vodi topljivi, labilni kompleks KI<sub>3</sub> u kojem se vezani I<sub>2</sub> ponaša jednako kao i elementarni I<sub>2</sub>

Fehlingov reagens:

Fehling I: otopina CuSO<sub>4</sub>

Fehling II: alkalna otopina K,Na-tartarata

Reagens se dobiva miješanjem otopina Fehling I i Fehling II u volumnom omjeru 1:1

Uzorak: slina

Epruvete, kapalice, termostatisirana kupelj

### Postupak

Dokazivanje se izvodi u dvjema epruvetama.

*Za pripremu reakcijske smjese u 2. epruveti, slinu je potrebno prethodno kratko prokuhati i potom ohladiti prije dodavanja ostalih reagensa.*

1. epruveta: 1 mL sline + 2 mL otopine škroba + 1 kap Lugolove otopine

2. epruveta: 1 mL prokuhane sline + 2 mL otopine škroba + 1 kap Lugolove otopine

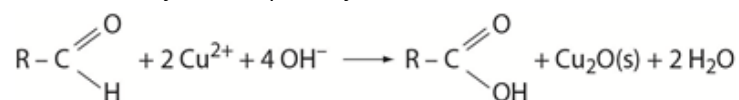
Promiješajte sadržaj svake epruvete i ostavite 15 minuta pri temperaturi 37°C. Što primjećujete?

Sa sadržajem obiju epruveta izvedite Trommerovu reakciju\*; u svaku epruvetu dodajte 2 mL Fehlingovog reagensa (1 mL reagensa Fehling I + 1 mL reagensa Fehling II), promiješajte i zagrijte do vrenja u vodenoj kupelji na 100 °C.

Što primjećujete? Objasnite!

### \*Reakcije za dokazivanje reducirajućih šećera - test po Fehlingu (Trommerova reakcija)

Kemijska osnova Fehlingovog testa jest reakcija šećera s bakrovim(II) ionima u lužnatom mediju, u kojoj se šećeri oksidiraju, a ioni Cu<sup>2+</sup> reduciraju do Cu<sup>+</sup> prema jednadžbi:



Kao vidljivi produkt, u prvoj se fazi reakcije taloži žućkasti talog bakrova(I) hidroksida, CuOH, koji nadalje prelazi u crveni talog bakrova(I) oksida, Cu<sub>2</sub>O.

Fehlingov reagens je vrlo lužnata otopina kompleksnog bakrova(II) tartarata. Stoga se u reakciji, osim glukoze, lako oksidiraju i ostali eventualno prisutni reducirajući šećeri ili druge reducirajuće tvari. U prisutnosti reducirajućih šećera nastaje crveno-narančasti talog Cu<sub>2</sub>O.



## Zadatak 2. Određivanje koncentracije glukoze u krvi

Za određivanje koncentracije glukoze u krvi primjenjuju se mnogi analitički postupci. Prije su bile u uporabi metode koje su se koristile reducirajućim svojstvima šećera. Nedostatak takvih metoda jest u tome što na rezultate utječe prisutnost ostalih šećera u krvi, kao i drugih reducirajućih tvari. Danas se uglavnom primjenjuju enzimске metode kao što su metoda s glukoza-oksidadom, metoda s heksokinazom te metoda s glukoza-dehidrogenazom.

### Metoda s heksokinazom

Glukoza se fosforilira s pomoću ATP-a u prisutnosti heksokinaze i  $Mg^{2+}$ . Nastali se glukoza-6-fosfat uz glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu oksidira u 6-fosfoglukonat u prisutnosti  $NADP^+$ . Količina nastalog  $NADPH$  izravno je razmjerna količini glukoze u uzorku i mjeri se promjenom apsorbancije pri 340 nm.

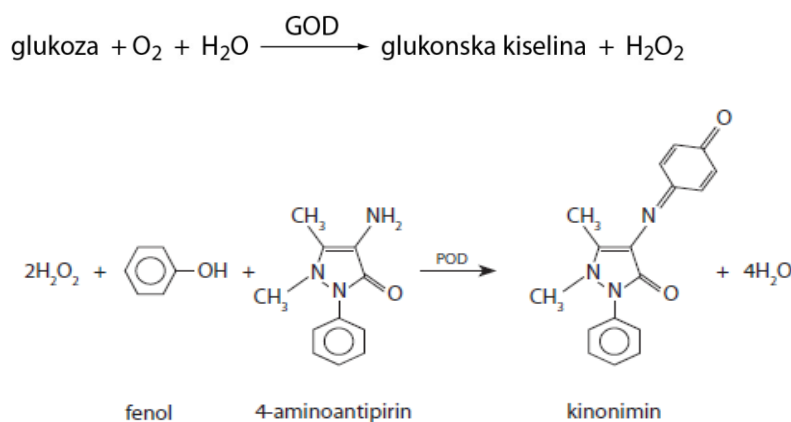
### Metoda s glukoza-dehidrogenazom

Enzim glukoza-dehidrogenaza katalizira oksidaciju glukoze u glukonolakton uz prisutnost  $NAD^+$ . Količina nastalog  $NADH$  razmjerna je koncentraciji glukoze. Reakcija je visoko specifična za glukozu.

## 2.1. Metoda s glukoza-oksidadom: enzimska (PAP) metoda

### Načelo

Glukoza-oksidaza (GOD) oksidira glukozu u glukonsku kiselinu, pri čemu nastaje  $H_2O_2$ . Nastali  $H_2O_2$  uz peroksidazu (POD) oksidira bezbojni kromogen u obojeni spoj (kinonimin) čija se koncentracija može odrediti spektrofotometrijski, a stehiometrijski je ekvivalentna koncentraciji glukoze u uzorku.



Slika 4-1. Određivanje koncentracije glukoze enzimskom (PAP) metodom

### Reagensi i pribor

Reagens: fosfatni pufer pH 7,5,  $c = 100$  mmol/l

4-aminofenazon,  $c = 0,25$  mmol/l

fenol,  $c = 0,75$  mmol/l

glukoza oksidaza  $> 15$  KU/l

peroksidaza  $> 1,5$  KU/l

mutarotaza  $> 2,0$  KU/l

Na-azid 0,095%

stabilizatori

Standard: otopina glukoze,  $c = 5,55$  mmol/L

Uzorak: serum

Epruvete, automatska pipeta, kivete, spektrofotometar

## Postupak

U epruветama pripremite otopine slijepе probe, standarda i probe prema sljedećој tablici.

	slijepa proba	standard	proba
$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{L}$	10	–	–
$V(\text{standard}) / \mu\text{L}$	–	10	–
$V(\text{serum}) / \mu\text{L}$	–	–	10
$V(\text{radni reagens}) / \text{mL}$	1,0	1,0	1,0

Promiješajte i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi. Očitajte apsorbancije standarda i probe pri 500 nm prema slijepој probi i izračunajte koncentraciju glukoze u serumu.

$A_{\text{St}}$	
$A_{\text{Pr}}$	
$c_{\text{St}}$	

$c(\text{glukoza}) = \text{_____} \text{ mmol/L}$

### Referentne vrijednosti

serum, plazma: 3,9–5,8 mmol/L

### Zaključak

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_

## Vježba 5.

### PORFIRINI I ŽUČNE BOJE

*Svrha je vježbe upoznati se s metodama za određivanje hemoglobina i njegovih razgradnih produkata u krvi.*

#### Hemoglobin

Određivanje koncentracije hemoglobina jedna je od rutinskih laboratorijskih pretraga, a kako se gotovo sav hemoglobin nalazi u eritrocitima, određuje se u uzorku pune krvi. Koncentracija hemoglobina u krvi povećava se nakon teškoga fizičkog rada i boravka na velikim visinama. Patološko povećanje koncentracije hemoglobina pojavljuje se pri povećanju broja eritrocita (*polycythaemia rubra vera*). Smanjena koncentracija hemoglobina nastaje kod različitih anemija uzrokovanih nedostatkom željeza, pojačanim raspadanjem eritrocita, poremećajima eritropoeze i dr.

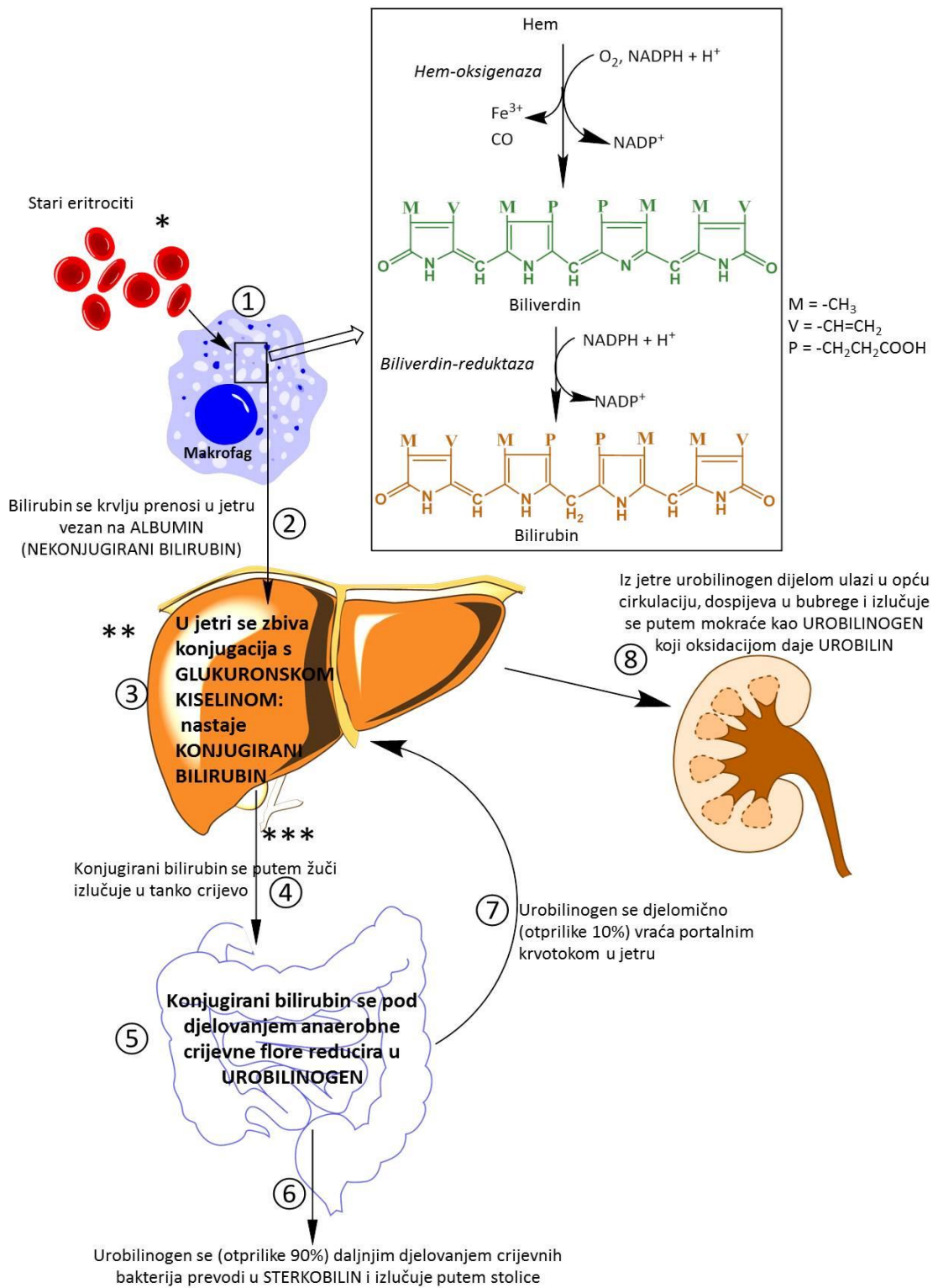
Patološke promjene hemoglobina nazivamo hemoglobinopatijama. Hemoglobinopatije mogu biti kvalitativne i kvantitativne. Kvalitativne hemoglobinopatije nastaju kao posljedica sinteze promijenjenog hemoglobina (HbC, HbF, HbS) i očituju se slikom hemolitičke bolesti. Kvantitativne promjene uzrokovane su smanjenom sintezom normalnih  $\alpha$ - ili  $\beta$ -globinskih lanaca ( $\alpha$ -talasemije ili  $\beta$ -talasemije).

**Hem** predstavlja neproteinski dio različitih hemoproteina. Sintetizira se iz sukcinil-CoA i glicina. Prva preteča u biosintetskom putu je porfobilinogen (PBG), a četiri prstena PBG spajaju se u ciklički tetrapirolni uroporfirinogen. Redom dalje nastaju odgovarajući tipovi koproporfirinogena, protoporfirinogena i konačno protoporfirina. Iz protoporfirina tipa III nastaje hem. Rijetki metabolički poremećaji biosinteze hema imaju za posljedicu anemiju i/ili porfirije. **Porfirije** su rijetki poremećaji u kojima se zbog nedostataka ili smanjene aktivnosti enzima koji sudjeluju u biosintezi hema nakupljaju metabolički međuprodukti (različiti porfirinogeni koji se oksidiraju u porfirine). Jedan od primjera je eritropoetska kongenitalna porfirija kod koje se (uz fotosenzitivnost, povišene uroporfirine u eritrocitima, mokraćni i stolici) na zubima uočava eritrodoncija.

#### Žučne boje

Žučne boje su razgradni produkti metabolizma hemoglobina (sl. 6.1.). Bilirubin nastaje iz hemoglobina nizom reakcija u retikuloendotelnom sustavu (RES). Iz stanica RES-a, bilirubin dopijeva u cirkulaciju i veže se na albumin (nekonjugirani bilirubin). Aktivnim transportom ulazi u jetru i u stanicama jetrenog parenhima se konjugira s glukuronskom kiselinom u bilirubin-diglukuronid (konjugirani bilirubin). Kao takav preko Golgijevog kompleksa se koncentrira na površini membrane žučnih kanalića i izlučuje u žuč. Putem žuči dopijeva u tanko crijevo, oslobađa se iz glukuronida (djelovanjem enzima glukuronidaze) i pod djelovanjem anaerobne crijevne flore reducira se u urobilinogen. Glavnina urobilinogena se izlučuje stolicom kao sterkobilin, a samo manji dio se vraća enterohepatičkom cirkulacijom, portalnim krvotokom, u jetru. Iz jetre dijelom ulazi u opću cirkulaciju i dopijeva u bubrege, te se izlučuje kao mokraćni urobilinogen koji oksidira u urobilin.

Kliničke i znanstvena istraživanja su pokazala da se bilirubin može odlagati u krutom zubnom tkivu što ima za posljedicu promjenu boje i/ili hipoplaziju zubne cakline.



Slika 5-1. Metabolizam žučnih boja

## Poremećaji povezani uz metabolizam žučnih boja

**\*Prehepatička žutica nastaje kao posljedica povećane hemolize eritrocita ili diseritropoeze (poremećaj u sazrijevanju eritrocita).** Kod takvih poremećaja više se hemoglobina razgrađuje u retikuloendotelnom sustavu (RES), pa se stvara i više bilirubina. Stoga se povisuje koncentracija nekonjugiranog bilirubina u serumu te je ukupni bilirubin umjereno povišen. Ako je funkcija jetre normalna, i konjugacija bilirubina u jetri je zadovoljavajuća. Izlučivanje bilirubina putem žuči je povećano, pa se povećava količina žučnih boja u stolici, a i više urobilinogena dopijeva krvotokom u bubrege te ga se više izlučuje mokraćom.

