

Návody pro praktika z Fyziologie živočichů a člověka – verze 2019

Z každé úlohy každá skupina vypracuje stručný protokol – naměřená data – výpočet – výsledky, pokud možno ve formě tabulky, s krátkým komentářem – do 3 – 4 řádek. Hotové protokoly odevzdejte do týdne, nejlépe na papíře, nebo elektronicky.

Jan Rozsypal, rozsypal@entu.cas.cz
Jan Okrouhlík, okrouhl@prf.jcu.cz

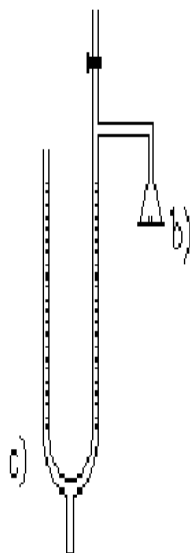
1. Manometrické stanovení spotřeby kyslíku a produkce CO₂

Princip: Spotřebu kyslíku v plynné fázi můžeme měřit v otevřeném (průtokovém) nebo uzavřeném systému. Pro měření v uzavřených systémech jsou výhodné manometrické metody. Respirující organismus (v našem případě ploštice ruměnice pospolná) spotřebovává kyslík a vydechuje oxid uhličitý.

Manometrické metody se dělí podle dvou základních principů měření na měření za konstantního tlaku a za konstantního objemu. Změny druhého z uvedených faktorů pak slouží k výpočtu změny množství plynu v soustavě. My použijeme Warburgova přístroje, který je založen na druhém principu - změny tlaku za konstantního objemu nám budou sloužit k výpočtu spotřeby kyslíku.

Při výpočtech musíme brát v úvahu případné změny atmosférického tlaku (protože odečítáme změny tlaku proti ovzduší) a výkyvy teploty vodní lázně, které mohly nastat během měření. Pro tuto korekci slouží měření na termobarometru, tj. kontrolní manometr s prázdnou baničkou, které provádíme současně s vlastním měřením.

Při oxidaci sacharidů (RQ = 1) žádnou změnu tlaku nezaznamenejeme, protože úbytek kyslíku je právě kompenzován příbytkem CO₂. Při měření spotřeby O₂ je proto v respirometrické baničce umístěn složený filtrační papírek (30 x 20 mm) s louhem, který pohlcuje vydýchaný oxid uhličitý. Vztah mezi objemem měřicího systému (baňka + kapilára manometru až po hladinu manometrické kapaliny), teplotou a změnami tlaku je odvozen ze stavové rovnice plynů.



Respirometr se skládá ze tří částí: a) termostatické lázně (naše lázeň nemá termoregulaci ani míchání, proto její teplota je blízká teplotě okolního vzduchu a tak nedojde ke změnám, které by termobarometr nezkompenzoval), b) baňky, která obsahuje pokusné objekty (ploštice) a při měření spotřeby O₂ papírek nasáklý hydroxidem, c) manometru. Manometry jsou U-trubice do poloviny naplněné kapalinou. Její hladinu lze upravovat tlačkou, která je na rezervoárku napojeném T-kusem v ohbí trubice. Ramena U-trubice mají milimetrovou stupnici. Jedno z nich je nahoře otevřené do atmosféry, na druhém je ventil (kohout), kterým může být uzavřeno; na toto rameno manometru je postranní kapilární trubicí napojena banička, která se připojuje k manometru zábrusem.

Pozor tmavý puntík na ventilu (kohoutu) musí být při jeho uzavření obrácen vzhůru!

Cíl: Při této úloze provedeme dvě měření - nejprve budeme měřit **změnu tlaku vzniklou rozdílem mezi spotřebovaným kyslíkem a vydýchaným CO₂**. Pak pokus přerušíme, do středního komínku baňky vložíme filtrační

papír ovlhčený louhem a stanovíme **spotřebu kyslíku**. Z rozdílu obou hodnot (pozor na znaménka!) vypočteme **produkci CO₂** a **respirační kvocient (RQ = CO₂ / O₂)**.

Pomůcky: ploštice, entomologická pinzeta, respirometr, tuk na zábrusy, váhy, filtrační papír, pipeta, 1M NaOH

Postup: 1) Zvážíme 4 - 5 ploštic v malé Petriho misce.

2) Do baňky (b) manometru je vložíme pinzetou. Otevřeme kohout na manometru. Na zábrus na manometru nanese tři tenké proužky tuku; jednou rukou přidržíme ohbí postranní trubky nad zábrusem a druhou rukou krouživým pohybem nasadíme baničku a ještě za stálého tlaku pootočíme. Zajistíme baničku perky nebo gumovými kroužky. Obdobně promažeme i ostatní zábrusy (zátku na postranním raménku baňky, kohout na manometru).

3) Manometr s nasazenou baňkou zasuneme do držáku pod vlastní lázni tak, aby baňky byly zcela potopené. Tlačkou upravíme výšku manometrické tekutiny v uzavřeném ramenu na vhodnou značku, zpravidla uprostřed stupnice (150 mm) a necháme nejméně 10 min. vytemperovat.

4) Po vytemperování uzavřeme kohout, a ve vhodných časových intervalech - cca 10-ti minutových - **nastavíme tlačkou hladinu manometrické kapaliny na původní značku a odečteme výšku v otevřeném ramenu manometru.** Paralelně s pokusným manometrem odečítáme stejným způsobem také změny na **termobarometru.** Pozor na znaménko této korekce!

