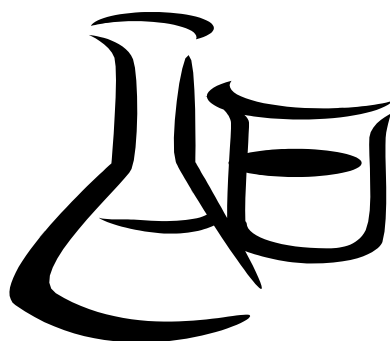


# Sacharidy a vybraná vyšetření u pacientů s diabetes mellitus

---

Praktické cvičení z lékařské biochemie  
*Všeobecné lékařství*

Lenka Fialová a Martin Vejražka



2024/25

## **Obsah**

ÚLOHA 1 – STANOVENÍ GLYKEMIE A OGTT	3
ÚLOHA 2 – STANOVENÍ GLYKOVANÝCH PROTEINŮ (FRUKTOSAMINU)	4
ÚLOHA 3 – PRŮKAZ GLUKÓZY A FRUKTÓZY V MOČI	5
ÚLOHA 4 – KVALITATIVNÍ A SEMIKVANTITATIVNÍ PRŮKAZ KETOLÁTEK V MOČI	7
ÚLOHA 5 – STANOVENÍ GLYKÉMIE OSOBNÍM GLUKOMETREM	8
DALŠÍ STUDIJNÍ MATERIÁL	8

# Úloha 1 – Stanovení glykemie a oGTT

## Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava GLU 1000 BLT 00027 firmy Erba-Lachema.

### 1. pracovní roztok

glukózaoxidáza	$\geq 166,0 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$
peroxidáza	$\geq 16,0 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$
3-metylfenol	$10,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
4-aminoantipyrin	$1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
fosforečnanový pufr, pH 8	$140,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

### 2. standardní roztok glukózy

sérum 1 – vzorek odebrán nalačno	$10,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
sérum 2 – vzorek odebrán 60 minut po zátěži glukózou	
sérum 3 – vzorek odebrán 120 minut po zátěži glukózou	

## Pracovní postup:

K dispozici jsou tři vzorky séra téhož pacienta odebírané v rámci orálního glukózového tolerančního testu (oGTT) v časech 0, 60 a 120 minut (označené jako vzorek séra 1, 2 a 3).

Připravte a označte pět zkumavek a odměřte do nich reakční směsi dle tabulky:

Odměřit v ml:	Čas 0 (zkumavka 1)	Čas 60' (zkumavka 2)	Čas 120' (zkumavka 3)	Standard (zkumavka 4)	Slepý vzorek (zkumavka 5)
Pracovní roztok	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Sérum 1 (čas 0)	0,010	–	–	–	–
Sérum 2 (čas 60')	–	0,010	–	–	–
Sérum 3 (čas 120')	–	–	0,010	–	–
Standard ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	–	–	–	0,010	–
Destilovaná voda	–	–	–	–	0,010

Obsah zkumavek promíchejte a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě v temnu. Změřte absorbanci při 500 nm proti slepému vzorku do 30 minut po skončení inkubace.

Vypočítejte koncentraci glukózy v jednotlivých vzorcích séra podle vzorce

$$S\text{-Glc} = \frac{A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{standard}}} \cdot c_{\text{standard}} \quad (\text{koncentrace standardu: } 10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1})$$

### Úkol:

Vyhodnoťte oGTT.

## Úloha 2 – Stanovení glykovaných proteinů (fruktosaminu)

### Reagencie:

1. činidlo s NTB 

uhličitanový pufr, pH 10,3–10,4

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  75,0 mmol · l<sup>-1</sup>

$\text{NaHCO}_3$  25,0 mmol · l<sup>-1</sup>

nitrotetrazoliová modř (NTB) 0,48 mmol · l<sup>-1</sup>

2. hovězí sérum
3. glukóza 0,2 mmol · l<sup>-1</sup> v uhličitanovém pufru 100 mmol · l<sup>-1</sup>, pH 10,3–10,4
4. glykované sérum (směs pro dlouhou glykaci): 0,5 ml roztoku bílkovin se smísí s 1 ml roztoku glukózy v uhličitanovém pufru (viz výše), nechá se stát alespoň 5 dní při pokojové teplotě

### Princip:

Porovnáme koncentraci glykovaných proteinů ve dvou vzorcích:

- v čerstvě připravené směsi séra s glukózou (v tabulce označení krátká glykace) – vzorek I
- v séru, které bylo několik dní glykované glukózou – směs připravená stejně jako v předchozím případě byla několik dní inkubována při pokojové teplotě (v tabulce označení dlouhá glykace) – vzorek II

Stanovení koncentrace glykovaných proteinů je založeno na jejich redukčních vlastnostech, pomalu redukují nitrotetrazoliovou modř (NTB) za vzniku barevného produktu (formazanu). Biologický vzorek necháváme reagovat ve dvou fázích: nejprve se NTB redukuje rychle reagujícími redukujícími látkami (např. glukózou, askorbátem aj.), které jsou v séru běžně přítomné. Poté změříme výchozí absorbanci produktu redukce NTB a sledujeme, jak se jeho koncentrace dále pomalu zvyšuje. Tento pomalý vzestup odpovídá převážně redukci NTB glykovanými proteiny.