**\*\*Hepatička žutica nastaje kao posljedica oštećenja jetrenih stanica.** Uzrok oštećenja stanica može biti infekcija različitim virusima (hepatitis A, B, C, citomegalovirus i dr.), uzimanje nekih lijekova, otrovanje, alkoholizam, autoimune promjene i neuredna prehrana. Funkcionalna je sposobnost jetrenih stanica smanjena, pa one ne mogu metabolizirati i izlučiti sav nastali bilirubin. Stoga se dio bilirubina koji dopije u jetru vraća u cirkulaciju preko jetrenih sinusoida, pa se koncentracija ukupnog bilirubina u krvi povećava, a pojavljuje se i u mokraći. Zbog smanjene funkcionalne sposobnosti jetrenih stanica, manje se bilirubina izlučuje u žuč i crijevo, pa je u stolici prisutna manja količina žučnih boja. Budući da se urobilinogen enterohepatičnom cirkulacijom vraća u jetru koja zbog smanjene funkcionalnosti prima i izlučuje manje urobilinogena putem žuči, više ga prelazi u krv, a time i u mokraću.

**\*\*\*Posthepatička žutica nastaje kao posljedica zastoja ili smanjenog izlučivanja žuči u crijevo (kolestatska ili opstruktivna žutica).** Bilirubin se u jetri normalno konjugira, ali se zbog kolestaze vraća u cirkulaciju te mu u krvi koncentracija raste, a pojavljuje se i u mokraći. Kako se bilirubin ne izlučuje u crijevo, ne nastaje urobilinogen koji je stoga i u mokraći negativan.

**Kongenitalna (urođena) hiperbilirubinemija nastaje kao posljedica metaboličkih poremećaja unutar jetrenih stanica, a povezani su s proteinima koji sudjeluju u prijenosu bilirubina, konjugaciji i izlučivanju bilirubina iz jetrenih stanica.** U Gilbertovu sindromu poremećen je prijenos bilirubina kroz stanične membrane hepatocita do mjesta konjugacije, a smanjena je i aktivnost bilirubin-UDP-glukuronil-transferaze. Crigler-Najjarova hiperbilirubinemija također je posljedica manjka enzima konjugacije u jetri. Stoga je kod obiju metaboličkih pogrešaka povišen nekonjugirani bilirubin. Poremećaj ekskrecije konjugiranog bilirubina iz mikrosoma hepatocita u žučne kapilare uzrok je Dubin-Johnsonove hiperbilirubinemije. Značajka je te bolesti povišeni konjugirani bilirubin.

### **Zadatak 1.** Određivanje masene koncentracije hemoglobina u krvi

#### **Načelo**

Hemoglobin se oksidira kalijevim heksacijanoferatom(III),  $K_3[Fe(CN)_6]$ , (kalijev fericijanid) u methemoglobin, koji s kalijevim cijanidom stvara stabilan crvenkasto obojeni kompleks cijanmethemoglobina.

#### **Reagensi i pribor**

R1:  $K_3[Fe(CN)_6]$ , c = 12 mmol/L

$KHCO_3$ , c = 230 mmol/L

R2: KCN, c = 14 mmol/L

$KHCO_3$ , c = 230 mmol/L

Standardna otopina cijanomethemoglobina (produkta),  $\gamma = 0,6$  g/L odgovara hemoglobinu,  $\gamma = 150$  g/L

Radni reagens: pomiješati 25 mL R1 i 25 mL R2 te razrijediti s 450 mL destilirane vode

Uzorak: puna krv

Epruvete, automatska pipeta, spektrofotometar, kivete

## Postupak

U epruветama pripremiti otopine standarda i probe prema sljedećoj tablici.

	standard	proba
V(radnog reagensa)* /mL	-	2,50
V(uzorka)/mL	-	0,02
V(standarda)/mL	2,50	-

\*OPREZI! Cijanid je otrov

Dobro promiješati. Nakon inkubacije od 5 minuta pri sobnoj temperaturi (20-25°C) sadržaj epruвета prenijeti u kivete za fotometriранje i izmjeriti apsorbanciju probe,  $\Delta A_{Pr}$  i standarda,  $\Delta A_{St}$ , prema slijepoj probi reagensa (zapravo mjerite  $\Delta A$  tj. povećanje apsorbancije u odnosu na reagens), pri valnoj duljini 546 nm. Izračunati masenu koncentraciju hemoglobina u uzorku.

$A_{Pr}$	
$A_{St}$	
$\gamma_{St}$	

$\gamma(\text{Hb}) =$

## Referentne vrijednosti

žene	115-155 g/L
muškarci	125-175 g/L

## Zadatak 2. Spektrofotometrijska metoda određivanja ukupnog i konjugiranog bilirubina

### Načelo

Bilirubin reagira s 2,4-dikloranilinom stvarajući obojeni azo-bilirubin s maksimumom apsorpcije pri 546 nm. Intenzitet obojenja ovisi o koncentraciji bilirubina.

Ukupni bilirubin određuje se u prisutnosti detergenta, dok u odsutnosti detergenta s 2,4-dikloranilinom reagira samo konjugirani (tzv. direktni) bilirubin.

### Reagensi i pribor

R1: 2,4-dikloranilin 2,22 mmol/L

HCl 53,33 mmol/L

detergent;

R2: 2,4-dikloranilin 2,22 mmol/L

HCl 53,33 mmol/L

R3: Natrijev nitrit 222,20 mmol/L

Radni reagens 1: pomiješati R1 i R3 u odnosu volumena 100+1

Radni reagens 2: pomiješati R2 i R3 u odnosu volumena 100+1

Uzorak: serum

Epruвете, automatska pipeta, spektrofotometar i kivete

## 2.1. Određivanje koncentracije ukupnog bilirubina

### Postupak

U epruvetama pripremite otopine prema sljedećoj tablici.

	proba	slijepa proba
V(uzorka)/mL	0,1	0,1
V(radnog reagensa 1) / mL	1,0	-
V(otopine R1)/mL	-	1,0

Promiješajte i ostavite stajati na sobnoj temperaturi **zaštićeno od svjetla**. Nakon točno 10 minuta izmjerite apsorbanciju probe,  $A_{Pr}$  i slijepa probe,  $A_{SP}$  prema destiliranoj vodi pri 546 nm.

$A_{Pr}$	
$A_{SP}$	

### Račun:

Koncentracija bilirubina izražena jedinicom  $\mu\text{mol/L}$  dobiva se množenjem razlike vrijednosti apsorbancija probe i slijepa probe ( $A_{Pr} - A_{SP}$ ) s konstantom koja iznosi **214**, a sadržava veličine volumena reakcijske smjese i uzorka, faktor za preračunavanje mol/L u  $\mu\text{mol/L}$  i molarni koeficijent apsorpcije obojenog azo-bilirubina ( $\epsilon$ ).

$c(\text{bilirubin ukupni}) = \text{_____} \mu\text{mol/L}$

## 2.2. Određivanje koncentracije konjugiranog bilirubina

	proba	slijepa proba
V(uzorka)/mL	0,1	0,1
V(radnog reagensa 2)/mL	1,0	-
V(otopine R2)/mL	-	1,0

Pomiješati i ostaviti stajati na sobnoj temperaturi **zaštićeno od svjetla**. Nakon točno 5 minuta izmjeriti apsorbanciju probe,  $A_{Pr}$  i slijepa probe,  $A_{SP}$ , prema destiliranoj vodi pri 546 nm.

$A_{Pr}$	
$A_{SP}$	

## Račun

Račun kao u zadatku 2.1.

$c(\text{bilirubin konjugirani}) =$

## Referentne vrijednosti

ukupni bilirubin (odrasli)	do 19 $\mu\text{mol/L}$
ukupni bilirubin (novorođenčad)	do 225
konjugirani bilirubin	do 5 $\mu\text{mol/L}$

## Napomene

1. Uzorak za analizu treba zaštititi od direktnog svjetla, kako bi se izbjegle lažno niske ili čak negativne vrijednosti, nastale zbog razgradnje bilirubina.
2. Uzorak seruma ne smije biti hemolitičan. Naime, u prisutnosti hemoglobina za vrijeme preinkubacije s HCl, hemoglobin se oksidira u methemoglobin uz istodobno stvaranje  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  djeluje na azobilirubin koji je nastao u glavnoj reakciji tako da ga razgrađuje, te je uzrokom lažno nižih vrijednosti bilirubina u hemolitičkim uzorcima.
3. Bilirubin analitički interferira kod određivanja koncentracija glukoze i kreatinina, pa su vrijednosti ovih tvari kod hiperbilirubinemije lažno snižene.

## Zadatak 3. Kvalitativna analiza prisutnosti žučnih boja u mokraći

Bilirubin se izlučuje u mokraći samo u patološkim stanjima, kada ga oštećena jetra ne može metabolizirati, ili kod kolestaze, kada žuč ne može nesmetano otjecati. Urobilinogen se normalno u malim količinama izlučuje mokraćom (0,5–5  $\mu\text{mol}$  na dan). Kod kolestaze može u mokraći biti potpuno odsutan, dok pri oštećenju jetrenih stanica i povećanoj hemolizi eritrocita urobilinogen u većoj količini prelazi u mokraću.

### **Reagensi i pribor**

Alkoholna otopina joda,  $c = 39,4 \text{ mmol/L}$

Ehrlichov reagens: p-dimetilaminobenzaldehid,  $c = 0,134 \text{ mol/L}$

HCl,  $c = 5,4 \text{ mol/L}$

Uzorak: mokraća

Epruvete i kapalice

### **3.1. Dokazivanje prisutnosti bilirubina u mokraći metodom po Rosinu**

#### **Načelo**

U prisutnosti joda bilirubin se oksidira u obojene produkte, zeleni biliverdin i plavi bilicijan.

#### **Postupak**

U čistu epruvetu kapalicom dodati 2 mL mokraće, a zatim uz stijenku epruvete oprezno dodavati 5 – 10 kapi otopine joda, pazeći pri tome da ne dođe do miješanja tekućina. Ako je bilirubin pozitivan u mokraći, na dodirnoj plohi dviju tekućina pojavit će se zelein prsten nastalog biliverdina.



### 3.2. Dokazivanje prisutnosti urobilinogena u mokraći metodom po Ehrlichu

#### Načelo

U kiseloj sredini *p*-dimetilaminobenzaldehid stvara s urobilinogenom crvenkasti kondenzacijski spoj.

#### Postupak

U čistu epruvetu kapalicom dodati 2 mL mokraće i zatim dodati 2–4 kapi reagensa. Svijetlonarančasta obojenost dokaz je prisutnosti urobilinogena. Intenzivnija narančasta do crvena obojenost upućuje na pojačano izlučivanje urobilinogena mokraćom.

Koristeći se sljedećom tablicom i podatcima koje ste dobili praktičnim radom (određivanjem koncentracija ukupnog i konjugiranog bilirubina u serumu te dokazivanjem prisutnosti bilirubina i urobilinogena u mokraći), pretpostavite o kojem je tipu žutice riječ!

	referentne vrijednosti	hemolitička žutica*	hepatocelularna žutica*	kolestatska žutica*
ukupni bilirubin (odrasli)	do 19 $\mu\text{mol/L}$	do 75 $\mu\text{mol/L}$	povišen**	jako povišen
bilirubin u mokraći	negativan	negativan	pozitivan	pozitivan
urobilinogen u mokraći	prisutan	povišen (+)	normalan do povišen (++)	negativan
hemoglobin u krvi	115-155 g/L (žene) 125-175 g/L (muškarci)	snižen	normalan	normalan

Napomene:

\* Određivanje tipa žutice uključuje i određivanje aktivnosti enzima AST, ALT, LDH, ALP i GGT te koncentracije ukupnih proteina i albumina. \*\*Ovisno o stupnju oštećenja.

ukupni bilirubin		tip žutice:
bilirubin u mokraći		
urobilinogen u mokraći		
hemoglobin u krvi		

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_

## Vježba 6.

### ACIDO-BAZNI I MINERALNI STATUS ORGANIZMA

*Svrha je vježbe upoznavanje metoda kvantitativnog i kvalitativnog određivanja iona, odnosno soli koje su uključene u održavanje acido-baznog (kiselo-baznog) i mineralnog statusa ljudskog organizma.*

#### Elektroliti krvne plazme

U krvnoj plazmi su u disociranom obliku prisutni brojni elektroliti. Od kationa su najzastupljeniji ioni natrija, kalija, kalcija i magnezija dok su od aniona najzastupljeniji kloridni ioni, hidrogenkarbonatni i hidrogenfosfatni ioni (tablica 4.2.). Neki dvovalentni kationi se nalaze u djelomično ili potpuno vezanom obliku za proteine krvi ( $\text{Fe}^{2+}$  za transferin,  $\text{Cu}^{2+}$  za ceruloplazmin,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  za albumin), a stupanj preraspodjele vezanog i slobodnog oblika ovisi o brojnim čimbenicima od kojih je najznačajniji pH krvi. Elektroliti krvne plazme imaju brojne značajne uloge kao što su održavanje osmotskog tlaka, reguliranje acido-baznog statusa, sudjelovanje u oksido-redukcijskim procesima, i sastavni su dio enzima. Postoje brojne metode za određivanje koncentracije pojedinih elektrolita plazme kao što su potenciometrijske, volumetrijske (titrimetrijske), kolorimetrijske metode te metode plamene atomske emisijske spektrometrije. U kliničkoj primjeni danas se koristi potenciometrijsko određivanje pomoću ion-selektivnih elektroda, koje su često sastavni dio tzv. analizatora iona. Ion-selektivne elektrode uređaja konstruirane su kao protočne elektrode. Kada uzorak dođe u dodir sa selektivnom membranom elektrode, zbog selektivnog propuštanja samo odgovarajuće (ispitivane) vrste iona, mijenja se potencijal mjerne elektrode, a time i razlika između potencijala mjerne i referentne elektrode. Uređaj registriira elektromotornu silu ( $E_{MS}$ ) članka koja je ovisna o koncentraciji iona u uzorku.

#### Kalcijev ion

Ljudsko tijelo sadržava prosječno 1180 g kalcijevog iona. Od toga je čak oko 99% vezano u teško topljivim solima (mineralima) koje grade kosti i zube. Preostalih 1% kalcijevog iona većim je dijelom u izvanstaničnim tjelesnim tekućinama, te manjim dijelom u stanicama, a prisutan je u vezanom obliku ili kao slobodni ion,  $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ .

U krvi se kalcijev ion, vezan i slobodan, nalazi pretežno u krvnoj plazmi. Eritrociti ga sadržavaju vrlo malo. Zato se kalcijev ion određuje u krvnom serumu, gdje je njegova koncentracija u zdrava čovjeka 2,25–2,75 mmol/L. Fetalni serum sadržava 2,75–3,0 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ .

Kalcijev se ion u krvnom serumu nalazi u dva oblika, kao difuzibilni i nedifuzibilni (tabl. 4.1.). Nedifuzibilnim se smatra kalcijev ion vezan na serumske proteine. Difuzibilni kalcijev ion čini 50–60% ukupnog  $\text{Ca}^{2+}$  u serumu, a može biti slobodan ( $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ ) i/ili vezan u kompleksima s citratom, hidrogenkarbonatom, sulfatom te hidrogenfosfatom. Topljivost kalcijeva fosfata veća je u krvi nego u čistoj vodi, a ovisi o pH, parcijalnom tlaku  $\text{CO}_2$ , ionskoj jakosti, koncentraciji proteina, te iona magnezija i anorganskog fosfata. Pri konstantnom pH krvi (7,4), topljivost je obrnuto razmjerna koncentraciji  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$ , a razmjerna koncentraciji magnezijeva iona i albumina. Većina je difuzibilnog  $\text{Ca}^{2+}$  slobodna i samo je slobodni kalcijev ion fiziološki aktivna forma. Njegova se koncentracija u serumu mijenja obrnuto proporcionalno s pH, pri čemu se koncentracija ukupnog  $\text{Ca}^{2+}$  ne mijenja. Drugim riječima, smanjenjem koncentracije iona  $\text{H}^+$ , smanjuje se i koncentracija slobodnog kalcijevog iona, i obratno. Koncentracija  $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$  smanjuje se i s povećanjem koncentracije  $\text{HCO}_3^-$  ili  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

**Tablica 6-1.** Referentne vrijednosti kalcijevog iona u serumu

<b>ukupni kalcijev ion u serumu:</b>	2,25–2,75 mmol/L	
<b>nedifuzibilni:</b>	1,12–1,25 mmol/L	
<b>difuzibilni:</b>	1,12–1,50 mmol/L	slobodni: 1,05–1,40 mmol/L
		kompleksno vezani: 0,05–0,125 mmol/L

**Magnezijev ion**

Ljudsko tijelo sadržava oko 25 g magnezijevog iona, vezanog i slobodnog kao  $Mg^{2+}(aq)$ . Više od 50% vezano je u kostima u obliku teško topljivih soli. Ostatak se većim dijelom nalazi u stanicama, te manjim dijelom u izvanstaničnim tjelesnim tekućinama, a prevladava slobodni  $Mg^{2+}(aq)$  oblik.