5) Změny hladiny odečteme 3x a údaje zaznamenáme do tabulky. Pak otevřeme ventil a vyjmeme manometr z lázně. Sejmeme baničku z manometru. Do prostředního komínku napipetujeme 0,2 ml 1 M NaOH (nepotřísnit ploštic!) a vložíme složený kousek filtračního papíru cca 30x20 mm. Baničku opět nasadíme na manometr, zajistíme perky a vložíme na 10 minut teplotně vyrovnat do lázně. Kohout opět uzavřeme a znovu 3x v 10 minutových intervalech odečteme změny tlaku jako v první části pokusu.

6) Ukončíme pokus:

- a) Otevřeme ventil
- b) Vyjmeme manometr z lázně a vrátíme zpět do stojanu.
- c) Povolíme zajišťovací perka nebo gumičky, jednou rukou zajistíme postranní raménko manometru a krouživým pohybem stáhneme baničku ze zábrusu.
- d) Vatou nebo buničinou očistíme zhruba zábrus, pinzetou vyjmeme ploštic a papírek z louhu, baničku důkladně vypláchneme.

Výpočet: vychází ze stavové rovnice $p \cdot V = R \cdot T$. Z ní odvodíme pro každou baničku konstantu (K), kterou násobíme změny tlaku vyjádřené v mm manometrické tekutiny. Manometrická tekutina má hustotu, při níž standardní atmosférický tlak odpovídá 10 000 mm manometrické (Brodieho) tekutiny. Aby výsledky byly srovnatelné, přepočítáváme všechny objemové údaje o plynech na normální tlak a teplotu. Pro náš jednoduchý případ (můžeme zanedbat množství vodní fáze v soustavě) vypočteme konstantu baničky **K** takto:

$$K = \frac{V_p \cdot \frac{273}{T}}{P_o} \qquad V_p = V_t - V_a (- V_{OH})$$

kde V_p je objem plynu v baničce v mm^3 , V_t je celkový objem baničky (vyžádejte si), V_a je objem zvířete, jehož hustota je $\rho = 1$, V_{OH} je objem pipetovaného roztoku louhu, T je teplota lázně v K, P_o je standardní barometrický tlak (101,325 kPa) vyjádřený v mm manometrické (Brodieho) tekutiny $P_o = 10000$ mm.

Spotřebu O_2 + produkci CO_2 / spotřebu O_2 v μl (**X**) pak vypočteme takto:

$$X = K \cdot h$$

kde **h** je změna tlaku v systému korigovaná na změny termobarometru a standardní tlak. Odečtenou změnu tlaku (h_e) je proto třeba ještě korigovat na standardní barometrický tlak:

$$h = h_e \cdot p_e / 101,325$$

kde p_e je atmosférický tlak v kPa v době pokusu.

Spotřebu kyslíku a produkci CO_2 přepočtete na g hmotnosti ploštic a jednotku času a vyneste do grafu v závislosti na době pokusu. RQ vypočtete jako jednu hodnotu pro průměrnou spotřebu O_2 a průměrnou produkci CO_2 .

2. Měření spotřeby kyslíku rybou

Cíl: Změřit spotřebu kyslíku vodního živočicha v uzavřeném systému, kyslík stanovit paralelně chemickou Winklerovou metodou a polarograficky.

Winkler - princip stanovení: Rybu uzavřeme do nádoby, která je beze zbytku naplněna dobře provzdušněnou vodou. Stanovíme obsah kyslíku ve vodě oběma metodami na počátku a na konci měření. Z nalezeného rozdílu koncentrací, z objemu nádoby, z doby pokusu a z hmotnosti ryby vypočteme její spotřebu O_2 na hodinu pokusu a gram hmotnosti živočicha.

Pomůcky a chemikálie: ryba, prachovnice, erlenka, hadička, 6 očíslovaných reagenčních lahvíček (50 ml), kyselinovzdorná podložka, 3 pipety, byreta, titrační baňka, kapátko; reagensie W1 (koncentrovaný roztok $MnSO_4$), W2 (alkalický roztok jodidu: $KI + NaOH$), 0,01 M roztok $Na_2S_2O_3$, roztok škrobu.

Zkusmé stanovení kyslíku (3 paralelky): Očíslujeme reagenční lahvíčky. Hadičkou si naplníme z velké PE konve s dobře provzdušněnou vodou tři reagenční lahvíčky vodou (**vzít třetí objem** -postavíme reag. lahvíčku do kádinky, hadičku zavedeme ke dnu lahvíčky a necháme přetéct 2 objemy lahvíčky do podstavené kádinky), uzavřeme je a stanovíme koncentrace kyslíku dle následujícího návodu. Pokud je rozptýl titračních objemů přijatelný, ověřili jste si zvládnutí metody a můžete pokračovat vlastním pokusem podle návodu na další straně.

Postup:

a) stanovení koncentrace kyslíku (Winkler):

Princip metody: Rozpuštěný kyslík reaguje s čerstvě vysráženým hydroxidem manganatým (*bílá sraženina; vzniká po přidání reagensí W1 -roztok $MnSO_4$ a W2 -roztok $NaOH + KI$ ke vzorku*) a oxiduje jej na hnědě vyšší hydroxidy manganu. Po okyselení vícemocný mangan oxiduje jodid na jod, který se stanoví titrací thiosíranem. Množství jodu je stechiometricky úměrné množství kyslíku ve vzorku. *Poznámka: Během celého stanovení se snažte pracovat rychle, abyste co nejvíce omezili difuzi O_2 ze vzduchu do vzorku a tím nadhodnocení výsledné koncentrace kyslíku ve vzorku. Zároveň nesmí při uzavírání reag. lahvíček vzniknout bublina (vzniku bubliny můžeme zamezit navlhčením zátky lahvíčky před uzavíráním).*