### Pracovní postup:

1. Připravíme směs séra s glukózou pro krátkou glykaci: smísíme 50  $\mu$ l hovězího séra se 100  $\mu$ l roztoku glukózy.
2. Směs séra pro dlouhou glykaci již připravena
3. Fotometrické kyvety předehřejeme na 37 °C. Přimo v kyvetách pak smísíme



Odměřit v ml:	KYVETA 1 Krátká glykace	KYVETA 2 Dlouhá glykace
Čerstvě připravená směs séra s glukózou (viz bod 1) (Vzorek I)	0,1	–
Sérum glykované několik dní (Vzorek II)	–	0,1
Činidlo s NTB	1,0	1,0
Promícháme a inkubujeme 10 minut (přesně) při 37 °C. Změříme absorbance $A_1$ při 530 nm proti destilované vodě.		
Inkubujeme dalších 10 minut (přesně) při 37 °C. Změříme absorbance $A_2$ při 530 nm proti destilované vodě.		

Míru glykace vyjádříme jako rozdíly absorbancí  $A_2 - A_1$  v testovaných sérech – s krátkou a dlouhou glykací.

$\Delta A$  porovnejte a výsledky zdůvodněte.

## Úloha 3 – Průkaz glukózy a fruktózy v moči

### Reagencie:

1. Benedictovo činidlo:  
( $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  17,3 g se rozpustí asi ve 100 ml čištěné vody.  $Na_2CO_3$  100 g a citronan sodný 173 g se rozpustí asi v 700 ml čištěné vody. Oba roztoky se smísí a objem se doplní čištěnou vodou do 1 l )
2. Selivanovo činidlo:  
(roztok resorcinolu 5 g/l v kyselině chlorovodíkové 200 g/l )
3. diagnostické proužky glukofHAN nebo některý polyfunkční diagnostický proužek

### Vzorky moči určené k analýze:

1. moč s glukózou
2. moč s glukózou a kyselinou askorbovou
3. moč s fruktózou
4. fyziologická moč
5. neznámý vzorek moči A, neznámý vzorek moči B

## Pracovní postup:

Do zkumavek podle tabulek připravte následující reakční směsi.

### *Benedictova reakce*

	<b>ZKUMAVKA 1</b> Moč s glukózou	<b>ZKUMAVKA 2</b> Moč s glukózou a kys. askorbovou	<b>ZKUMAVKA 3</b> Moč s fruktózou	<b>ZKUMAVKA 4</b> Fyziologická moč	<b>ZKUMAVKA 5</b> Neznámý vzorek
Benedictovo činidlo	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml
Moč s glukózou	cca 4 kapky	–	–	–	–
Moč s glukózou a kys. askorbovou	–	cca 4 kapky	–	–	–
Moč s fruktózou	–	–	cca 4 kapky	–	–
Fyziologická moč	–	–	–	cca 4 kapky	–
Neznámý vzorek	–	–	–	–	cca 4 kapky

Obsah ve zkumavkách promíchejte a vložte do vroucí vodní lázně.  
Po 3–4 minutách odečtěte výsledek. Hodnoťte změnu zbarvení a vznik sraženiny.

### *Selivanova reakce*

	<b>ZKUMAVKA 1</b> Moč s glukózou	<b>ZKUMAVKA 2</b> Moč s glukózou a kys. askorbovou	<b>ZKUMAVKA 3</b> Moč s fruktózou	<b>ZKUMAVKA 4</b> Fyziologická moč	<b>ZKUMAVKA 5</b> Neznámý vzorek
Moč s glukózou	cca 0,5 ml	–	–	–	–
Moč s glukózou a kys. askorbovou	–	cca 0,5 ml	–	–	–
Moč s fruktózou	–	–	cca 0,5 ml	–	–
Fyziologická moč	–	–	–	cca 0,5 ml	–
Neznámý vzorek	–	–	–	–	cca 0,5 ml
Selivanovo činidlo	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml

Obsah ve zkumavkách promíchejte a vložte do vroucí vodní lázně.  
Sledujte změnu zbarvení a po 1–3 minutách odečtěte výsledek.

## Stanovení glukózy diagnostickými proužky

### Postup:

Proužek ponoříme asi na 1 s do vyšetřované moči tak, aby se reagenční zóna smočila. Poté odstraníme přebytečnou moč otřením o okraj nádoby. Proužek ponecháme ve vodorovné poloze na nasávkavé podložce (např. na buničité vatě nebo na papírovém ručníku). Po 60 sekundách srovnáme zbarvení reagenční zóny proužku s barevnou stupnicí na obalu tuby. V přítomnosti glukózy se mění barva ze žluté na zelenomodrou. V přítomnosti vysokých koncentrací kyseliny askorbové je vývin zbarvení pomalejší.