Većinu magnezijevog iona u krvi sadržavaju eritrociti, oko 2,25 do 3 mmol/L. To je oko tri puta više nego u serumu, gdje mu koncentracija iznosi 0,60–1,10 mmol/L. U serumu je oko 70–85% magnezijevog iona difuzibilno, a ostatak je vezan za proteine, ponajprije albumin. Najveći je dio difuzibilnog serumskog  $Mg^{2+}$  slobodan, a ostatak je vezan s fosfatima, citratima i drugim kompleksima.

**Natrijev ion**

U čovjekovu tijelu, oko dvije trećine ukupnog sadržaja natrijeva iona ( $Na^+$ ) nalazi se u tjelesnim tekućinama, dok je ostatak vezan u kostima. Natrijev ion kvantitativno je najzastupljeniji kation u svim izvanstaničnim tjelesnim tekućinama, a prati ga ponajprije kloridni ion. Prosječna koncentracija u krvnoj plazmi iznosi 143 mmol/L. Ključan je u održavanju i regulaciji osmotskoga tlaka krvne plazme i ostalih izvanstaničnih tekućina, te uravnotežene raspodjele vode u organizmu. S hidrogenkarbonatnim i hidrogenfosfatnim ionima čini anorganske pufere krvne plazme i drugih izvanstaničnih tekućina.  $Na^+$  ima bitnu ulogu u procesu depolarizacije membrana živčanih i mišićnih stanica, odnosno sudjeluje u stvaranju podražaja. Unosi se hranom, a dnevne potrebe, 5 do 15 g NaCl, znatno ovise o fizičkoj aktivnosti, tj. o gubitku znojenjem. Resorbira se u tankome crijevu, a u epitelne stanice crijeva prenosi kotransportom s glukozom, zbog potrebe kretanja iz područja niže u područje više koncentracije. Iz tijela se izlučuje putem mokraćne i znojne. Hormon aldosteron pojačava reapsorpciju  $Na^+$  u distalnim bubrežnim kanalima i time smanjuje njegov gubitak.

**Kalijev ion**

Kalijev ion ( $K^+$ ) kvantitativno je najzastupljeniji kation stanične tekućine, dok ga je u izvanstaničnim tekućinama malo. U krvnoj plazmi njegova koncentracija iznosi svega 5 mmol/L. U čovjekovu organizmu ima više važnih uloga. Značajno utječe na mišićnu aktivnost, posebice srčanog mišića. S hidrogenfosfatnim i dihidrogenfosfatnim ionima čini glavni anorganski pufer stanične tekućine. Također, određuje i regulira osmotski tlak stanične citoplazme. Sudjeluje u održavanju potencijala stanične membrane u mirovanju, kao i u njezinoj polarizaciji pri prijenosu signala. Visoka unutarstanična koncentracija  $K^+$  povoljno djeluje na sintezu proteina u ribosomima. Aktivator je niza enzima, primjerice glikolitičkog enzima piruvat-kinaze. Unosi se hranom, a dnevne potrebe iznose oko 4 g. Resorbira se kao i  $Na^+$  u tankome crijevu, a izlučuje se preko bubrega, te dijelom putem probavnoga trakta. Zdravi su bubrezi vrlo učinkoviti u uklanjanju ovog kationa, pa je mogućnost hiperkalijemije u zdrava čovjeka minimalna. Pri uklanjanju putem probavnoga trakta,  $K^+$  se dijelom ponovno resorbira. Poremećaji u radu probavnoga trakta s posljedicom ubrzanog prolaska crijevnog sadržaja, mogu izazvati značajno sniženje koncentracije  $K^+$  u krvi. To se očituje općom klonulošću i oslabljenim radom srčanog mišića. I metabolizam  $K^+$  je, kao i  $Na^+$ , reguliran aldosteronom koji na razini

distalnih bubrežnih tubula omogućuje uklanjanje  $K^+$  iz krvne plazme. Aldosteron, dakle, regulira pravilan odnos koncentracija  $Na^+/K^+$ .

### Kloridni ion

Kloridni ion je kvantitativno najzastupljeniji anion izvanstaničnih tekućina i uglavnom prati  $Na^+$ . Prosječna koncentracija iona  $Cl^-$  u krvnoj plazmi iznosi 103 mmol/L. Pridonosi održavanju i regulaciji osmotskoga tlaka. U krvi regulira acido-baznu ravnotežu, jer iz plazme ulazi u eritrocite kao zamjena za  $HCO_3^-$ -anion, koji iz eritrocita difundira u plazmu. Sudjeluje u sintezi HCl želučanog soka i regulira promet vode u organizmu.

Kloridni se ion u organizam unosi u obliku kuhinjske soli. Resorbira se u tankome crijevu, a izlučuje se putem bubrega i kože. Metabolizam u organizmu reguliraju mineralokortikoidi koji, regulirajući metabolizam  $Na^+$ , reguliraju i metabolizam  $Cl^-$ .

### Hidrogenkarbonatni ion

Hidrogenkarbonatni ion ( $HCO_3^-$ , bikarbonat) u čovjekovu organizmu se neprekidno stvara iz  $CO_2$ , koji je krajnji katabolički produkt većine organskih spojeva. Nastali  $CO_2$  s vodom daje ugljičnu kiselinu. Ovu reakciju katalizira enzim karboanhidraza. Disocijacijom ugljične kiseline nastaje  $HCO_3^-$ . Eritrociti sadržavaju karboanhidrazu i mogu sintetizirati  $HCO_3^-$ .

$HCO_3^-$  se uklanja putem bubrega. Njegov je metabolizam reguliran mineralokortikoidima koji na razini bubrežnih distalnih tubula uvjetuju uklanjanje  $HCO_3^-$ , uz uštedu iona  $Cl^-$ .

## Zadatak 1. Određivanje hidrogenkarbonata i klorida po Scribneru

### 1.1. Volumentrijsko određivanje hidrogenkarbonata u serumu

#### Načelo

Dodatkom  $HNO_3$  u suvišku, ion  $HCO_3^-$  kvantitativno se prevede u jednaku količinu  $CO_2(g)$ , koji se kao plin istisne iz uzorka. Neppureagirali suvišak  $HNO_3$  odredi se titracijom sa standardnom otopinom NaOH uz indikator difenilkarbazon.

#### Reagensi i pribor

Standardna otopina  $HNO_3$  ( $c = 0,1000$  mol/L)

Standardna otopina NaOH ( $c = 0,1000$  mol/L)

Otopina indikatora: 0,4% otopina difenilkarbazona u etanolu

Uzorak: ljudski serum

Hagedornova epruveta, bireta, mikrobireta

#### Postupak

U širokoj epruveti pomiješajte 1,00 mL seruma i 1,00 mL standardne otopine  $HNO_3$  te kružno mućkajte najmanje 0,5 minute da se iz smjese istisne nastali  $CO_2(g)$ . Potom dodajte 4 kapi indikatora i višak  $HNO_3$  retitrirajte standardnom otopinom NaOH dok se od prve suvišne kapi ne pojavi crvena boja indikatora. (Crvena boja indikatora mora biti vidljiva barem jednu minutu!)

### Račun



$V(\text{utrošene std. otopine NaOH}) =$

Prema slijedu reakcija i stehiometrijskim odnosima reaktanata vrijedi:

$$n(\text{HCO}_3^-) = n(\text{HNO}_3) - n(\text{NaOH})$$

Uvrštavanjem veličina poznatih vrijednosti izvodi se izraz:

$$c(\text{HCO}_3^-) = \frac{c(\text{HNO}_3)V(\text{ot. HNO}_3) - c(\text{NaOH})V(\text{ot. NaOH})}{V_{\text{uzorka}}(\text{ot. HCO}_3^-)}$$

### Rezultat

$$c(\text{HCO}_3^-) = \quad \text{mol/L} = \quad \text{mmol/L}$$

**Referentne vrijednosti:** 24-28 mmol/L

Usporedite rezultat s referentnim vrijednostima!

## 1.2. Volumetrijsko određivanje kloridnog iona u serumu

### Načelo

Koncentracija kloridnog iona u uzorku seruma odredi se titracijom standardnom otopinom živinog(II) nitrata. Kloridni ion se kvantitativno veže u živin(II) klorid. Ion žive(II) iz prve suvišne dodane kapi reagira s indikatorom difenilkarbazonom, stvarajući ljubičasto obojeni kompleks. Reakcija se izvodi u kiselom mediju (pH 3,0–4,5), zakiseljavanjem s otopinom  $\text{HNO}_3$ , kako bi se spriječila hidroliza iona  $\text{Hg}^{2+}$ , kao i vezanje toga iona sa SH-skupinama proteina i s drugim potencijalno prisutnim ionima halogenida.

### Reagensi i pribor

Otopina  $\text{HNO}_3$  ( $c = 0,1000 \text{ mol/L}$ )

Standardna otopina  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  ( $c = 0,0500 \text{ mol/L}$ )

Otopina indikatora: 0,4% otopina difenilkarbazona u etanolu

Uzorak: ljudski serum odnosno reakcijska smjesa preostala nakon određivanja hidrogenkarbonata

Hagedornova epruveta, bireta, mikrobireta

### Postupak

Smjesi sa serumom, preostaloj nakon određivanja hidrogenkarbonata, dodajte 2,00 mL otopine HNO<sub>3</sub>, te titirajte standardnom otopinom Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> dok se od prve suvišne kapi boja titrirane otopine ne promijeni u ljubičastu, zbog nastanka kompleksa indikatora s ionom žive(II).

### Račun

Kemijska jednačba reakcije:  $\text{Cl}^-(\text{aq}) + \text{Hg}(\text{NO}_3)_2(\text{aq}) \rightarrow$

$V(\text{utrošene std. otopine Hg}(\text{NO}_3)_2) =$

$n(\text{Cl}^-) =$

$c(\text{Cl}^-) =$

### Rezultat:

$c(\text{Cl}^-) =$  mol/L = mmol/L

**Referentne vrijednosti:** 95-106 mmol/L

Usporedite rezultat s referentnim vrijednostima!

### Napomena

Na isti način određuje se i koncentracija kloridnog iona u znoju. Poticanje znojenja provodi se postupkom pilokarpinske iontoforeze, pri čemu se koristi kationsko svojstvo kolinergičnog lijeka pilokarpina da u krugu istomjerne struje prodire u kožu i tako potiče žlijezde znojnice na izlučivanje znoja. Kloridni ion iz znoja određuju se u djece koja boluju od cistične fibroze.

### ELEKTROLITI SLINE

Neki sastojci krvne plazme (elektroliti, hormoni, citokini, imunoglobulini i različiti ksenobotici – lijekovi i droge) mogu se izlučivati putem žlijezda slinovnica te stoga možemo reći da je slina derivat krvne plazme. U slini su prisutni brojni elektroliti. Od anorganskih kationa najzastupljeniji su ioni kalcija, natrija, magnezija i kalija, dok su od aniona najzastupljeniji hidrogenkarbonatni i fosfatni ioni, te fluoridni, kloridni i tiocijanatni ioni. Međutim, postoje značajne razlike u koncentraciji elektrolita u slini u odnosu na krvnu plazmu, a također postoje i razlike u koncentraciji elektrolita između osnovne, nestimulirane sline (ovisi samo o stanju hidratacije organizma) i stimulirane sline (ovisi o mirisnim, okusnim, mehaničkim i psihološkim podražajima) (tablica 4.2).

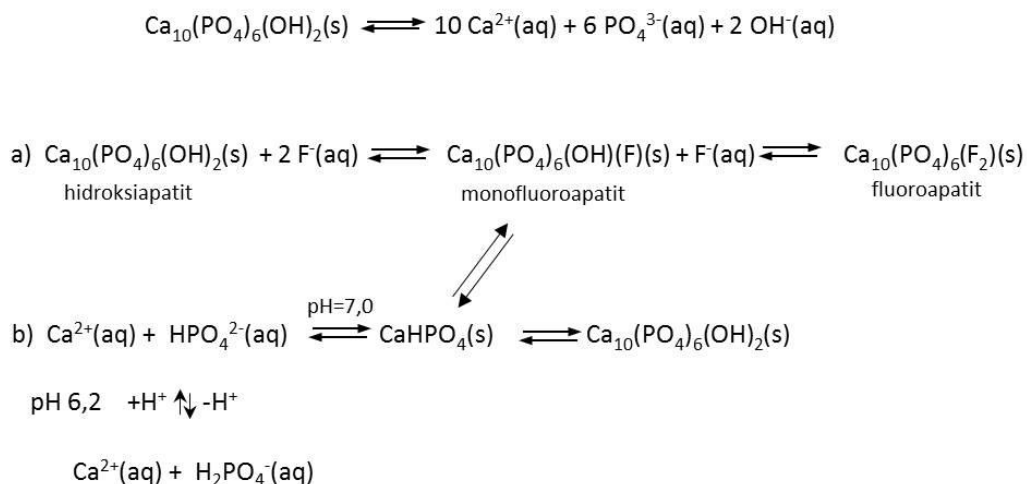
**Tablica 6-2.** Koncentracija pojedinih elektrolita u stimuliranoj, nestimuliranoj slini i krvnoj plazmi

Elektrolit	Nestimulirana slina (mmol/L)	Stimulirana slina (mmol/L)	Krvna plazma (mmol/L)
Na <sup>+</sup>	15	30	140
Ca <sup>2+</sup>	2	4	2,5
K <sup>+</sup>	25	4,5	4,5
Cl <sup>-</sup>	23	40	105
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1	60	27
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7-8	2-3	4