Postup stanovení O_2 :

- 1) Odebereme vzorek vody k analýze: stanovovanou vodu přesifonujeme hadičkou do 50-ml reagenční lahvíčky, **k analýze vezmeme až třetí objem lahvíčky**). Stanovení děláme v triplikátech.
- 2) Do lahvíčky přidáme 0,5 ml reag. W1 a ihned 0,5 ml reag. W2. Lahvičku rychle zazátkujeme, několikrát rychle převrátíme a dobře promícháme obsah (vznikne hnědavá sraženina). *Poznámka: Reagensie přidáváme tak, aby špička pipety byla pod hladinou vody, těžké reagensie klesají ke dnu. Pipety nezaměňujeme, pokud se nám to „podaří“, odlijeme několik ml kys. sírové do malé kádinky a sraženinu z pipety opatrně vymyjeme zředěnou kys. sírovou!!*
- 3) Počkáme až se hnědavá sraženina usadí v dolní polovině výšky lahvíčky. Lahvičku opatrně otevřeme, stejným způsobem jako u prvních dvou reagensí přidáme 0,5 ml konc. kyseliny sírové (*v kyselém prostředí vyšší hydroxidy Mn oxidují jodid na jod; rozpuštění sraženiny*), lahvíčku rychle zazátkujeme, opakovaným převrácením její obsah promícháme a necháme stát asi 10 min ve tmě (ve stole) na kyselinovzdorné podložce. **Pozor na šaty**, kys. sírová je má ráda, **žere je --> díry !!!**
- 4) Po 10 minutách lahvíčku několikrát převrátíme, odpipetujeme 50 ml vzorku (je to roztok jodu!) do titrační baňky a titrujeme 0,01 M roztokem thiosíranu. *Žlutá barva jódu postupně mizí (jód se redukuje zpět na jodid)*. Před koncem titrace přidáme několik kapek roztoku škrobu a opatrně dotitrujeme do úplného odbarvení modrého zbarvení jód - škrob. Odečteme spotřebu thiosíranu. Rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou by neměl přesahovat 0,2 ml thiosíranu u začátečníka a 0,02 ml thiosíranu u zkušeného. Pokud naše hodnoty tento údaj přesahují, celé stanovení zopakujeme (všechny tři paralelky).

Výsledky přepočteme na koncentraci kyslíku:



a dále na spotřebu (ad c)).

b) polarografické stanovení koncentrace kyslíku (Clarkova elektroda)

Princip: Měřicím čidlem je článek z měřicí elektrody – Pt nebo Au a referenční elektrody, zpravidla AgCl, nebo kalomelové. Elektrolytem je ca 0,1 M KCl, mezi obě elektrody je vložen potenciál ca -600mV. Článek je od měřeného roztoku oddělen tenkou plastovou membránou (např PE, PP, teflon), přes kterou difundují rozpuštěné plyny, ale nikoli ionty (ani z elektrolytu, ani z měřeného roztoku). Na Ag- katodě dochází k redukci O₂ na vodu, proud mezi elektrodami je úměrný rychlosti difuze kyslíku přes membránu a (ostatní podmínky se nemění), rychlost difuze je úměrná koncentraci kyslíku v měřeném mediu. Pokud je plocha katody větší než ca 300μm² (to je náš případ), zasahuje difuzní gradient do měřeného roztoku a pro dosažení konstantních hodnot je třeba míchat měřeným roztokem.

Před vlastním měřením článek kalibrujeme:

- 1) Odpojte článek – čidlo od měřidla
- 2) Horní prepínač na měřidle přesuňte do polohy ON, zkontrolujte, zda údaj je blízko 0, vypněte..
- 3) Opatrně sundejte červený plastový kryt, článek zasuňte zátkou do dolního výtokového otvoru irigátoru.
- 4) Připravte si pokusnou nádobu (irigátor) k měření: zvažte (na vahách o váživosti 6 kg) prázdný irigátor včetně čidla, míchátko a krycího hodinářského skla, pak jej zcela naplňte vodou, rozdíl obou hmotností odpovídá objemu. Irigátor plníme z PE konve sifonováním hadicí.
- 5) Měřicí článek připojte opět k měřidlu.- šipka na konektoru směrem nápisu INPUT - a znovu zapojte (horní prepínač na ON).
- 6) Plný irigátor postavte na magnetickou míchačku a zapojte míchání. Až se údaj na ukazateli přestane měnit – ca 1min. – nastavte trimmer O₂ CAL na hodnotu vypočtenou z aktuálního barometrického tlaku – kolem 8.8, to je průměrná koncentrace O₂ ve vodě **v mg O₂/l**, která je v rovnováze se vzduchem v Č. Budějovicích, nastavíme ale podle aktuálního barometrického tlaku (tu kalibrační hodnotu Vám sdělíme). Nezapomeňte na konverzi jednotek na **ml O₂/l**.

Nakalibrovaným přístrojem měříme ve vodě za stálého míchání, na membránu elektrody se nesahá!

c) Vlastní měření spotřeby kyslíku:

Polarografickým článkem měříme obsah kyslíku po celou dobu pokusu a za stálého míchání, údaje odečítáme v 10 ml intervalech. Z PE konve naplníme sifonováním tři malé (50 ml) reagenční lahvičky (**opět necháme vodu přetékat a vezmeme až třetí objem reag. lahvičky**). Přeteklou vodu vrátíme do konve. Do reagenčních lahviček ihned přidáme prvé dvě reagensie (W1 a W2) na stanovení kyslíku dle Winklera. Změříme teplotu vody v irigátoru. Do něj vpustíme 2 – 3 ryby o známé hmotnosti a asi po 30 sec. (ryby vypustí bubliny, které měly v ústní nebo skřetové dutině) irigátor uzavřeme krycím sklem- bez bubliny!. Případně chybějící vodu doplníme z PE konve. Zaznamenáme čas a necháme stát na zapnutém míchadle asi 60 minut přikrytý ručníkem; v 10-min. intervalech polarograficky měříme konc. O₂.