### Úkoly:

1. Ve vzorcích moče proveďte Benedictovu reakci (průkaz redukujících látek) a Selivanovu reakci (průkaz ketohexos).

Sledujte nejen, které reakce jsou pozitivní, ale také, jak rychle probíhají. Rozdíly vysvětlete.

2. Ve vzorcích moči proveďte vyšetření pomocí diagnostických proužků glukóPHAN (specifický průkaz glukózy).

Výsledky porovnejte s výsledky Benedictovy reakce. Rozdíly vysvětlete.

## Úloha 4 – Kvalitativní a semikvantitativní průkaz ketolátek v moči

### Reagencie:

1. roztok nitroprusidu sodného (před použitím rozpustíme asi 10 mg – na špičku nože nitroprusidu v asi 3 ml destilované vody) ⚠
2. hydroxid sodný 100 g/l ⚠
3. kyselina octová koncentrovaná ⚠
4. Lestradetovo činidlo – síran amonný 20 g, uhličitan sodný bezvodý 20 g, dihydrát nitroprusidu sodného 0,2–1,0 g ⚠
5. ketoPHAN nebo některý z polyfunkčních diagnostických proužků

### Vzorky moči určené k analýze:

1. v moči s ketolátkami,
2. ve fyziologické moči,
3. v neznámém vzorku moči.

### Pracovní postup:

Se vzorky moči proveďte Legalovu a Lestradetovu zkoušku a vyšetření diagnostickým proužkem.

### Legalova zkouška

Asi ke 2 ml moči přidáme 2–3 kapky nitroprusidu sodného a zalkalizujeme 3 kapkami NaOH. Zbarvení roztoku se může změnit na žluté, oranžové až červené reakcí kreatininu (fyziologické součásti moči). Nyní roztok rozdělíme do dvou zkumavek a do jedné přidáme několik kapek

koncentrované kyseliny octové. Pokud jsou přítomné ketolátky, zbarvení se prohloubí do červena až červeno-fialova; pokud ketolátky přítomné nejsou, roztok se naopak odbarví.

### **Lestradetova zkouška**

Položíme filtrační papír na hodinové sklo, navlhčíme jej čistou vodou a přebytek vody slijeme. Ve středu filtračního papíru vytvoříme hromádku Lestradetova činidla o průměru asi 0,5 cm. Pak na Lestradetovo činidlo kápneme 1–2 kapky vyšetřované moči. Jsou-li přítomny ketolátky, vytvoří se během 1–2 minut fialové zbarvení.

### **Stanovení ketolátek diagnostickými proužky**

Proužek ponoříme asi na 1 s do vyšetřované moči tak, aby se reagenční zóna smočila. Poté odstraníme přebytečnou moč otřením o okraj nádoby. Proužek ponecháme ve vodorovné poloze na nasákové podložce (např. na buničité vatě nebo na papírovém ručníku). Po 60 sekundách srovnáme zbarvení reagenční zóny proužku s barevnou stupnicí na obalu tuby. Pozitivní reakce se projeví změnou barvy z krémově bílé do fialové. Srovnávací stupnice je kalibrována na koncentraci kyseliny octové.

### **Úkol:**

Vyhodnoťte výsledky reakcí. Interpretujte výsledky vyšetření neznámého vzorku moči na glukózu a ketolátky.

## **Úloha 5 – Stanovení glykémie osobním glukometrem**

Stanovení glykémie osobním glukometrem bude provedeno dle instrukcí vyučujícího.

### **Další studijní materiál**

- Diabetes mellitus

Prispěvatelé WikiSkript, *Vybraná biochemická vyšetření u pacientů s diabetes mellitus (1. LF UK, VL, 2. roč.)* [online], , c2024, Datum poslední revize 1. 03. 2024, 20:55 UTC, [citováno 16. 08. 2024]

<[https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Vybran%C3%A1\\_biochemick%C3%A1\\_vy%C5%A1et%C5%99en%C3%AD\\_u\\_pacient%C5%AF\\_s\\_diabetes\\_mellitus\\_\(1.\\_LF\\_UK,\\_VL,\\_2.\\_ro%C4%8D.\)&oldid=473103](https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Vybran%C3%A1_biochemick%C3%A1_vy%C5%A1et%C5%99en%C3%AD_u_pacient%C5%AF_s_diabetes_mellitus_(1._LF_UK,_VL,_2._ro%C4%8D.)&oldid=473103)>

- Reakce sacharidů – Selivanova a Benedictova

Fialová L.: Sacharidy Reakce, chromatografie, optická otáčivost. [online], , 2012/2013 [citováno 12. 11. 2024] <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/4740/sacharidy-teorie.pdf>, str. 8 (Selivanova reakce) a str. 14 (Benedictova reakce)

- Vrozené poruchy metabolismu fruktózy

Prispěvatelé WikiSkript, Poruchy metabolismu fruktózy [online], , c2021, Datum poslední revize 5. 10. 2021, 11:34 UTC, [citováno 10. 09. 2024] [https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Poruchy\\_metabolismu\\_frukt%C3%B3zy&oldid=449678](https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Poruchy_metabolismu_frukt%C3%B3zy&oldid=449678)