Slina je zasićena ionima kalcija, fosfata i hidroksida. Oni istovremeno predstavljaju i osnovne sastojke kristala **hidroksiapatita** (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>), koji je glavna anorganska komponenta zubne cakline (površinski sloj zuba, najtvrdje tkivo organizma). Zubna caklina je u direktnom kontaktu sa slinom koja sadrži veliki postotak vode. Osim što ima značajnu ulogu u samočišćenju usne šupljine, voda djeluje kao otapalo i na zubnu caklinu. Između iona hidroksiapatita i iona u slini uspostavlja se kontrolirani ravnotežni odnos koji se suprotstavlja otapajućem djelovanju vode. Naime, između hidroksiapatita cakline i sline može doći do ionske izmjene. Kod **izo-ionske izmjene** ioni kalcija iz hidroksiapatita zamjenjuju se s ionima kalcija iz sline pri čemu ne dolazi do biokemijske promjene hidroksiapatita te stoga nema posljedice na kvalitetu zubne cakline. Pored toga što ioni kalcija i fosfata umanjuju nepoželjno djelovanje vode iz sline na zubnu caklinu, kalcijevi ioni su značajni i za proces obnavljanja oštećenih dijelova zubne cakline, odnosno važni su za proces remineralizacije, suprotno procesu demineralizacije (otapanje kristala hidroksiapatita pod utjecajem kisele sredine). Proces remineralizacije oštećene zubne cakline podrazumijeva ponovno skladištenje iona na mjesta iz kojih su ioni kalcija izašli kada lokalni pH dosegne 5,5. Ovaj proces je moguć samo u površinskim dijelovima zubne cakline, a ako se proces demineralizacije proširio dublje u caklinu, remineralizacija pod utjecajem iona kalcija i fosfata iz sline nije moguća. Mehanizam procesa remineralizacije još uvijek nije točno razjašnjen, ali se smatra da se uz pomoć proteina sline koji pokazuju afinitet prema kalciju (staterin, fosfoproteini, kiseli prolinom bogati proteini - PRP, engl. *proline rich proteins*) osigurava kritična koncentracija iona koji se u trenutku određene pH-vrijednosti sline (alkalno područje) oslobađaju i talože u oštećeno mjesto na caklini. Kalcijevi ioni iz sline imaju značajnu ulogu u stvaranju tzv. stečene zubne pelikule, vezanjem kiselih salivarnih proteina i glikoproteina na zubnu caklinu, budući se oni ne mogu direktno vezati na negativno nabijenu površinu cakline. **Zubnu pelikulu** čini tanak sloj glikoproteina koji se iz sline talože na površinu zuba i predstavlja uvjetno korisnu organsku zubnu naslagu na površini zubne cakline, a stvara se neposredno nakon pranja zubi i djelomično umanjuje trošenje cakline podmazivanjem grizne površine zuba. Budući da sadrži značajnu koncentraciju kalcijevih iona iz sline, zubna pelikula ima i značajnu ulogu u procesu remineralizacije cakline. Istovremeno, zubna pelikula predstavlja podlogu za stvaranje štetne naslage na zubima, odnosno zubnog plaka. Kod **hetero-ionske izmjene** ioni kalcija iz hidroksiapatita zamjenjuju se s nekim drugim dvovalentnim kationom iz sline (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) čime se mijenja biokemijski sastav hidroksiapatita. To se negativno odražava na kvalitetu zubne cakline, odnosno dolazi do procesa demineralizacije cakline. Poznata je samo jedna pozitivna hetero-ionska izmjena - hidroksidnih iona u hidroksiapatitu ( $K_{so}(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2) = 2,3 \times 10^{-39} \text{ mol}^9/\text{L}^9$ ) s fluoridnim ionima pri čemu nastaje teško topljiva sol fluoroapatit ( $K_{so}(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2) = 3,2 \times 10^{-60} \text{ mol}^9/\text{L}^9$ ), spoj znatno manje topljivosti u kiseloj sredini i veće čvrstoće od hidroksiapatita (slika 4.1.). Taj proces ima važnu ulogu u zaštiti zubne cakline sprečavanjem

ugradnje drugih iona koji čine glavne "nečistoće" cakline i u sprečavanju nastanka karijesa.

**Fluoridi** su elektroliti sline koji se primjenjuju sistemski i lokalno u cilju prevencije nastanka zubnog karijesa. Međutim, istraživanja su pokazala da ugradnja fluora u hidroksiapatit cakline sistemskom ili lokalnom primjenom, nije najvažniji mehanizam njegovog preventivnog djelovanja na zubni karijes. Fluoridni ioni također štite zubnu caklinu inhibiranjem rasta bakterija (bakteriostatičko djelovanje). Jedan od bakterijskih enzima koji se inhibira djelovanjem fluorida je glikolitički enzim enolaza. Na taj način se sprječava nastanak kiselog metabolita - mliječne kiseline koja je odgovorna za smanjenje pH-vrijednosti sline i demineralizaciju cakline. Značajnu ulogu u prevenciji karijesa ima i mehanizam topikalnih fluorida koji se temelji na skladištenju kalcijevog fluorida ( $\text{CaF}_2$ ) na površini zubne cakline nakon lokalne aplikacije otopine fluora. Kada se u usnoj šupljini stvore kiseli uvjeti (smanjenje pH-vrijednosti) dolazi do otapanja  $\text{CaF}_2$  i oslobađanja iona fluora, pa na taj način povećana koncentracija fluoridnih iona utječe na pomicanje ravnoteže u smjeru remineralizacije. Fluoridni ioni se u organizam unose prehranom, putem fluorirane vode, te putem zubne paste obogaćene fluorom. Nakon apsorpcije iz probavnog sustava fluoridni ion dopijeva u cirkulaciju i raspoređuje se po tkivima i organima čovjeka. Iz krvi fluoridni ion dopijeva u slinu gdje je njegova koncentracija za 30-35% niža u odnosu na koncentraciju u krvnoj plazmi. Zdrava zubna caklina sadrži prosječno 0,7-2,1  $\mu\text{g/g}$  fluoridnih iona. Povećani unos fluoridnih iona za vrijeme razvoja može uzrokovati skeletnu i/ili dentalnu fluorozu. **Dentalnu fluorozu** karakterizira porozna caklina i pojava bijelih do žuto-smeđih pjega na zubnoj caklini.



**Slika 6-1.** Stvaranje i otapanje hidroksiapatita i fluoroapatita. a) Fluoroapatit nastaje iz hidroksiapatita izomorfnom zamjenom hidroksidnih iona fluoridnim ionima; b) Fluoroapatit ima manju topljivost od hidroksiapatita. U kiselom mediju hidroksiapatit prelazi u kalcijev-mono-/di-hidrogenfosfat, dok alkalni medij potiče reverzibilnu reakciju nastanka hidroksiapatita. Strelice između (a) i (b) prikazuju ubrzano stvaranje fluoroapatita i usporenu pretvorbu u amorfni kalcijev-hidrogenfosfat u prisutnosti fluoridnih iona.

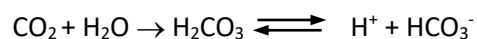
**Tiocijanatni ioni** su elektroliti sline prisutni u relativno niskoj koncentraciji (0,3-1,5 mmol/L) i sa salivarnom peroksidazom sudjeluju u antibakterijskoj i antioksidacijskoj zaštiti usne šupljine. Salivarna peroksidaza, enzim koji izlučuju žlijezde slinovnice u prisutnosti tiocijanatnih iona ( $\text{SCN}^{-}$ ) reducira vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), koji nastaje kao produkt na metaboličkom putu bakterija iz usne šupljine. Tiocijanatni ioni su donori elektrona na sličan način kao što je reducirani glutation donor elektrona u drugim biološkim sustavima, primjerice eritrocitima. Vodikov peroksid uz tiocijanatne ione stvara hipotiocijanatnu kiselinu (HOSCN) i hipotiocijanate ( $\text{OSCN}^{-}$ ) koji imaju antibakterijski učinak. Antibakterijska aktivnost ovih spojeva temelji se na reakciji s tiolnim skupinama bakterijskih enzima



glikolize (inhibicija heksokinaze, aldolaze i piruvat-kinaze). Vrlo niske koncentracije HOSCN i OSCN pokazale su se učinkovite u eliminaciji virusa koji se prenose oralno (primjerice herpes simplex 1, respiracijski sincicijski virus, HIV). Tiocijanatni ioni nastaju i tijekom probave nekih vrsta povrća (brokula, cvjetača, kupus, repa, gorušica, rotkvice) koje sadržava glukozinolate ("fitokemikalije", sekundarni produkti metabolizma biljaka) ili unosom hrane koja sadržava tiocijanate kao što su mlijeko i sir. Kod pušača, u odnosu na nepušače, zabilježene su više koncentracije tiocijanatnih iona koji nastaje iz cijanovodika (HCN) iz duhanskog dima tijekom detoksikacije u jetri, a zatim se krvotokom prenose u slinu.

**Karbonatni i fosfatni ioni** su glavni puferi sline, a nužni su za održavanje fiziološke pH-vrijednosti usne šupljine, odnosno za održavanje acido-bazne ravnoteže. U usnoj šupljini nastaje mliječna kiselina kao produkt metabolizma brojnih bakterija i povećava kiselost sline. Time se olakšava izlazak iona kalcija i fosfata iz cakline što uzrokuje demineralizaciju zubne cakline. Karbonatni pufer je glavni pufer u stimuliranoj slini i doprinosi alkalizaciji sline (pH 7,8) čime se smanjuje mogućnost demineralizacije, a omogućuje remineralizaciju zubne cakline. Fosfatni pufer je glavni puferski sustav u nestimuliranoj slini zbog čega je nestimulirana slina slabo kisela (pH 6,1). Fosfati nestimulirane sline važni su za uklanjanje adsorbiranih proteina zubne pelikule sa zubne cakline u uvjetima mirovanja nakon žvakanja hrane i kada nema potrebe da se zubna pelikula dalje zadržava na površini zuba. U fiziološkim uvjetima djelovanjem fosfatnog i karbonatnog pufera pH sline mijenja se od 6,1-7,8 ovisno o izlučivanju stimulirane ili nestimulirane sline.

Salivarna **karboanhidraza VI** je izoenzim visoke aktivnosti prisutan u slini. Osnovna uloga karboanhidraze je u održavanju fiziološke pH-vrijednosti u usnoj šupljini. Karboanhidraza katalizira stvaranje hidrogenkarbonatnih iona.



Visoka koncentracija karboanhidraze VI u slini odgovorna je za smanjenu prevalenciju karijesa. Enzim se adsorbira na zubnu caklinu gdje katalizira konverziju salivarnih hidrogenkarbonatnih iona u CO<sub>2</sub>, što uzrokuje povišenje pH-vrijednosti na površini zuba, a što povoljno utječe na smanjenje razvoja karijesa.

**Kloridni ioni** sline su važni aktivatori salivarne α-amilaze koja je jedan od rijetkih enzima za čiju aktivnost je potreban anion (Cl<sup>-</sup>), a ne kation.

**Kalijevi ioni** u slini prisutni su u znatno većoj koncentraciji nego u krvnoj plazmi što je izuzetak u odnosu na ostale elektrolite sline, čija je koncentracija značajno niža u slini u odnosu na koncentraciju u krvnoj plazmi.

Za određivanje koncentracije elektrolita u slini koriste se različite metode kao što su poteciometrijske, kolorimetrijske metode kao i metode plamene fotometrije i atomske adsorpcijske fotometrije.

## **Zadatak 2.** Kvalitativna analiza iona u slini

### **Načelo**

Prisutnost ispitivanog iona u otopini dokazuje se reakcijom taloženja s odgovarajućim suprotno nabijenim ionom u sastavu reagensa. Produkt reakcije je karakterističan talog teško topljivog spoja ispitivanog iona, prepoznatljiv po boji i konzistenciji. Također, prisutnost određenog iona može se dokazati i izvođenjem specifične reakcije u kojoj nastaje u vodi topljiv produkt karakterističnog obojenja.

## 2.1. Dokazivanje kalcijevog iona u slini

### **Načelo**

Kalcijev ion iz sline reagira s kalijevim oksalatom dajući bijeli talog kalcijeva oksalata koji je topljiv u mineralnim kiselinama, a netopljiv u razrijeđenoj octenoj kiselini.

### **Reagensi i pribor**

2%-tna otopina  $K_2C_2O_4$

1%-tna otopina  $CH_3COOH$

Uzorak: razrijeđena slina (destilirana voda:slina (v/v) 1:1)

Epruveta, pipeta

### **Postupak**

U epruvetu dodajte 1-2 mL razrijeđene sline, zatim dodajte 1-2 mL 3%-tne otopine kalijeva oksalata.

Što ste uočili?

U ionskom obliku napišite kemijsku jednadžbu izvedene reakcije.

Dodajte 3-5 kapi 1%-tne otopine octene kiseline.

Što ste uočili?

## 2.2. Dokazivanje fosfatnog iona u slini

### **Načelo**

Fosfatni ion iz sline u reakciji sa srebrnim nitratom stvara teško topljiv žuti talog topljiv u razrijeđenoj nitratnoj kiselini.

### **Reagensi i pribor**

Otopina  $AgNO_3$

2%-tna otopina  $HNO_3$

Uzorak: umjetna slina

Epruveta, pipeta

### **Postupak**

U epruvetu dodajte 1-2 mL sline, zatim dodajte 1 kapalicu otopine srebrovog nitrata, a zatim dodajte 1 kapalicu razrijeđene otopine nitratne kiseline.

Što ste uočili?

U ionskom obliku napišite kemijsku jednadžbu izvedene reakcije.

### 2.3. Dokazivanje kloridnog iona u slini

#### Načelo

Kloridni ion iz sline u reakciji s otopinom srebrovog nitrata daje bijeli do žućkasti talog srebrovog klorida.

#### Reagensi i pribor

1%-tna otopina  $\text{AgNO}_3$

Uzorak: razrijeđena slina (destilirana voda:slina (v/v) 1:1)

Epruveta, pipeta

#### Postupak

U epruvetu dodajte 1-2 mL razrijeđene sline, zatim dodajte 0,5-1 mL otopine srebrovog nitrata.

Što ste uočili?

U ionskom obliku napišite kemijsku jednadžbu izvedene reakcije.

### 2.4. Dokazivanje tiocijanatnog iona u slini

#### Načelo

Tiocijanatni ion iz sline u reakciji s koncentriranom kloridnom kiselinom i otopinom željezovog klorida daje narančasto obojeni talog željezovog tiocijanata.

#### Reagensi i pribor

Konc. HCl

3%-tna otopina  $\text{FeCl}_3$

Uzorak: razrijeđena slina (destilirana voda:slina (v/v) 1:1)

Epruveta, pipeta

#### Postupak

U epruvetu dodajte 1-2 mL razrijeđene sline, zatim dodajte 1-2 kapi otopine željezovog klorida i 1-2 kapi koncentrirane klorovodične kiseline. Zbog obojanosti reagensa potrebno je napraviti slijepu probu s destiliranom vodom.

Što ste uočili?

U ionskom obliku napišite kemijsku jednadžbu izvedene reakcije.

## **2.5. Dokazivanje sulfatnog iona u slini**

### Načelo

Sulfatni ion iz sline u reakciji s koncentriranom klorovodičnom kiselinom i otopinom barijevog klorida daje bijeli talog barijevog sulfata.

### **Reagensi i pribor**

Konc. HCl  
5%-tna otopina BaCl<sub>2</sub>  
Uzorak: razrijeđena slina (destilirana voda:slina (v/v) 1:1)  
Epruveta, pipeta

### Postupak

U epruvetu dodajte 1-2 mL razrijeđene sline, zatim dodajte 0,5-1 mL koncentrirane klorovodične kiseline i 0,5-1 mL otopine barijeva klorida.

Što ste uočili?

U ionskom obliku napišite kemijsku jednadžbu izvedene reakcije.

## **Zadatak 3. Određivanje pH-vrijednosti sline**

U fiziološkim uvjetima djelovanjem pufera sline pH-vrijednost se mijenja od 6,1-7,8 ovisno o izlučivanju stimulirane ili nestimulirane sline. Točnost u određivanju pH-vrijednosti sline ovisi o vremenskom intervalu između prikupljanja sline i analize. Ukoliko je prikupljena slina dulje vrijeme izložena zraku uslijed postepenog gubitka CO<sub>2</sub> dolazi do povećanja pH-vrijednosti sline. Stoga se određivanje pH sline provodi odmah nakon prikupljanja ili se do analize prikupljena slina pohranjuje na -80°C.

### **Reagensi i pribor**

Lakmus tinktura i/ili pH indikatorske trakice, H<sub>2</sub>O dest.  
Uzorak: razrijeđena slina (destilirana voda:slina (v/v) 1:1)  
Epruvete, stakleni štapići, kapalice

### Postupak

U epruvetu prikupite 1-2 mL sline i dodajte jednaku količinu destilirane vode i promiješajte. Dodajte 2 kapi lakmus tinkture ili testirajte pH otopine sline korištenjem indikatorskih pH trakica.

Što ste uočili?