Na konci pokusu zaznamenáme poslední měřený údaj, zastavíme míchání, irigátor otevřeme a tenkou hadičkou odsifonujeme vzorky do tří dalších reagenčních lahviček (**zachytíme vždy až třetí objem**). Ve všech šesti lahvičkách stanovíme koncentraci kyslíku titrací.

Z dat získaných oběma metodami vypočítáme spotřebu kyslíku na 1g hmotnosti a hodinu trvání pokusu (μl O₂*g⁻¹*h⁻¹) a výsledky porovnáme.

Všechny pomůcky uklidíme, měřicí článek vyjmeme z irigátoru, odpojíme od elektronické části, tu vypneme (OFF), na měřicí článek opět opatrně – jen na špičku - nasadíme červenou ochranou čepičku. Nádobí vypláchneme nejprve vodovodní, pak čistou vodou.

3. Měření spotřeby kyslíku savců - člověka

Úloha má ukázat jak velké množství energie je nezbytné pro zajištění průběhu životních dějů většinou homoiotermních (endotermních) živočišných druhů (hraboš, morče, člověk)

K realizaci životních dějů je třeba energie. Převážná většina energie se získává oxidací sacharidů, tuků a bílkovin kyslíkem. Konečným produktem všech biologických pochodů je teplo. Mezi spotřebou kyslíku a produkcí tepla z oxidovaných živin existuje přímo úměrný vztah. Spotřebou 1 litru kyslíku se uvolní kolem 20 kJ tepla (= kalorický ekvivalent)

Připomeňte si, jaký vztah je mezi klidovou spotřebou kyslíku a hmotností živočicha.

O kolik se zvýší spotřeba kyslíku při práci?

Cílem pokusu je:

1. změřit závislost klidového metabolismu na hmotnosti u člověka, morčete a myši (příp. želvy) a ověřit učebnicový vztah
2. zjistit, jak ovlivňuje spotřebu kyslíku člověka svalová práce.
3. odhadnout přibližné energetické nároky člověka v průběhu dne a zjistit kolik různých živin k tomu potřebuje.

Potřeby:

Respirometr s paramagnetickým analyzátozem kyslíku, ergometr, metabolická komůrka, počítač, fonendoskop, lidé, morčata, myši.

Pracovní postup:

1. Účastníci praktika se rozdělí na tříčlenné skupiny.
2. Všichni se seznámí s přístrojovým vybavením a s jeho ovládáním.
3. Pokusná osoba se zváží a spojí s přístroji, ostatní zaznamenávají data.
4. Po dobu 5-10 min bude měřena klidová spotřeba kyslíku a frekvence srdečních stahů sedícího posluchače u jedné skupiny ležícího.
5. Po dobu ca 5 min se bude měřit spotřeba kyslíku a srdeční činnost probanda pracujícího na ergometru intenzitou 40 W, na dalších ca 5 min se jeho úsilí zdvojnásobí (na 80W), posledních 10 min je sledován opět v klidu.
6. Výsledky vyhodnoťte a každá skupina vypracuje svůj protokol, zahrne do něj i data získaná na myši, morčeti a případně i želvě.
7. Koncept protokolu předloží před odchodem vedoucímu praktika k nahlédnutí.

Délka pokusu: ca 45 min.

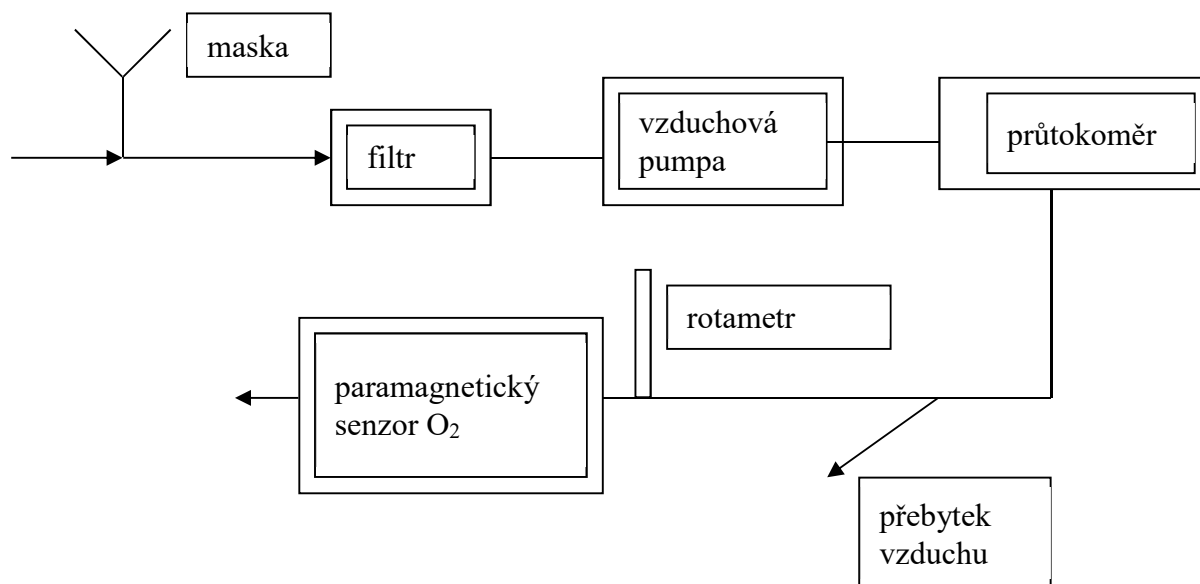
Funkce přístroje:

Na počátku pokusu necháme 2 – 3 min. proudit vzduch mimo masku- to je **kontrolní měření, podle této hodnoty a barometrického tlaku** nakalibrujeme na počítači rozsah

Vzduchová pumpa nasává vzduch, z jeho dráhy si měřená osoba odebírá do plic a opět vrací část proudu vzduchu přes masku. Ten dále prochází přes jeden ze tří digitálních průtokoměrů (liší se rozsahem), pak se většina vzduchu odpustí a malý vzorek – kolem 100 ml/min – protéká paramagnetickým analyzátozem a obě veličiny, průtok a koncentrace kyslíku ve vydýchaném vzduchu jsou monitorovány počítačem, součin průtoku a poklesu konc. O₂ proti kontrolnímu měření je jeho spotřeba.

Obě čidla (průtokoměr a paramagnetický analyzátor) reagují na hmotnost plynů, průtokoměry byly již při výrobě kalibrovány na vzduch při NTP (normal temperature and pressure – normální tlak a teplota), při kontrolním měření je třeba přístroj nastavit podle tlaku a teploty při pokusu.

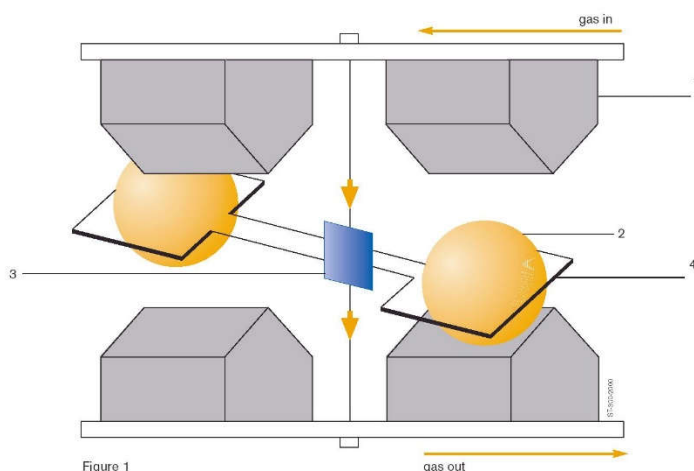
Obr. 1. Schéma přístroje:



Je to metabolimetr otevřeného systému: pumpa nasává vzduch z masky, která má ventily umožňující stály průtok vzduchu, pokusná osoba či zvíře vydechuje do tohoto proudu vzduch z plic, jeho množství se měří elektronickým průtokoměrem, přebytek vzduchu se odfukuje stranou a do O₂ senzoru jde jen malá část celkového průtoku, podíl těchto dvou cest nastavujeme na rotametrovém průtokoměru podle spotřeby kyslíku a tedy velikosti živočicha.

V elektronickém průtokoměru se měří odpor nahříváného drátu, který je chlazen tím více, čím více plynu kolem něj proudí, s klesající teplotou klesá el. odpor drátu.

Paramagnetický senzor (**PAROX**) je založen na poměrně vysoké magnetické permeabilitě O₂ v porovnání s jinými plyny, kyslík je tedy paramagnetický, má slabé vlastní magnet. pole. Malá skleněná nádobka ve tvaru činky je naplněna N₂, je tedy diamagnetická, je volně zavěšena v nehomogenním magnetickém poli a natáčí se v tomto poli silou, která je úměrná (para)magnetické permeabilitě směsi plynů ve vzorku, který komůrkou protéká a tedy na obsahu kyslíku. Výchylka je zaznamenána optickým systémem ze zdroje světla, zrcátkem na ose činky a dvojicí detektorů, mezi nimi vznikne potenciálový rozdíl, který po zesílení polohu kompenzuje v závitech drátu kolem kuliček činky. . Rozdíl mezi proudem udržujícím činku v rovnováze v nepřítomnosti O₂ a při jeho měřeném obsahu je úměrný obsahu O₂ v protékajícím plynu, objem detektoru je jen cca 3 ml.



Obr. 2. Schéma paramagnetického senzoru O₂
1- permanentní magnety, 2-„činka“ plněná N₂,
3- zrcátko na ose činky, 4- závity drátu kolem „činky“

Příprava respirometru / metabolimetru k měření

Na vstupu vzduchu do pump musí být namontovány filtr k zachycení prachových částic a před čidlem sušící kolonka CaCl_2 .

Zapnutí přístroje <ol style="list-style-type: none">1) uvolníme zátku na plynovém výstupu z PAROXu2) zapojíme metabolimetr do sítě3) otevřeme naplno ventil u zvoleného průtokoměru, ostatní ventily se žlutými křídélky jsou uzavřené4) naplno povolíme tlačku na odfuk, ventil u rotametru je uzavřený5) zapojíme pumpu (zástrčku transformátorku do zásuvky), stávající pumpa má výkon asi 100 l/min., lze ji seškrtnit na průtok 30 l/min., ne méně.6) po cca 15 sekundách opatrně ventilem u respirometru seškrtneme průtok na požadovanou hodnotu, <u>ale ne méně než 30 l/min.</u>7) červený kohout na odfuk přivřeme opatrně tak, aby plovák rotametru na vzduchovém vstupu do PAROXu se ustálil na 100 dílcích8) zapojení PAROXu (transf. do zásuvky)9) nasazení dýchací masky a nastavení sběru dat na počítači.	Vypnutí přístroje – kroky následují v opačném pořadí : <ol style="list-style-type: none">1) vyřadíme sběr dat, sundáme masku a transformátorek PAROXu vysuneme ze zásuvky.2) Kohoutem otevřeme odfuk naplno3) otevřeme ventil u průtokoměru naplno4) odpojíme pumpu od zdroje5) odpojíme od sítě celý metabolimetr6) zátkou uzavřeme vzduchový výstup z PAROXu7) úplně uzavřeme ventil rotametru
---	---