## Prilog

### Neki dijagnostički parametri acido-bazne ravnoteže u organizmu

Referentne vrijednosti parametara dane su u zagradama!

1. **pH krvi.** Negativni logaritam koncentracije vodikovih iona u krvi (7,36–7,44)
2. **Parcijalni tlak CO<sub>2</sub> u krvi, pCO<sub>2</sub>.** (4,80–5,87 kPa; 36–44 mmHg). U ravnoteži je s koncentracijom H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
3. **Parcijalni tlak O<sub>2</sub> u krvi, pO<sub>2</sub>.** (arterijska krv 10,67–13,83 kPa ili 80–104 mmHg; venska krv 2,67–6,53 kPa ili 20–49 mmHg)
4. **Zasićenost (»saturacija«) krvi (hemoglobina) kisikom, s O<sub>2</sub>** (95–98%). Udio od maksimalno moguće količine kisika vezane za hemoglobin u krvi.
5. **Suvišak baza, BE** (engl. *base excess*), (–2,5 do +2,5 mmol/L). Označuje višak ili manjak baza u krvi, odnosno manjak ili višak nehlapljivih kiselina. Obično se izražava kao količina (**mmol**) kiseline ili lužine koja bi se utrošila za titraciju **1,00 L** potpuno oksigenirane krvi do postizanja normalnog pH (pH 7,4), pri fiziološkom pCO<sub>2</sub> (5,33 kPa ili 40 mmHg) i fiziološkoj temperaturi (38°C).
6. **Standardni HCO<sub>3</sub><sup>–</sup>** (22–26 mmol/L). Koncentracija HCO<sub>3</sub><sup>–</sup> potpuno oksigenirane krvi pri pCO<sub>2</sub> 5,33 kPa i temperaturi 38°C.
7. **Aktualni HCO<sub>3</sub><sup>–</sup>** (22–26 mmol/L). Koncentracija HCO<sub>3</sub><sup>–</sup> u plazmi anaerobno uzete krvi.
8. **Ukupni CO<sub>2</sub>** (23–27 mmol/L). Ukupni sadržaj CO<sub>2</sub> u 1,00 L plazme anaerobno uzete krvi. Uključuje otopljeni CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> vezan na hemoglobin, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i HCO<sub>3</sub><sup>–</sup>.
9. **Puferske baze, BB** (engl. *buffer bases*) (45,5–50,5 mmol/L). Pojam se odnosi na koncentraciju puferskih aniona, uglavnom HCO<sub>3</sub><sup>–</sup>, i proteinskih aniona u oksigeniranoj krvi pri pCO<sub>2</sub> 5,33 kPa i temperaturi 38°C.

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_

## Vježba 7.

### LIPIDI

*Svrha je vježbe upoznati se s ulogom lipida u ljudskom organizmu i mogućnostima određivanja lipidnog statusa ispitanika.*

#### Triacilgliceroli

Triacilgliceroli (TG) čine kvantitativno najznačajniju skupinu lipida u našoj prehrani. Njihova iskoristivost za naš organizam u velikoj mjeri ovisi o učinkovitosti probavnoga trakta, gdje se obavljaju njihova razgradnja i resorpcija. Zbog svojega hidrofobnog karaktera netopljivi su u vodi, što otežava djelovanje lipaza i zahtijeva prisutnost emulgatora kao što su žučne kiseline.

Transport TG-a krvlju također nije moguć u slobodnom obliku, nego se moraju transportirati u sastavu lipoproteina. Triacilgliceroli u serumu mogu potjecati iz hrane (egzogeni) ili su proizvod sinteze u stanicama jetre, crijeva i masnoga tkiva (endogeni). Budući da je unos egzogenih lipida vrlo promjenljiv, od dijagnostičkog je značaja sastav endogenih triacilglicerola. Metodama za određivanje triacilglicerola ne možemo razlikovati endogene od egzogenih, pa je stoga krv za analizu potrebno izvaditi 12 sati nakon posljednjeg obroka, što je dovoljno da se iz cirkulacije zdrave osobe uklone egzogeni triacilgliceroli (u sastavu hilomikrona).

Povećana koncentracija triacilglicerola pojavljuje se u serumu pri nekim poremećajima metabolizma lipoproteina, dok se kao sekundarna hipertrigliceridemija pojavljuje kod čecerne bolesti, opstruktivne žutice, nefroze i brojnih drugih poremećaja. Referentne vrijednosti koncentracije TG-a u serumu kreću se u rasponu od 0,70 do 1,90 mmol/L, a ovisi o dobi (niže su u djece), spolu (u žena su također niže), i o načinu života i prehrani.

U slini je dokazana prisutnost lipida i to uglavnom neutralnih lipida (triacilgliceroli, diacilgliceroli, monoacilgliceroli, "slobodne" masne kiseline, kolesterol i esterificirani kolesterol) koji čine do 75% od ukupnih lipida sline, zatim glikolipida koji čine 20-30% ukupnih lipida i fosfolipida koji čine 2-5% ukupnih lipida sline. Smatra se da lipidni sastav sline nije ovisan o lipidnom sastavu krvi. Lipidni sastav sline može biti promijenjen pod utjecajem mikroorganizama, naročito ako su oni prisutni u velikom broju.

#### **Zadatak 1.** Emulgiranje i enzimska razgradnja triacilglicerola

U ljudi je hidroliza masti važan početni korak u iskorištenju masti iz hrane. Glavna probava masti zbiva se u tankome crijevu pod emulgirajućim djelovanjem soli žučnih kiselina i uz enzimsku hidrolizu djelovanjem lipaze iz gušterače.

#### **Reagensi i pribor**

Pankreasna lipaza; razrijeđene žuč

Lakmus tinktura

Otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, w = 0,02

Uzoraci: ulje, mlijeko

Stalak s epruvetama, kapalice, termostatirana kupelj

### 1.1. Emulgirajuće djelovanje žučnih kiselina

#### Postupak

U jednu epruvetu stavite oko 3 mL (3 kapalice) razrijeđene žuči, a u drugu istu količinu destilirane vode. U obje epruvete dodajte po kap ulja i energično promućkajte.

Ostavite nekoliko minuta i opišite što ste uočili.

Objasnite!

### 1.2. Hidrolitičko djelovanje lipaze

U epruvetu stavite oko 2 mL (2 kapalice) mlijeka, dodajte isti volumen otopine gušteračne lipaze, 4 kapi lakmus tinkture, te 8 kapi  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  do slabo alkalne reakcije. Promućkajte i ostavite 30 minuta u kupelji pri  $37^\circ\text{C}$ .

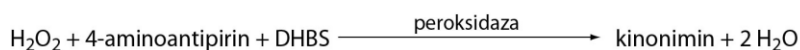
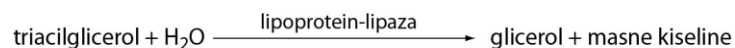
Opišite i objasnite što se događa sa sadržajem epruvete.

Zašto je upotrijebljeno upravo mlijeko i zašto je potreban alkalni pH?

### Zadatak 2. Određivanje koncentracije triacilglicerola u serumu kolorencijskom (PAP) metodom

#### Načelo

Reagens sadržava određene enzime čija je zadaća hidrolizirati triacilglicerole u serumu na glicerol i masne kiseline, te dobiveni glicerol postupno uz dodatak kromogena prevesti u obojeni produkt koji se može mjeriti spektrofotometrijski. Izmjerena apsorbancija razmjerna je koncentraciji prisutnog glicerola, odnosno triacilglicerola.



Napomena: DHBS je 3,5-diklor-2-hidroksibenzen-sulfonat

### Reagensi i pribor

PIPES pufer (pH 7,5),  $c = 50 \text{ mmol/L}$

4-klorofenol,  $c = 5 \text{ mmol/L}$

4-aminofenazon,  $c = 0,25 \text{ mmol/L}$

Magnezijevi ioni,  $c = 4,5 \text{ mmol/L}$

ATP,  $c = 2 \text{ mmol/L}$

Lipaza;  $\geq 1,3 \text{ U/mL}$

Peroksidaza;  $\geq 0,5 \text{ U/mL}$

Glicerol-kinaza;  $\geq 0,4 \text{ U/mL}$

Glicerol-3-fosfat oksidaza ;  $\geq 1,5 \text{ U/mL}$

Natrijev azid; 0,05%

Standard: triacilgliceroli,  $c = \text{_____ mmol/L}$

Uzorak: serum

Epruvete, automatska pipeta, kivete, spektrofotometar

### Postupak

	slijepa proba	standard	proba
V (standard)/ $\mu\text{L}$	–	10	–
V (uzorak)/ $\mu\text{L}$	–	–	10
V (reagens R1)/mL	1,0	1,0	1,0

Prema prikazanome planu pipetiranja pripremite reakcijske smjese, dobro promiješajte i ostavite u kupelji pri  $37^\circ\text{C}$ , 5 minuta (ili 10 min na sobnoj temperaturi). Na spektrofotometru očitajte apsorbanciju standarda i probe prema slijepoj probi pri 500 nm i izračunajte koncentraciju triacilglicerola.

$A_{\text{St}}$	
$A_{\text{Pr}}$	
$c_{\text{St}}$	

$c(\text{TG}) =$

Referentne vrijednosti od 0,70 do 1,90 mmol/L.

### Kolesterol

Čovjek unosi kolesterol (CH) u organizam hranom životinjskog porijekla, ali ga i sam sintetizira. Glavno mjesto sinteze jesu jetra i crijevo, ali se određene količine sintetiziraju u gotovo svim stanicama organizma. Brzina endogene sinteze kolesterola ovisi o djelovanju enzima 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA-reduktaza i *de novo* sinteza kolesterola u ravnoteži je s unosom cirkulirajućeg kolesterola iz krvi. U cirkulaciji se najveći dio kolesterola nalazi esterificiran i vezan u lipoproteinima. Osim kod primarne hiperkolesterolemije, koja je posljedica poremećaja metabolizma kolesterola, povećane se koncentracije pojavljuju kao sekundarni poremećaj u čitavom nizu patoloških stanja kao što su opstruktivna žutica, dijabetes, početna faza hepatitisa, lipidna nefroza itd. Kako je utvrđena povezanost hiperkolesterolemije s koronarnom bolesti i infarktom miokarda, velika je važnost određivanja kolesterola u krvi. Poželjne vrijednosti za kolesterol u serumu su 3,2 do 5,2 mmol/L.



### Zadatak 3. Određivanje koncentracije kolesterola u serumu kolorencimskom (PAP) metodom

#### 3.1. Određivanje koncentracije ukupnog kolesterola u serumu

##### Načelo

Reagens sadržava enzime koji hidroliziraju esterificirani kolesterol i zajedno sa slobodnim plazmatskim kolesterolom prevode ga postupno u produkte koji se mogu mjeriti spektrofotometrijski.



##### Reagensi i pribor

Fosfatni pufer (pH 6,5),  $c = 30 \text{ mmol/L}$

4-aminofenazon,  $c = 0,3 \text{ mmol/L}$

Fenol,  $c = 5 \text{ mmol/L}$

Peroksidaza;  $\geq 5 \text{ KU/L}$

Kolesterol-esteraza;  $\geq 150 \text{ U/L}$

Kolesterol-oksidaza;  $\geq 100 \text{ U/L}$

Natrijev azid; 0,05%

Standard: kolesterol,  $c = \text{_____ mmol/L}$

Uzorak: serum

Epruvete, automatska pipeta, kivete, spektrofotometar

##### Postupak

	slijepa proba	standard	proba
$V(\text{standarda})/\mu\text{L}$	-	10	-
$V(\text{uzorka})/\mu\text{L}$	-	-	10
$V(\text{reagensa})/\text{mL}$	1,0	1,0	1,0

Prema prikazanome planu pipetiranja pripremite reakcijske smjese, dobro promiješajte i 5 minuta ostavite u kupelji pri 37°C (ili 10 min na sobnoj temperaturi). Na spektrofotometru očitajte apsorbanciju standarda i probe prema slijepoj probi pri 500 nm i izračunajte koncentraciju kolesterola.

$A_{Pr}$	
$A_{St}$	
$C_{St}$	

$c(\text{CH}) = \text{_____ mmol/L}$

Referentne vrijednosti od 3,2 do 5,2 mmol/L

### 3.2. Određivanje koncentracije HDL-kolesterola u serumu kolorencijskom (PAP) metodom

#### Načelo

Dodatkom polianiona i dvovalentnih kationa serumu ili plazmi, talože se hilomikroni, VLDL-lipoproteini i LDL-lipoproteini, a nakon centrifugiranja u supernatantu mjeri se HDL-kolesterol (HDL-CH) standardnom kolorencijskom (PAP) metodom.

#### Reagensi i pribor

Reagens za taloženje: fosfovolframova kiselina ( $c = 0,55 \text{ mmol/L}$ ); magnezijev klorid ( $c = 25 \text{ mmol/L}$ ); Izmiješati pet dijelova fosfovolframove kiseline i jedan dio otopine magnezijevog klorida.

Radni reagens: isti sastav kao kod određivanja kolesterola u zadatku 5.1.

Standard: kolesterol,  $c = \text{_____ mmol/L}$ ;

Uzorak: serum;

Epruvete za centrifugiranje, epruvete, automatska pipeta, centrifuga, kivete, spektrofotometar

#### Postupak

U epruvetu za centrifugiranje otpipetirajte 200  $\mu\text{L}$  seruma i dodajte 500  $\mu\text{L}$  reagensa za taloženje. Dobro promiješajte, ostavite stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirajte 15 minuta na 4000 o/min. Bistrim supernatantom koristite se kao uzorkom i pipetirajte prema planu.

	<b>sljepa proba</b>	<b>standard</b>	<b>proba</b>
<b>V(destilirana voda)/<math>\mu\text{L}</math></b>	100	-	-
<b>V(standard)/<math>\mu\text{L}</math></b>	-	100	-
<b>V(uzorak)/<math>\mu\text{L}</math></b>	-	-	100
<b>V(reagens R1)/mL</b>	1,0	1,0	1,0

Dobro promiješajte i ostavite 5 minuta u kupelji pri 37°C. Na spektrofotometru očitajte apsorbanciju standarda i probe prema slijepoj probi pri valnoj duljini od 500 nm i izračunajte koncentraciju HDL-kolesterola.

<b>A<sub>Pr</sub></b>	
<b>A<sub>St</sub></b>	
<b>C<sub>St</sub></b>	

$$c(\text{HDL-CH}) = \quad \text{mmol/L}$$

#### Napomene

1. Uzorak HDL-kolesterola je nakon taloženja postojan 7 dana na temperaturi 20–25°C, 3 tjedna na 2–8°C, a 3 mjeseca na -20°C.
2. Na rezultate HDL-kolesterola utječu starost uzorka, hipertrigliceridemija, koncentracija reagensa za taloženje, centrifugiranje, te prisutnost askorbinske kiseline > 142  $\mu\text{mol/L}$ , Hb > 1 g/L i bilirubina > 171  $\mu\text{mol/L}$ .
3. Nakon centrifugiranja supernatant koji sadržava HDL-kolesterol treba biti bistar. Kod seruma s vrijednostima triacilglicerola > 5,0 mmol/L može doći do nepotpunog taloženja lipoproteina (mutan supernatant). U tom slučaju treba postupak taloženja ponoviti s uzorkom razrijeđenim fiziološkom otopinom u omjeru 1+1, a dobivenu vrijednost pomnožiti s 2.