Výpočet energetických nároků člověka:

$$\text{Spotřeba } \text{O}_2 = \frac{(0,2095 - \text{FeO}_2) * V}{1 - 0,2095 + 0,85 * (0,2095 - \text{FeO}_2)} [\text{lO}_2 / \text{min}]$$

Kde FeO_2 je zlomková koncentrace kyslíku (0,2 odpovídá 20%) a V je průtok v l/min

Získané hodnoty budou odpovídat spotřebě kyslíku v litrech za 1 hod. Celkovou spotřebu kyslíku převedte na jednotky tepla (J) nebo práce (W) (=J/sec) a uvádějte ji i v ml O_2 /g/h.

Do grafu zanešte data pro člověka, morče a myš přepočtená na jednotku hmotnosti (y) proti hmotnosti (x) a porovnejte s literárními údaji.

4. Měření spotřeby kyslíku savců - hlodavce

Úloha má ukázat jak velké množství energie je nezbytné pro zajištění průběhu životních dějů většinou homoiotermních (endotermních) živočišných druhů.

Cílem pokusu je:

Změřit závislost klidového metabolismu na hmotnosti morčete a myši a ověřit učebnicový vztah.

Potřeby:

Respirometr s elektrochemickým analyzátozem kyslíku, metabolická komůrka, počítač, morčata, myši.

Pracovní postup:

1. Účastníci praktika se rozdělí na tříčlenné skupiny.
2. Všichni se seznámí s přístrojovým vybavením a s jeho ovládáním.
3. Zváží se pokusné zvíře
4. Po dobu 20 min bude měřena klidová spotřeba kyslíku zvířete – zvíře musí být klidné.
5. Výsledky vyhodnotíte a každá skupina vypracuje svůj protokol, zahrne do něj i data získaná na myši/morčeti od jiné skupiny.
6. Koncept protokolu předloží před odchodem vedoucímu praktika k nahlédnutí.

Délka pokusu: ca 45 min.

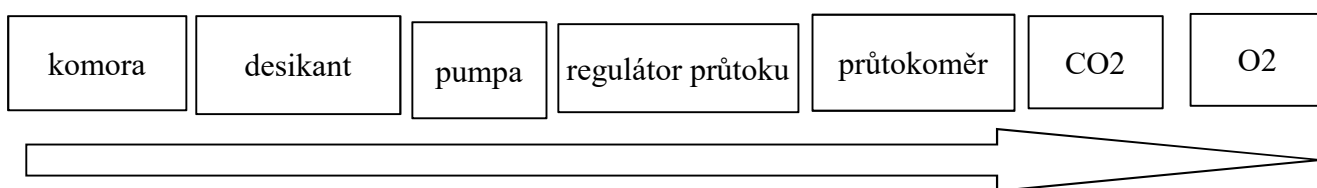
Funkce přístroje:

Na počátku pokusu necháme 2 – 3 min. proudit vzduch mimo komoru- to je **kontrolní měření, podle této hodnoty** nakalibrujeme analyzátor kyslíku.

Z metabolické komory je nasávaný vzduch zbavován vody a je měřen průtok a koncentrace oxidu uhličitého i koncentrace kyslíku.

Změřte spotřebu kyslíku morčete/myši, umístěných v metabolické komůrce po dobu ca 30 min. Průtok nastavte na 300 až 1000ml/min dle velikosti zvířete. Při pokusu dle možnosti zaznamenávejte aktivitu zvířat. Problém je, že u živočichů půjde nikoli o klidový a tedy přibližně basální metabolismus, ale o metabolismus při nějaké mírné úrovni aktivity.

Obr. 2. Soustava přístroje pro měření látkové přeměny menších živočichů.



Výpočet energetických nároků hlodavce:

$$\text{Spotřeba } O_2 = \frac{(0,2095 - FeO_2) * V - 0,2095 * FeCO_2}{0,7905} [mlO_2 / min]$$
$$\text{Spotřeba } CO_2 (\text{zjednodušená}) = (FeCO_2 - 0,0006) * V [ml / min]$$

Kde V je průtok v ml/min a FeXX zlomkový podíl daného plynu ve vzduchu odcházejícím z komory

Získané hodnoty budou odpovídat spotřebě kyslíku v litrech za 1 hod. Celkovou spotřebu kyslíku převedte na jednotky tepla (J) nebo práce (W) (=J/sec) a uvádějte ji i v ml O₂/g/h.

Do grafu zanešte data pro člověka, morče a myš přepočtená na jednotku hmotnosti (y) proti hmotnosti (x) a porovnejte s literárními údaji.

5. Vliv svalové práce na kardiovaskulární funkce

Cílem pokusu je prokázat, jak svalová práce ovlivní srdeční činnost a krevní tlak

Teorie pokusu:

Zvýšené nároky buněk na kyslík při svalové práci jsou umožněny zrychlením průtoku krve v jednotlivých orgánech. To je umožněno zvětšením činnosti srdce, především zvýšením frekvence srdečního tepu a z části i zvětšením systolického objemu. Zvýšený průtok krve cévami se projeví jako změna krevního tlaku. Zvýšení krevního tlaku nemusí být přímo úměrné změnám v srdeční frekvenci, poněvadž jeho velikost určuje i odpor periferních cév.