### Kliničko značenje

c(HDL-CH)		poželjna	rizična	visokorizična
muškarci	mmol/L	> 1,4	1,4–0,9	< 0,9
žene	mmol/L	> 1,7	1,7–1,2	< 1,2

Godine 1972. Friedewald je predložio neizravnu metodu određivanja koncentracije LDL-kolesterola kako bi se izbjegla izravna metoda ultracentrifugiranja seruma, što je dugotrajan i nepraktičan postupak, a nije na raspolaganju svakom kliničkom laboratoriju. Prema Friedewaldovoj formuli koncentracija LDL-kolesterola (LDL-CH) može se izračunati ako su poznate serumske koncentracije ukupnoga kolesterola (CH), HDL-kolesterola (HDL-CH) i triacilglicerola (TG):

$$c(\text{LDL-CH}) = c(\text{ukupni CH}) - c(\text{TG}) / 2,2 - c(\text{HDL-CH})$$
$$c(\text{LDL-CH}) / \text{mmol/L} =$$

### Kliničko značenje

c(LDL-CH)	poželjna	rizična	visokorizična
mmol/L	< 3,2	3,2–4,0	> 4,0

Određivanje koncentracije triacilglicerola i kolesterola (ukupni, HDL i LDL) primjenjuje se u dijagnostici hiperlipidemija.

Analizirajte rezultate koje ste dobili za svoj uzorak i korištenjem dostupne literature pokušajte zaključiti o kojem je tipu hiperlipidemije riječ. Obrazložite zaključak!

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_

## Vježba 8.

### ANALIZA MOKRAĆE

*Svrha je vježbe upoznavanje s praktičnom primjenom kvalitativnih kemijskih metoda dokazivanja sastojaka mokraće te usvajanje pojmova vezanih uz procjenu bubrežne funkcije.*

Mokraća je tjelesna izlučina kojom se iz organizma uklanjaju višak vode, mineralnih soli i različitih proizvoda metabolizma, posebice metabolizma dušikovih spojeva. Na izgled i sastav mokraće utječu i brojna patološka stanja, pa je stoga analiza mokraće korisna u dijagnostici raznih bolesti. Ispitivanje sastojaka mokraće često se provodi i u svrhu utvrđivanja unosa i metaboliziranja lijekova i otrovnih tvari.

Dnevni volumen mokraće iznosi između 1 000 i 1 500 mL, gustoća od 1,015 do 1,025 g/mL, a vrijednosti pH u rasponu su od 5 do 7 (4,6–8). Mokraća sadržava 96% vode te 1,5% anorganskih i 2,5% organskih sastojaka (izraženih masenim udjelom).

#### Normalni sastojci mokraće

Glavni sastojci naše hrane jesu ugljikohidrati, proteini i lipidi. Njihovi su razgradni produkti normalni sastojci mokraće.

##### a) Anorganski sastojci

Natrijevi i kalijevi ioni najzastupljeniji su kationi u mokraći, pri čemu natrijevih iona ima dvostruko više od kalijevih. Normalni sastojak mokraće jest amonijak (amonijevi ioni), a u malim su količinama prisutni kalcijevi i magnezijevi ioni. Ioni poput bakra, cinka i mangana u mokraći su prisutni u tragovima. Kloridi su u mokraći kvantitativno najzastupljeniji anioni, a osim toga, nalazimo fosfate, sulfate, te male količine hidrogenkarbonatnih iona.

##### b) Organski sastojci

Normalni organski sastojci mokraće spojevi su s dušikom i spojevi koji ne sadržavaju dušik. Glavnina dušika koji se izlučuje iz organizma mokraćom (oko 95%) sadržana je u urei, mokraćnoj kiselini, kreatininu i amonijevim solima.

#### Patološki sastojci mokraće

Prisutnost nerazgrađenih metabolita u mokraći upućuje na poremećen rad bubrega ili na patološke promjene metabolizma. Patološki sastojci mokraće jesu: proteini, ugljikohidrati, ketonska tijela, hemoglobin, bilirubin i stanični elementi kao eritrociti, leukociti, epitelne stanice i cilindri.

#### Klirens kreatinina

Jedna od metoda procjene bubrežne funkcije provodi se ispitivanjem bubrežnoga klirensa koji ovisi o normalnoj glomerularnoj filtraciji. Bubrežni klirens neke tvari označuje onaj volumen plazme koji bubrezi u jedinici vremena očiste od te tvari (klirens; engl. *clearance*). Tvar koja se u potpunosti slobodno filtrira kroz glomerularne kapilare, a ne reapsorbira iz bubrežnih tubula niti secernira u tubularnu tekućinu jest idealna za procjenu glomerularne filtracije. Takva je tvar inulin, biljni polisaharid (polimer fruktoze), koji se za testiranje inulinskoga klirensa mora primijeniti intravenski. U praksi se češće određuje klirens kreatinina, jer je metoda jednostavnija za izvođenje. Klirens kreatinina je osjetljiviji pokazatelj bubrežne insuficijencije od koncentracije kreatinina u serumu. Normalne su vrijednosti klirensa kreatinina 94 – 156 mL/min. Smanjeni klirens kreatinina nalazi se u patološkim

stanjima koja utječu na filtraciju, a to su:

- smanjeno protjecanje krvi kroz bubrege,
- smanjen broj funkcionalno sposobnih glomerula (lezije bubrežnog parenhima, glomerulonefritis, glomeruloskleroza),
- smanjena glomerularna filtracija koja može biti posljedica niskoga krvnog tlaka, povišenoga osmotskog tlaka zbog hemokoncentracije ili dehidracije, kod proljeva, pri krvarenju ili povišenom intrakapsularnom tlaku u Bowmannovoj kapsuli.

		referentne vrijednosti kreatinina
mokraća	žene:	7,1–15,9 mmol/dan
	muškarci:	8,8–17,7 mmol/dan
serum		62–125 $\mu$ mol/L
klirens		94–156 mL/min

### Zadatak 1. Određivanje koncentracije kreatinina u mokraći

#### Načelo

Kreatinin u reakciji s pikratom stvara spoj narančasto crvene boje čiji se intenzitet određuje spektrofotometrijski.

#### Reagensi i pribor

Otopina pikrinske kiseline,  $c = 35$  mmol/L

Otopina NaOH,  $c = 1,6$  mol/L

Destilirana voda

Standardna otopina kreatinina,  $c = 8,84$  mmol/L

Uzorak: mokraća

Epruvete, automatska pipeta, pipetor, spektrofotometar i kivete

#### Postupak

Pipetirati u epruvete prema planu navedenom u tablici.

	slijepa proba	standard	proba
V(destilirana voda)/mL	2,0	–	–
V(standardna otopina)/mL	–	2,0	–
V(uzorak)/mL	–	–	2,0
V(otop. pikrinske kiseline)/mL	0,5	0,5	0,5
V(otop. NaOH)/mL	0,5	0,5	0,5

Sadržaj epruveta promiješajte, ostavite 25 minuta na sobnoj temperaturi, te izmjerite apsorbanciju probe i standarda prema slijepoj probi na spektrofotometru pri valnoj duljini od 490 nm.

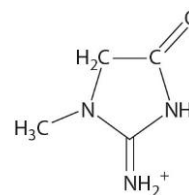
$A_{Pr}$	
$A_{St}$	
$c_{St}$	

#### Račun

$c$  (kreatinina u mokraći) = \_\_\_\_\_ mmol/L

## 1.1. Određivanje klirensa kreatinina

Kreatinin je produkt metabolizma skeletnog mišićja i njegova je koncentracija u serumu razmjerno konstantna vrijednost. Budući da se kreatinin filtrira i ne reapsorbira se, njegova koncentracija u mokraći odraz je funkcije glomerularne filtracije. Glomerularna se filtracija može procijeniti određivanjem klirensa kreatinina, primjenom jednostavne formule:



$$\text{klirens kreatinina} = \frac{c_u}{c_s} \frac{V}{t}$$

$c_u$  – koncentracija kreatinina u mokraći (mmol/L)

$c_s$  – koncentracija kreatinina u serumu ( $\mu\text{mol/L}$ )

$V$  – volumen mokraće (mL)

$t$  – vrijeme skupljanja mokraće (min)

### Račun

a) Izračunajte klirens kreatinina koristeći se gornjim izrazom i sljedećim podacima:

koncentracija kreatinina u mokraći (rezultat iz zadatka 1.) = mmol/L

zadana koncentracija kreatinina u serumu =  $\mu\text{mol/L}$

zadani volumen dnevne mokraće = mL

Klirens kreatinina = mL/min

b) Usporedite dobivene vrijednosti s referentnim vrijednostima u tablici. Pri usporedbi podataka o kreatininu u mokraći, uzmite u obzir zadanu vrijednost dnevnog volumena urina i dobivenu vrijednost koncentracije kreatinina u urinu te izračunajte ukupnu količinu kreatinina izlučenog u 24 sata.

### Komentar rezultata

### Napomena

Klirens kreatinina ovisi o veličini bubrega i površini tijela, stoga se u praksi referentne vrijednosti klirensa kreatina izražavaju u odnosu na standardnu površinu tijela koja iznosi  $1,73\text{m}^2$ . Konačni izračun klirensa kreatina uzima u obzir standardne i ispitanikove površine tijela (PT), odnosno dobivena vrijednost klirensa kreatina množi se sa  $1,73\text{m}^2/\text{PT}$ . Površina tijela ispitanika može se odrediti primjenom nomograma ili računski, na temelju podataka o visini, tjelesnoj masi, dobi i spolu ispitanika. Danas je u primjeni veliki broj različitih formula i automatskih medicinskih kalkulatora za izračunavanje površine tijela. Površina tijela važan je parametar kod brojnih kliničkih parametara (kemoterapija, toksikologija, procjena bubrežne funkcije, i dr.), pa je radi konačne interpretacije rezultata potrebno poznavati ograničenja i moguća odstupanja dostupnih formula.

## Zadatak 2. Određivanje patoloških sastojaka mokraće

### Reagensi i pribor

20%-tna otopina sulfosalicilne kiseline

Nylanderov reagens: Bizmutov(III) oksidnitrat ( $\text{BiONO}_3$ ),  $c = 95,6 \text{ mmol/L}$

K,Na-tartarat,  $c = 142 \text{ mmol/L}$

Otopina NaOH,  $w = 0,5$

Trommerov reagens (v.vj.5., zad. 1)

1%-tna otopina natrijevog nitroprusida,  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{NO})(\text{CN})_5]$

50%-tna otopina  $\text{CH}_3\text{COOH}$

10%-tna otopina NaOH

Koncentrirana otopina  $\text{NH}_3$

10%-tna etanolna otopina aminopirina

3%-tna otopina  $\text{H}_2\text{O}_2$

Testna traka - Multistix® 10 SG

Uzorak: mokraća razrijeđena destiliranom vodom u omjeru 1:1

Epruvete, kapalice, plamenik, drvena štipaljka, vodena kupelj

U dobivenom uzorku mokraće opisanim metodama ispitajte prisutnost **proteina**, **glukoze**, **ketonskih tijela** i **hemoglobina**.

### 2.1. Dokazivanje proteina

#### **Načelo**

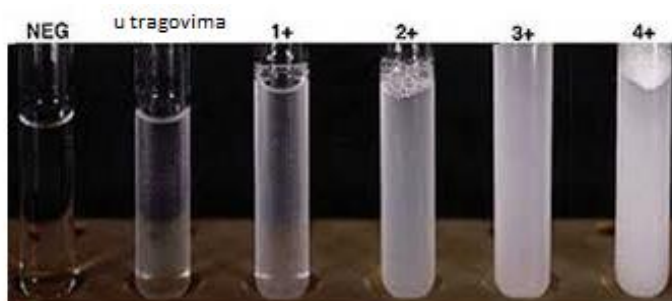
Proteini se u mokraći dokazuju taložnim reakcijama koje se temelje na koloidnim svojstvima proteina. Obojene reakcije nisu prikladne zbog boje same mokraće. Ako dodatak otopine sulfosalicilne kiseline uzrokuje zamućenje mokraće ili stvaranje bijelog taloga, promjena upućuje na prisutnost proteina.

#### **Postupak**

U epruvetu stavite oko 2 mL (2 kapalice) bistre mokraće i dodatite nekoliko kapi otopine sulfosalicilne kiseline, kap po kap.

#### **Napomena**

Test je vrlo osjetljiv, te već 0,01 g/L proteina daje slabu opalescenciju (proteina ima u tragovima); 0,1 g/L izaziva zamućenje; 0,5 g/L daje gusti mutež; više od 1 g/L proteina stvara koloidni talog nakon kratkoga stajanja (vidi sliku ispod).



Komentar testa na proteine u uzorku mokraće

## 2.2. Dokazivanje glukoze

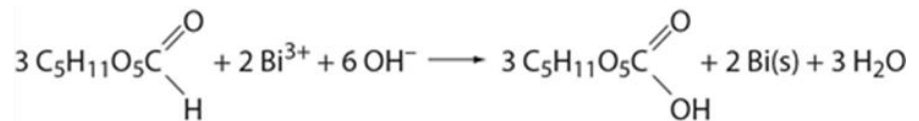
### Načelo

Reducirajući šećeri, uz grijanje, reduciraju u lužnatom mediju ione  $\text{Bi}^{3+}$  (Nylanderov reagens) do elementarnog bizmuta i ione  $\text{Cu}^{2+}$  (Trommerov reagens) do  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

### 2.2.1. Test po Nylanderu

#### Načelo

U lužnatom mediju, uz zagrijavanje, glukoza reducira ione  $\text{Bi}^{3+}$  pri čemu nastaje crni talog elementarnog bizmuta. Glukoza se pritom oksidira do glukonske kiseline prema slijedećoj jednažbi:



#### Postupak

U epruvetu s 2 mL mokraće dodajte 0,2 mL Nylanderova reagensa i zagrijte do vrenja.

#### Napomena

Proteini, kojih u nekim patološkim stanjima može biti u mokraći, daju s reagensom crni talog bizmutova(III) sulfida, jer su izgrađeni i od aminokiselina koje sadržavaju sumpor (cistein, metionin). Reagens mogu reducirati i kreatinin, homogentizinska kiselina, mokraćna kiselina i neki lijekovi (salicilati, tetraciklini), ali se njihova interferencija obično može zanemariti kad se test provede s uzorkom mokraće razrijeđenim destiliranom vodom u omjeru 1:1.

Komentar testa po Nylanderu u ispitivanom uzorku mokraće

### 2.2.2. Test po Trommeru

#### Postupak

U epruvetu s 2 mL mokraće dodajte 2 mL Fehlingovog reagensa (1 mL reagensa Fehling I + 1 mL reagensu Fehling II), promiješajte i zagrijte do vrenja.

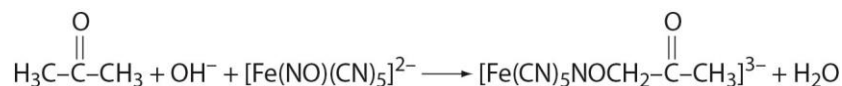
Komentar testa po Trommeru u ispitivanom uzorku mokraće

## 2.3. Dokazivanje ketonskih tijela

### Načelo

Pri dugotrajnom gladovanju i dijabetesu u krvi se nagomilavaju velike količine acetoacetata,  $\beta$ -hidroksibutirata i acetona, molekula koje se zajedničkim imenom nazivaju ketonskim tijelima. Većina testova za dokazivanje ketonskih tijela u mokraći temelji se na reakciji natrijeva nitrozilpentacijanoferata(II) (natrijev nitroprusid), koji u alkalnom mediju s acetonom i acetoacetatom stvara crveni kompleks:





Dodatkom koncentrirane octene kiseline, intenzivnija ljubičasto-crvena boja upućuje na prisutnost ketonskih tijela u mokraći. Ako se boja nakon zakiseljavanja izgubi, ketonska tijela nisu prisutna, nego se radilo o reakciji s kreatininom (normalni sastojak mokraće).

### 2.3.1. Test po Legalu

#### Postupak

U epruvetu s 2 mL uzorka mokraće (2 kapalice) dodajte nekoliko kapi svježe pripremljene otopine natrijevog nitroprusida,  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{NO})(\text{CN})_5]$ . Dobro promiješajte i dodajte nekoliko kapi otopine NaOH.