Cíl pokusu: *Zjistěte, o kolik se změní srdeční frekvence, diastolický a systolický krevní tlak u pracujícího člověka a jaký je vztah mezi srdeční frekvencí a krevním tlakem. Jak dlouho trvá, než se měřené hodnoty vrátí k normálu?*

Potřeby:

Tonometry s fonendoskopem

Popis pokusu a pracovní postup:

1. Účastníci praktika se rozdělí na 3- členné skupiny. Každý si změří své parametry a vystřídejte se v roli zapisovatelů.
2. Frekvence srdečního tepu a krevní tlak měřte rtuťovým tonometrem, jeho manžetu natlakujte (asi na 150 mm Hg), mikrofon fonendoskopu přiložte na tepnu v zápěstí na straně palce, zvolna odpouštějte tlak. Naučte se odposlouchat stav, kdy seškracením projde systolický tlak a kdy i diastolický. Na stupnici tonometru v těchto okamžicích odečtete hodnoty systolického a diastolického tlaku.
4. Nejdříve proved'te měření **klidového stavu**, tj. na sedící osobě, která seděla předtím už alespoň 5 min. Měření proved'te 3x a všechny hodnoty si přehledně запиšte do připravené tabulky.
5. Následně pokusná osoba udělá 30 dřepů. Proved'te měření v 1, 3 a 5 min po skončení práce.
6. Navzájem se vystřídejte v úlohách měřené osoby, experimentátora a zapisovatele.
7. Každý účastník si vytvoří vlastní grafy: Graf 1: hodnoty syst. a diast. tlaku na ose y, časová osa = osa x - bodový graf se spojnicemi; Graf 2: tepová frekvence na ose y, časová osa = osa x - bodový graf se spojnicemi. Ve výsledném protokolu, který vypracujete jako skupina, bude přehledná tabulka všech naměřených hodnot obou veličin a to od všech členů týmu. Koncepty protokolů předložte vedoucímu praktika k nahlédnutí před přechodem na další úlohu.

6. Vliv svalové práce na kardiovaskulární funkce – EKG

Cílem pokusu je prokázat, jak svalová práce ovlivní srdeční činnost.

Teorie pokusu:

Zvýšené nároky buněk na kyslík při svalové práci jsou umožněny zrychlením průtoku krve v jednotlivých orgánech. To je umožněno zvětšením činnosti srdce, především zvýšením frekvence srdečního tepu a z části i zvětšením systolického objemu. Zvýšený průtok krve cévami se projeví jako změna krevního tlaku. Zvýšení krevního tlaku nemusí být přímo úměrné změnám v srdeční frekvenci, poněvadž jeho velikost určuje i odpor periferních cév. Srdeční činnost lze sledovat různými způsoby, jedním z nich je EKG – elektrokardiograf, jehož nejjednodušší zapojení pracuje s třemi resp. se čtyřmi elektrodami připojenými na končetiny. Elektrické proudy, které vznikají v srdci a jsou zodpovědné za jeho stahy se šíří do celého těla, které funguje jako prostorový vodič. Zaznamenávají se malé odchylky v napětí mezi končetinami (řádově milivolty) a jsou vynášeny do grafu. Složitější zapojení EKG s více elektrodami v blízkosti srdce jsou využívány k diagnostice srdečních chorob.

Cíl pokusu: *Zjistěte, za jak dlouho se ustálí srdeční frekvence po fyzické námaze.*

Potřeby:

ergometr, EKG

Postup:

- 1) seznámte se s EKG a způsobem připojení elektrod.
- 2) Naměřte si klidové EKG. Všimněte si, že se mění srdeční frekvence podle toho, jestli se nadechujete nebo vydechujete.
- 3) Šlapejte asi pět minut na ergometru – intenzivně
- 4) po ukončení šlapání zaznamenávejte srdeční frekvenci ca 15 minut v intervalech 1,2,3,5,7,10 a 15 minut
- 5) sestrojte graf z naměřených hodnot

7. Vliv koncentrace oxidu uhličitého na frekvenci dýchání

Cílem pokusu je zjistit, jak závisí frekvence dýchání na koncentraci oxidu uhličitého

Teorie pokusu:

Během fyzické zátěže se produkuje zvýšené množství oxidu uhličitého, jenž je přenášen i jako kyselina uhličitá v krvi. Centrální chemoreceptory v prodloužené míše poblíž dechového centra reagují na změnu pH mozkomíšního moku. Výsledkem je zvýšená dechová frekvence. Zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého v krvi budeme simulovat tím, že uměle zvýšíme jeho koncentraci v komoře se zvířetem.

Cíl pokusu: *Zjistěte, jak závisí dýchací frekvence na koncentraci oxidu uhličitého.*

Potřeby:

komora, tlakový převodník, zesilovač, osciloskop, rotametry, oxid uhličitý, vzduchová pumpa, morče

Postup:

- 1) seznámte s aparaturou a funkcemi osciloskopu
- 2) uzavřete morče do komory
- 3) po uklidnění zaznamenejte dechovou frekvenci
- 4) pomalu zvedejte koncentraci oxidu uhličitého – po 10 až 20 mm krocích na levém rotametu až do 100mm, pravý je vždy na ca. 150mm; pečlivě sledujte morče, v případě že bude neklidné, volejte vedoucího praktika.
- 5) podle tabulky přepočítejte mm sloupce na průtoky plynu
- 6) sestrojte graf závislosti dechové frekvence na koncentraci oxidu uhličitého.