Što zapažate?

U smjesu dodati nekoliko kapi 50%-tne otopine  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ! Što zapažate?

Komentar testa po Legalu u ispitivanom uzorku mokraće

### 2.3.2. Test po Rotherau

Za dokazivanje malih količina acetona i acetoacetata primjenjuje se Rotheraova reakcija koja je specifična za dokazivanje metil-ketona,  $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3$ , u alkalnom mediju.

#### Postupak

Uzorku mokraće dodati nekoliko kapi octene kiseline i otopine natrijeva nitroprusida; zatim sadržaj epruvete oprezno podliti s nekoliko kapi koncentrirane otopine  $\text{NH}_3$ . U slučaju pozitivne reakcije na dodirnoj plohi dvaju slojeva stvara se ljubičasti prsten.

Komentar testa po Rotherau u ispitivanom uzorku mokraće

## 2.4. Dokazivanje hemoglobina

### Načelo

Hemoglobin ima djelovanje pseudoperoxidaze, te stoga u prisutnosti peroksida oksidira različite kromogene polifenole i aromatske amine. Na tom se načelu temelji niz testova za dokazivanje hemoglobina u mokraći. Tako se primjerice aminopirin oksidira u prisutnosti hemoglobina tvoreći ljubičasto obojeni spoj.

### Postupak

U epruvetu s 2 mL uzorka mokraće (2 kapalice) dodajte jednaki volumen etanolne otopine aminopirina, nekoliko kapi 50%-tne octene kiseline i vodikova peroksida, te dobro promiješajte. U slučaju pozitivne reakcije otopina se oboji ljubičasto.

Komentar testa u ispitivanom uzorku mokraće

Rezultate analize uzorka mokraće upišite u tablicu:

<b>proteini</b>		
<b>glukoza</b>	<b>Nylander</b>	
	<b>Trommer</b>	
<b>ketonska tijela</b>	<b>Legal</b>	
	<b>Rothera</b>	
<b>hemoglobin</b>		

Komentar (tumačenje rezultata)

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_

## Vježba 9.

### NUKLEINSKE KISELINE

*Svrha je vježbe upoznavanje osnovnih tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu DNA te razumijevanje principa utvrđivanja genskih različitosti (polimorfizama) i individualnih genotipova.*

Analizom DNA moguće je dobiti uvid u molekularnu strukturu gena ili dijela genoma. Jedna od primjena analiza DNA jest rano prenatalno ili postnatalno otkrivanje genskih poremećaja. Analiza molekularne osnove neke genske bolesti od posebnog je značaja kada je genski produkt nepoznat ili ga je teško analizirati na razini proteina.

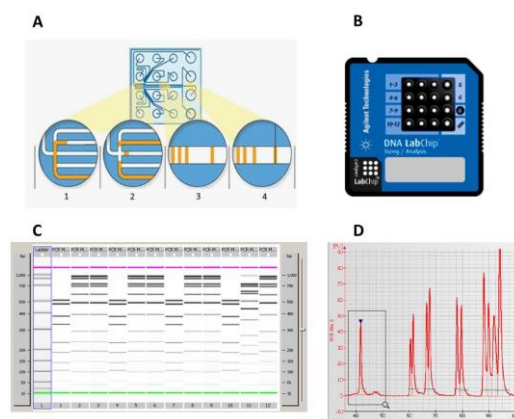
Prvi korak analize je izolacija DNA iz stanica. U kliničko-laboratorijskoj praksi se vrlo često koristi izolacija genomske DNA iz pune krvi. Izoliranu DNA možemo zatim analizirati različitim tehnikama. Premda tehnologija danas brzo napreduje sve se metode zasnivaju na nekoliko osnovnih načela:

- cijepanje DNA restrikcijskim enzimima
- hibridizacija
- lančana reakcija polimerazom (PCR)
- analiza promjene konformacije jednolančanih ulomaka DNA
- određivanje slijeda nukleotida.

Većina DNA-tehnika uključuje primjenu neke od **elektroforetskih metoda** koje omogućuju:

- ispitivanje kvalitete izolirane molekule nukleinske kiseline
- ispitivanje kvalitete umnoženih ulomaka nukleinskih kiselina
- ispitivanje različitosti (polimorfizama) određenog ulomka nukleinskih kiselina kod različitih uzoraka
- detekciju rezultata.

**Analiza DNA korištenjem modernih tehnologija: bioanalizator („laboratorij na čipu“).** U današnje doba moguće je ubrzati, pojednostavniti i optimizirati analizu DNA (kao i analizu RNA i proteina) korištenjem instrumenta pod komercijalnim imenom bioanalizator (npr. Bioanalyzer, „lab on a chip“, Agilent Technologies). Prvi korak u bilo kojoj analizi DNA je provjeriti kvalitetu, čistoću i koncentraciju DNA koju smo dobili izolacijom iz uzorka (npr. uzorci pune krvi ili tkiva). Klasičan pristup provjere navedenih parametara uključuje spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA, mjerenje apsorbancije uzorka pri različitim valnim duljinama (230 nm, 260 nm i 280 nm) kako bi se utvrdila koncentracija prisutne DNA kao i prisutnost nečistoća u uzorku i ostalih makromolekula ukoliko pročišćavanje nije bilo optimalno, te elektroforezu u svrhu određivanja kvalitete i stupnja degradacije izolirane DNA. Bioanalizator je sustav koji objedinjuje sve ove analize koje je moguće provesti istovremeno i brzo. Dodatna prednost ovog sustava leži i u tome što je potrebno utrošiti vrlo malu količinu uzorka (svega nekoliko mikrolitara). Na jednom čipu se može istovremeno analizirati do 12 uzoraka. Princip rada ovih čipova je kapilarna elektroforeza (sl. 9.1.A) - tehnika pri kojoj se elektroforeza provodi u vrlo tankim kapilarnim cjevčicama (unutarnjeg promjera svega 1 – 10  $\mu\text{m}$ ). Ovakve cjevčice omogućavaju primjenu jakih električnih polja, višestruko jačih od ostalih elektroforetskih tehnika, što skraćuje vrijeme odjeljivanja i istodobno rezultira vrlo oštrim odjeljivanjem. Kapilarna elektroforeza kombinirana je sa mjerenjem apsorbancije uzorka pri nekoliko valnih duljina. Uzorak se priprema miješanjem sa specijalnim gelom i nanosi se na čip (sl. 9.1.B). Nakon same analize, podaci se mogu prikazati na različite načine (sl. 9.1.C,D) koji najbolje odgovaraju istraživaču. Nedostatak ove metode leži u još uvijek velikim troškovima kako samog instrumenta, tako i jednokratnih čipova te je ova vrsta analize još uvijek jako skupa.



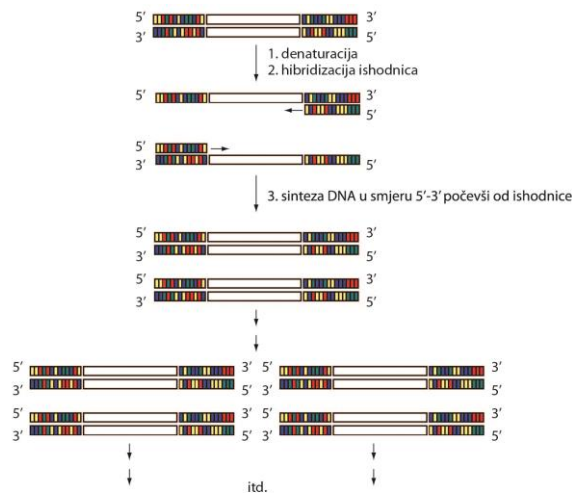
**Slika 9-1.** A) Shematski prikaz rada bioanalizatora (kapilarna elektroforeza). B) Prikaz čipa za analizu DNA u čije se jažice nanosi uzorak pomiješan sa specijalnim gelom. C) i D) prikazuju primjere različitih mogućnosti prikaza rezultata nakon analize – u obliku klasičnog elektroforetskog gela (C) ili kao elferogram (D).

**Restriksijski ulomci** (engl. *restriction fragments*) ulomci su DNA dobiveni cijepanjem cjelokupne genomske DNA djelovanjem restriksijskih endonukleaza.

**Restriksijske endonukleaze** su enzimi koji prepoznaju specifični slijed baza (palindrom) na dvostrukoj uzvojnici DNA i cijepaju oba lanca na tim mjestima. Takvo cijepanje olakšava analizu nastalih ulomaka DNA. Restriksijske su endonukleaze pronađene kod različitih prokariota. Biološka im je uloga razgradnja strane molekule DNA (npr. bakterijski restriksijski enzimi cijepaju virusnu DNA). Vlastitu staničnu DNA enzimi ne cijepaju jer su specifični palindromski sljedovi nukleotida zaštićeni metilacijom. Dijelovi DNA nastali cijepanjem jednim restriksijskim enzimom mogu se dalje cijepati drugim enzimima u još kraće ulomke DNA, koji se mogu razdvojiti tehnikom elektroforeze i upotrijebiti za određivanje redoslijeda baza.

**Lančana reakcija polimerazom** (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) postupak je kojim se ciljani ulomci DNA umnažaju (npr. restriksijski ulomci ili odgovarajući eksoni ili introni). Metoda umnažanja specifičnih ulomaka DNA temelji se na kopiranju DNA ulomka u velik broj istih ulomaka Taq polimerazom (sl. 9.2.). Umnažanje ciljnoga specifičnog nukleotidnog slijeda temelji se na upotrebi dvaju oligonukleotida (ishodnica; početnica – engl. *primer*) koji se hibridiziraju s komplementarnim slijedom nukleotida na suprotnim lancima DNA, a od njih se dalje nastavlja sinteza ciljnoga slijeda. Osim ishodnice i DNA, potrebna su i četiri različita deoksinukleotid-fosfata (dNTP), enzim DNA-polimeraza koja podnosi visoke temperature (Taq-polimeraza) i  $Mg^{2+}$ -ioni nužni za aktivnost polimeraze. Uzorak DNA najprije se zagrijava na  $94^{\circ}C$  kako bi se razdvojili lanci (1). Potom se temperatura snizi na  $50-65^{\circ}C$  kako bi se vezali oligonukleotidi (2). Na  $72^{\circ}C$  sintetiziraju se novi lanci počevši od početnica (3), svaki u suprotnome smjeru, djelovanjem DNA-polimeraze. Cikličkim ponavljanjem izmjena ovih navedenih reakcija dobije se eksponencijalno umnoženi specifični slijed DNA, točno definiranoga broja parova baza.

**Analiza umnoženog ulomka DNA.** Elektroforezom na agaroznom gelu uz upotrebu odgovarajućeg biljega (DNA standarda) provjeravamo kvalitetu odnosno veličinu i čistoću umnoženog ulomka. Umnoženi ulomak DNA možemo također analizirati hibridizacijom s oligonukleotidnim probama poznatoga slijeda nukleotida i određivanjem slijeda nukleotida, odnosno sekvenciranjem.

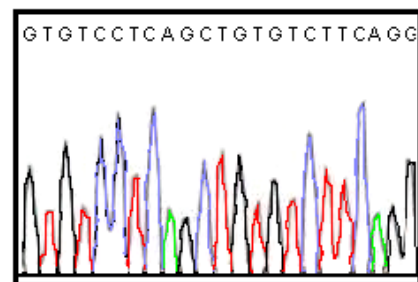


**Slika 9-2.** Shematski prikaz lančane reakcije polimerazom; od jedne dvostruke uzvojnica DNA nastaje  $2^n$  kopija ( $n$  = broj ciklusa lančane reakcije)

**Sekvenciranje (određivanje redoslijeda nukleotida): Sangerova dideoksi-metoda.** Primjenom DNA-polimeraze I repliciraju se razdvojeni lanci DNA nakon denaturacije. U četiri reakcijske smjese, osim polimeraze, dodaju se odgovarajuće oligonukleotidne ishodnice i četiri različita dNTP, a pojedinačno se još u svaku smjesu dodaje po jedan ddNTP (dideoksi-ribonukleotid) koji je fluorescentno obilježen (svaki od četiri ddNTP obilježen je drugim fluorescentnim obilježivačem koji emitira svjetlost određene valne duljine). Kako ugradnja obilježenog ddNTP prekida na tom mjestu daljnju sintezu, dobit će se ulomci različitih duljina koji završavaju u jednoj smjesi s ddATP, u drugoj sa ddGTP, trećoj s ddCTP i četvrtoj s ddTTP. Zatim se fluorescentno obilježeni umnoženi ulomci podvrgavaju elektroforezi. Odvojeni fluorescentno obilježeni ulomci DNA detektiraju se onim redom kako se pojavljuju u elektroforezi. Slijed pojavljivanja četiriju boja izravno daje sekvencu baza (sl. 9.3.).

- Pojedina smjesa sadrži: a) DNA koja će se sekvencirati: 3'-GTGCCTCAGCTGTGTCTTCAGG-5'  
 b) 5'-CACAG početnicu  
 c) DNA-polimerazu I  
 d) smjesu nukleotida – dATP, dCTP, dGTP, dTTP  
 e) radiokativno obilježeni dideoksi – analog (npr. ddATP)

Nastaju produkti: 3'-GTGCCTCAGCTGTGTCTTCAGG-5'  
 5'-CACAGGAGTCGACACAA-3'  
 +  
 3'-GTGCCTCAGCTGTGTCTTCAGG-5'  
 5'-CACAGGAGTCGA-3'  
 +  
 3'-GTGCCTCAGCTGTGTCTTCAGG-5'  
 5'-CACAGGA-3'  
 + itd.



A

B

**Slika 9.3.** A) Ulomci nastali terminacijom replikacije dodavanjem 2',3'-dideoksi analoga (ddNTP), npr. dodavanjem ddATP reakcija završava na A. B) Detekcija ulomaka DNA nakon sekvenciranja

## Rječnik pojmova i kratica

**dNTP** – deoksiribonukleozid-trifosfat (N označuje jednu od dušičnih baza: A, G, C, T)

**ddNTP** – dideoksiribonukleozid trifosfat

**DNA fingerprint** (otisak prsta) – Metoda koja se upotrebljava za razlikovanje između pojedinaca, temeljena na detekciji specifičnih promjenjivih sekvenci u DNA

**Palindrom** – Riječ ili rečenica koja se čita jednako zdesna nalijevo i slijeva nadesno (npr. „idu ljudi“, „kisik“), odnosno sekvenca koja se čita isto u smjeru 5' → 3' ili 3' → 5'. Sekvenca koju prepoznaje i cijepa restriksijski enzim *HhaI* primjer je palindroma:



**PCR** – Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

**Restriksijska endonukleaza** – Enzim koji cijepa palindromske sekvence

**PCR-RFLP** – (engl. *polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism*) – metoda genotipizacije u kojoj se nakon umnažanja dijela gena na umnožene produkte djeluje restriksijskim endonukleazama koje će ovisno o prisutnosti specifičnih polimorfizama cijepati DNA

**PCR-CTPP** – (engl. *polymerase chain reaction with confronting two-pair primers*) – metoda genotipizacije koja koristi dva para početnica (četiri početnice) istovremeno čime je omogućeno istodobno umnažanje različitih alela jednog gena

## Zadatak 1. Određivanje koncentracije DNA

### Načelo

Koncentracija otopine DNA može se odrediti UV-spektrofotometrijskom metodom, pri čemu se apsorbancije uzorka očitaju na dvije valne duljine: 260 nm i 280 nm. Otopina koja sadržava 50 µg DNA/mL pokazuje apsorbanciju 1,000 na 260 nm. Stupanj čistoće izolirane DNA određuje se omjerom apsorbancija na 260 i 280 nm. Čistoća je zadovoljavajuća ako je  $A_{260}/A_{280}$  u rasponu od 1,6 do 2,0. Manje vrijednosti omjera upućuju na kontaminaciju uzorka proteinima jer proteini zaostali u otopini pokazuju maksimum apsorpcije na 280 nm.

### Reagensi i pribor

Tris-EDTA pufer (TE-pufer)

Tris (10mM) 1,21 g

Na<sub>2</sub>EDTA (1mM) 0,37 g

Dest. voda, sterilna do 1 L (nadopuniti)

Prilagoditi pH na 7,5 s pomoću HCl.

Sterilizirati i čuvati na sobnoj temperaturi

Uzorak: izolirana DNA

Epruvete, automatska pipeta, UV spektrofotometar i kivete

### Postupak

Otopinu DNA razrijediti TE-puferom u omjeru 1:10 (100 µL otopine DNA + 900 µL TE pufera). Izmjeriti apsorbanciju na spektrofotometru pri valnoj duljini od 260 nm i izračunati masenu koncentraciju DNA u otopini.

### Račun

$\gamma$  (DNA) = \_\_\_\_\_ µg/mL

## Zadatak 2. Određivanje temperature mekšanja ( $T_m$ ) DNA

### Načelo

Denaturacija (kao i renaturacija) DNA ključne su za biološku ulogu DNA (proces replikacije i transkripcije), a upravo se na tome temelje i moderne metode poput lančane reakcije polimerazom (PCR). Temperaturom mekšanja DNA,  $T_m$ , nazivamo onu temperaturu kada je kada je 50 % strukture DNA denaturirano. Na vrijednost  $T_m$  utječu čimbenici poput sastava baza, ionske jakosti i pH. Proces termičke denaturacije DNA može se pratiti preko promjene apsorbancije DNA izmjerene na 260 nm ( $A_{260}$ ). Postupnim zagrijavanjem DNA na različite temperature, brzim hlađenjem na 0°C (pri čemu će doći samo do djelomične renaturacije razdvojenih lanaca DNA) i mjerenjem  $A_{260}$ , iz dobivenih podataka može se konstruirati grafički prikaz ovisnosti  $A_{260}$  o promjeni temperature te se iz grafa može odrediti vrijednost  $T_m$ .

### Reagensi i pribor

Tris-EDTA pufer (TE-pufer)

Tris (10mM) 1,21 g

Na<sub>2</sub>EDTA (1mM) 0,37 g

Dest. voda, sterilna do 1 L (nadopuniti)

Prilagoditi pH na 7,5 s pomoću HCl.

Sterilizirati i čuvati na sobnoj temperaturi

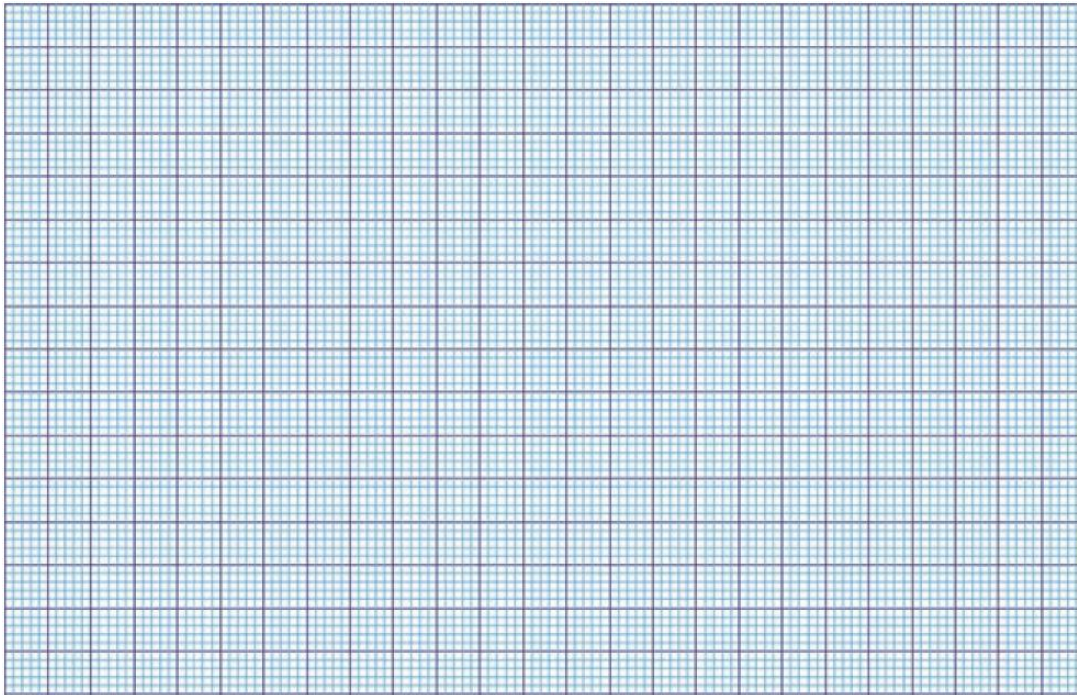
Uzorak: izolirana DNA

Epruvete, automatske pipete, UV spektrofotometar, kivete, posuda s ledom, vodene kupelji namještene na 37°C, 50°C, 65°C, 75°C i 95°C.

### Postupak

1. Dobit ćete otopine DNA iste koncentracije razrjeđene u TE-puferu.
2. Svaku od epruveta staviti u vodenu kupelj namještenu na odgovarajuću temperaturu prema tablici i inkubirati 10 minuta.
3. Izvaditi epruvete i odmah ih ohladiti u posudi s ledom.
4. Izmjeriti apsorbanciju na spektrofotometru pri valnoj duljini od 260 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancije upišite u tablicu, te konstruirajte graf ovisnosti apsorbancije izmjerene na 260 nm o temperaturi i odredite  $T_m$ .

Broj epruvete	1	2	3	4	5
t/°C	37	50	65	75	95
$A_{260}$					



$T_m =$       °C

Komentirajte kako sastav baza DNA može utjecati na temperaturu mekšanja.

**Zadatak 3. Sekvencijska analiza ulomka DNA**

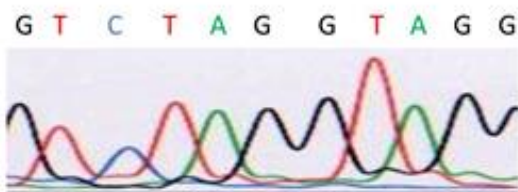
**Načelo**

Načelo sekvenciranja Sangerovom dideoksi metodom objašnjeno je u uvodnom dijelu vježbe.

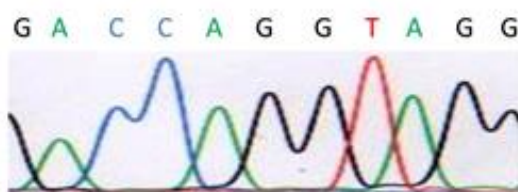
**Postupak**

Sangerovom dideoksi metodom sekvencirali ste uzorak DNA izolirane iz pune krvi dviju različitih osoba. Dijelovi sekvence (5'→3') odnosno ispis nakon fluorescentne detekcije je sljedeći:

1)



2)



a) Pretpostavite da je prikazana sekvencija kodirajućeg lanca. Napišite odgovarajuću sekvencu mRNA za oba uzorka.

1) \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_

b) Pretpostavite da je prva baza početak okvira čitanja. Napišite odgovarajući slijed amino-kiselina koristeći tablicu genetičkog koda.

1) \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_



Druga baza kodona

	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Prva baza kodona

Treća baza kodona

c) Prikažite sve aminokiseline koje su različite između ova dva uzorka. Objasnite moguće posljedice ove zamjene aminokiselina na funkciju proteina, odnosno enzimsku aktivnost, uz pretpostvaku da sekvencirani gen kodira određeni enzim.

#### **Zadatak 4.** Određivanje mokraćne kiseline u serumu kolorimetrijskom (PAP) metodom

Mokraćna kiselina (*acidum uricum*, urat) konačni je proizvod egzogenih, hranom unesenih, i endogenih, u ljudskom organizmu sintetiziranih purina. Purini se najviše unose mesom. Mokraćna se kiselina izlučuje najvećim dijelom mokraćom, a samo četvrtina stolicom.

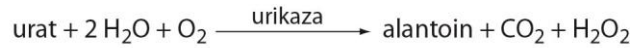
Na koncentraciju mokraćne kiseline u serumu i mokraći utječu genetski čimbenici, kao i životni uvjeti. Uzrok povećane koncentracije mokraćne kiseline u serumu može biti pojačana sinteza purina, povećan unos purina hranom, pojačani metabolizam purina ili smanjeno izlučivanje bubrezima. Primarna hiperuricemija pojavljuje se vjerojatno zbog defekta kontrolnog mehanizma povratne sprege za stvaranje ključnog međuprodukta u biosintezi purina, fosforibozilamina. Sekundarna hiperuricemija posljedica je ubranog metabolizma purina, a nalazi se u zloćudnim bolestima, osobito u leukemiji, kod infekcija, psorijaze i pri liječenju citostaticima – derivatima purina.

Izlučivanje mokraćne kiseline smanjuje se u akutnim i kroničnim bubrežnim bolestima. Giht (uloži) bolest je kod koje se soli mokraćne kiseline u obliku kristalića odlažu u zglobovima.

Povećana koncentracija mokraćne kiseline u serumu pojavljuje se i kod nekih prirođenih grešaka metabolizma, npr. Lesch-Nyhanova sindroma.

Snižena koncentracija mokraćne kiseline u serumu pojavljuje se rjeđe. Može biti posljedica liječenja gihta alopurinolom, koji inhibira aktivnost ksantin-oksidadaze. Katkad se pojavljuje u raznim neoplazmama i defektima bubrežnih tubula zbog slabe reapsorpcije urata u tubulima.

## Načelo



(DHBS = 3,5-diklor-2-hidroksi-benzensulfonska kiselina)

## Reagensi i pribor

R1 Radni reagens:

fosfatni pufer pH	50 mmol/L
4-aminofenazon	0,3 mmol/L
DCHBS	4 mmol/L
urikaza	> 200 U/L
peroksidaza	> 1000 U/L

R2 Standard: urat  $c = 476 \mu\text{mol/L}$

Uzorak: serum, plastične epruvete 1,5 mL, automatske pipete 1 mL, spektrofotometar

## Postupak

	standard	proba	slijepa proba
V(uzorka)/ $\mu\text{L}$	-	20	-
V(standarda)/ $\mu\text{L}$	20	-	-
V (destilirane vode)/ $\mu\text{L}$	-	-	20
V(radnog reagensa)/mL	1,0	1,0	1,0

Sadržaj epruveta dobro promiješati i inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Očitati apsorbanciju probe ( $A_{Pr}$ ) i standarda ( $A_{St}$ ) prema slijepoj probi pri 520 nm. Stabilnost boje je 30 minuta (plazma, serum).

$A_{Pr}$	
$A_{St}$	
$C_{St}$	

$c(\text{mokraćne kiseline}) =$   $\mu\text{mol/L}$

	referentne vrijednosti mokraćne kiseline	
serum	žene	90 - 350 $\mu\text{mol/L}$
	muškarci	150 - 420 $\mu\text{mol/L}$
mokraća	do 4,43 mmol/24 sata	

Što možete zaključiti na temelju dobivenog rezultata?

Datum: \_\_\_\_\_

Vježbu pregledala: \_\_\_\_\_

## Literatura

1. Božina T, Cvijanović D, Damjanović V, Delaš I, Fabris D, Foretić B, Kalanj Bognar S, Karmelić I, Lovrić J, Mlinac Jerković K, Pašalić D, Picek I, Potočki S, Sertić J, Vukelić Ž; Priručnik za vježbe iz medicinske kemije i biokemije za studente medicine. 4. izmjenjeno treće, obnovljeno i preuređeno izdanje iz 2017. godine, Medicinska naklada, Zagreb, 2020.
2. Sertić J i sur.; Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Medicinska naklada, Zagreb, 2015.
3. Biokemijske metode u biomedicinskim istraživanjima. Lovrić J, Rogić D (ur.), Medicinska naklada, Zagreb, 2015.
4. Crocker J, Burnett D; The Science of Laboratory Diagnostics, Wiley, 2<sup>nd</sup> edition, 2005.
5. Levine M; Topics in Dental Biochemistry, Springer, 2011.
6. Vasudevan DM, Sreekumari S, Kannan V; Textbook of Biochemistry for Dental Students, 2<sup>nd</sup> edition, Jaypee, New Delhi, 2011.
7. Külpmann WR; Determination of electrolytes in serum and plasma. *Wien Klin Wochenschr.* 1992; 192, 37-41.
8. Kopic S, Geibel JP; Gastric Acid, Calcium Absorption, and Their Impact on Bone Health. *Physiol Rev.* 2013; 93, 189-268.
9. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH; Saliva as research material: Biochemical, Physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology.* 2007; 52, 1114-1135.
10. Par M, Vučević-Boras V; Slina kao ogledalo sistemskog zdravlja. *Sonda.* 2009; 10, 42-46.
11. Bašić K, Peroš K, Šutej I, Rošin-Grget, K; The Effect of Salivary Calcium and Fluoride Toothpaste on the Formation of KOH-Soluble Fluoride: In Vitro Study. *Acta Stomatol Croat.* 2015; 49, 221-227.
12. Todorović T, Dožić I, Mandić B, Marjanović M; Antioksidativna uloga pljuvačke u očuvanju zdravlja usta. *Vojnosanit Pregl.* 2005; 62, 575-579.
13. Vučević-Boras V, Topić B; Stimulacija sline u fiziološkim uvjetima C-vitaminom i žvakaćom gumom. *Acta Stom Croat.* 1997; 31, 367-372.
14. Rumenjak V, Milardović S, Vranić Lj, Kruhac I, Rajić Z; Determination of Electrolyte Concentration in Saliva by Potentiometric Method. *Acta Stomatol Croat.* 1996; 30, 189-195.
15. Miletić I, Baraba A, Anić I; Minimalna intervencija. *Sonda.* 2009; 10, 38-41.
16. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(12), 874-885.
17. Vuletić L, Alajbeg I; Salivarna amilaza: više od probavnog enzima? *Sonda.* 2013; 34-38.
18. Lee YH, Wong DT; Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent.* 2009; 22, 241-8.
19. Esser D, Alvarez-Llamas G, de Vries MP, Weening D, Vonk RJ, Roelofsen H; Sample Stability and Protein Composition of Saliva: Implications for Its Use as a Diagnostic Fluid. *Biomark Insights.* 2008; 3, 25-7.
20. Gyémánt G, Kandra L, Nagy V, Somsák L; Inhibition of human salivary alpha-amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 12 (2) 334-339.
21. Wohlgemuth P; *Biochem. Z.* 1908, 9
22. Sandstedt RM, Kneen E, Blish MJ; Standardized Wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity. *Cereal Foods World.* 1939, 35, 712-723.
23. Soinenen K, Härkönen M, Ceska M, Adlercreutz H; Comparison between a new chromogenic - amylase test (Phadebas) and the Wohlgemuth amyloclastic method in urine. *Scand J Clin Lab Invest.* 1972, 30(3), 291-297.
24. World Health Organization Environmental Health Criteria 227: Fluorides, Geneva, 2002.

25. Karas-Gašparec V, Pinter T, Hankonyi V; Praktikum Kemije za studente medicine, Školska knjiga, Zagreb, 1991.
26. Nunes LAS, Mussavira S, Bindhu OS; Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review, *Biochem Med* 2015; 25(2), 177-92.
27. Čvorišćec D i Čepelak I; Štrausova medicinska biokemija; Medicinska naklada, Zagreb, 2009.
28. Graamans K, van den Akker HP. Diagnosis of Salivary Gland Disorders; Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1991.
29. Saliva as a Diagnostic Fluid; Malamud D, Tabak L (editors). Annals of the New York Academy of Science, vol. 694, New York, 1993.