Tabulka průtoku vzduchu a CO₂

Výška sloupce [mm]	Průtok vzduchu [ml/min]	Průtok CO ₂ [ml/min]
150	374.0	238.0
140	345.0	219.5
130	315.0	200.5
120	282.0	179.5
110	253.0	161.0
100	223.0	141.9
90	193.0	122.8
80	163.0	103.7
70	135.0	85.9
60	108.0	68.7
50	84.0	53.5
40	62.0	39.5
30	46.0	29.3
20	31.0	19.7
10	21.0	13.4

CO₂ má mol. hmotnost 44, vzduch asi 28, CO₂ tedy při stejném průtoku nadzvedne kuličku ve sloupci rotametu výše než vzduch. Průtok CO₂ byl potom vypočten takto: $28 / 44 * \text{průtok vzduchu}$.

8. Endokrinologie hmyzu

Vliv adipokinetického hormonu (AKH) na mobilizaci lipidů z tukového tělesa hmyzu

Adipokinetické hormony jsou jedny z nejlépe prostudovaných peptidických hormonů u hmyzu. Jsou to okta- až deka-peptidy, které jsou vylučovány z corpora cardiaca a zasahují do metabolismu většiny základních látek. Můžeme je označit jako stresové hormony, protože obecně inhibují anabolické a stimuluji katabolické pochody. Podle své poprvé zjištěné funkce, mobilizace lipidů z tukového tělesa u saranče stěhovavé, dostaly také svůj název. V následující úloze si ukážeme jejich vliv na metabolismus tuků u saranče stěhovavé.

Zvýšení hladiny lipidů v hemolymfě saranče stěhovavé *Locusta migratoria* po injekci adipokinetického hormonu (AKH-I)

Princip metody: lipidické sloučeniny v prostředí silných kyselin odštěpují mastné kyseliny, jejichž dvojně vazby pak reagují s vanilinem za vzniku barevných sloučenin. Reakce není specifická jen pro lipidy, ale pro látky s dvojnými vazbami obecně. Hmyzí lipidy jsou ale většinou nenasycené, takže metoda je pro tento materiál velmi citlivá.

Vanilinová reagenie: 1,98 g vanilinu se rozpustí v 668 ml kyseliny fosforečné p.a. (H_3PO_4), zahřeje na 60°C, ochladí a doplní se destilovanou vodou na 1 l. Vytvoří se žlutý roztok, který se nechá stát v temnu a chladnu alespoň 1 týden.

Postup: Nachystáme si 5 dospělých jedinců saranče stěhovavé. Do 5 zkumavek si napipetujeme po 200 μ l koncentrované kyseliny sírové. Pak pomocí injekční jehly porušíme tělní stěnu v měkké části kutikuly za kyčlí posledního páru noh saranče a do pipety (nebo kapiláry) odebereme 1 μ l hemolymfy, kterou opatrně přeneseme do připravené kyseliny. Ihned poté injikujeme do zadečku přes intersegmentální membránu pomocí Hamiltonovy stříkačky 50 pmolů roztoku AKH v 10 μ l 80% metanolu. Saranči označíme (lze tak udělat popisovačem na hlavu či hrud') nebo jej držíme odděleně od ostatních a po 90 minutách odebereme stejným způsobem opět 1 μ l hemolymfy (do dalších 5 zkumavek s kyselinou).

Odebranou hemolymfu s kyselinou sírovou opatrně promícháme, zároveň si připravíme slepý vzorek (200 μ l kyseliny sírové bez hemolymfy) a standardní vzorky (viz níže) a všechno (tedy celkem 16 zkumavek!!!) zahříváme 10 min při 100°C v zazátkovaných zkumavkách. Pak ochladíme na vodní lázni. Do studených vzorků přidáme 2,5 ml vanilinové reagenie, rychle, ale opatrně promícháme a umístíme do temna. Po 60 minutách (ne dříve) měříme absorbanci při 528 nm proti slepému vzorku.

Standardní křivka: kyselina olejová (m.w.= 282.5) je naředěná v hexanu na 1 mM a 10mM roztoky. Do připravených zkumavek pak odebereme dávku podle tabulky níže. Hexan necháme ve zkumavkách odpařit (za pokojové teploty trvá odpaření několik minut). Jakmile je hexan odpařen (**ne dříve, ne později!!!**) hned přidáme 200 μ l kyseliny sírové a dále postupujeme stejně jako u pokusných vzorků (zahřívání, vanilinová reagenie). Ze získaných hodnot sestrojíme kalibrační křivku tak, že na osu x nanese dávkou kyseliny olejové a na osu y naměřené absorbance.

zkumavka č.	roztok kys. olejové	dávka kys. olejové (μ g)
0.	0	0
1.	1 mM..... 10 μl	2.825
2.	1 mM..... 20 μl	5.650
3.	10 mM..... 5μl	14.125
4.	10 mM..... 10μl	28.250
5.	10 mM..... 20μl	56.500

Závěr: Hodnoty absorbancí naměřené ve vzorcích hemolymfy převedeme pomocí kalibrační křivky na μg standardu (= μg lipidů) a přepočítáme na **mg lipidů/ml hemolymfy** (odebíral se $1\mu\text{l}$!). Odečtením těchto hodnot u každé saranče - hodnota po injekci hormonu mínus hodnota před injekcí - získáme zvýšené množství lipidů v hemolymfě po aplikaci adipokinetického hormonu.

Do protokolu uveďte tabulku kalibrační křivky, kalibrační křivku a z ní odečtené hodnoty lipidů podle níže uvedené tabulky.