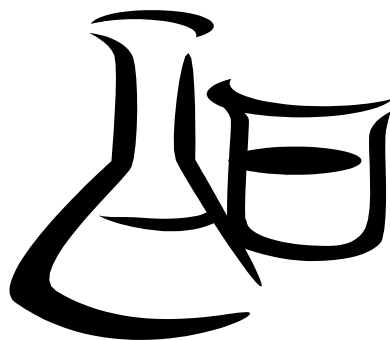


Vybraná vyšetření u pacientů s diabetes mellitus

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka



2020/21

Obsah

1. STANOVENÍ GLYKEMIE A OGTT 3
2. STANOVENÍ GLYKOVANÝCH PROTEINŮ (FRUKTOSAMINU) 4
3. KVALITATIVNÍ A SEMIKVANTITATIVNÍ PRŮKAZ GLUKÓZY V MOČI 5
4. KVALITATIVNÍ A SEMIKVANTITATIVNÍ PRŮKAZ KETOLÁTEK V MOČI 6
5. STANOVENÍ GLYKEMIE OSOBNÍM GLUKOMETREM 7

1. Stanovení glykemie a oGTT

Reagencie:

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

1. pracovní roztok \diamond
 - 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 $10,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
3. sérum 1 – vzorek odebrán nalačno
- 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 mmol·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.

2. Stanovení glykovaných proteinů (fruktosaminu)

Reagencie:

- Činidlo \blacktriangle
 - uhličitanový pufr, pH 10,3–10,4
 - Na_2CO_3 75,0 mmol · l⁻¹
 - NaHCO_3 25,0 mmol · l⁻¹
 - nitrotetrazoliová modř (NTB) 0,48 mmol · l⁻¹
- standard glykovaných bílkovin 250,0 μmol · l⁻¹
- sérum (hovězí)
- glukóza 0,2 mmol · l⁻¹ v uhličitanovém pufru 100 mmol · l⁻¹, pH 10,3–10,4
- glykované sérum: 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

Pracovní postup:

Porovnáme koncentraci glykovaných proteinů ve dvou vzorcích:

- v čerstvě připravené směsi séra s glukózou,
- v séru, které bylo několik dní glykované glukózou – směs připravená stejně jako v předchozím případě byla několik dní inkubována při pokojové teplotě.

- Připravíme směs séra s glukózou: smísíme 50 μl séra se 100 μl roztoku glukózy.
- Fotometrické kyvety předehřejeme na 37 °C. Přimo v kyvetách pak smísíme

Odměřit v ml:	Krátká glykace	Dlouhá glykace	Standard
Směs séra s glukózou (čerstvě připravená)	0,1	–	–
Glykované sérum (inkubované několik dní)	–	0,1	–
Standard	–	–	0,1
Činidlo	1,0	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.			

Koncentraci glykovaných proteinů stanovíme podle vzorce

$$\text{Glyk.prot.} = \frac{A_{2\text{vzorku}} - A_{1\text{vzorku}}}{A_{2\text{standardu}} - A_{1\text{standardu}}} \cdot c_{\text{standardu}} \quad (\text{koncentrace standardu: } 250 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1})$$

3. Kvalitativní a semikvantitativní průkaz glukózy v moči

Reagencie:

1. Fehlingův roztok I – pentahydrát síranu měďnatého $70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ⚠ ⚡
2. Fehlingův roztok II – hydroxid sodný 250 g a tetrahydrát vínanu draselno-sodného 350 g v 1 l destilované vody ⚡
3. Kyselina sulfosalicylová dihydrát $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ⚡
4. diagnostické proužky glukoPHAN nebo některý polyfunkční diagnostický proužek
5. vzorky moči: moč s glukózou
moč s glukózou a kyselinou askorbovou
moč s fruktózou
fyziologická moč
neznámý vzorek moči

Fehlingova zkouška

Pracovní postup:

Moč nesmí obsahovat bílkoviny, je proto vhodné nejprve provést zkoušku kyselinou sulfosalicylovou. V pozitivním případě odstraníme bílkoviny srážením a filtrací (asi ke 2 ml moči přidáme přibližně $0,2 \text{ ml}$ acetátového pufru o pH 4,7, promícháme, povaříme asi 1 minutu a sráženinu odstraníme filtrací).

Čerstvý pracovní roztok Fehlingova činidla připravíme smícháním Fehlingova roztoku I a II v poměru přibližně 1:1. Samotné činidlo nesmí při povaření měnit barvu. Asi k 1 ml zkoumaného vzorku přidáme stejný díl Fehlingova činidla a ohřejeme ve vroucí vodní lázni. V přítomnosti glukózy vznikne zelenožlutá, žlutá až cihlově červená sráženina. Barva sráženiny závisí na koncentraci redukujícího cukru v moči (zelená sráženina – cca $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glukózy, hnědočervená sráženina – cca $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glukózy, červená sráženina – nad cca $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glukózy).

Úkol:

Proveďte Fehlingovu reakci s

- močí s glukózou,
- močí s glukózou a kyselinou askorbovou,
- močí s fruktózou,
- fyziologickou močí,
- neznámým vzorkem moči.

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

Stanovení glukózy diagnostickými proužky

Pracovní 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 nasákové 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.

Úkol:

Proveďte zkoušku na glukózu diagnostickým proužkem s

- močí s glukózou,
- močí s glukózou a kyselinou askorbovou,
- močí s fruktózou,
- fyziologickou močí,
- neznámým vzorkem moči

Sledujte nejen, které reakce jsou pozitivní, ale také, jak rychle probíhají. Výsledky porovnejte s výsledky Fehlingovy zkoušky. Rozdíly vysvětlete.

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, uhličitán sodný bezvodý 20 g, dihydrát nitroprusidu sodného 0,2–1,0 g ⚠
5. ketoPHAN nebo některý z polyfunkčních diagnostických proužků
6. vzorky moči

Legalova zkouška

Pracovní postup:

Asi ke 2 ml moči přidáme 2–3 kapky nitroprusidu sodného a zalkalizujeme 3 kapkami NaOH. Vznikne červené zbarvení způsobené reakcí kreatininu. Červeně zbarvený roztok rozdělíme do dvou zkumavek a do jedné přidáme několik kapek koncentrované kyseliny octové. Pokud jsou přítomné ketolátky, zbarvení se změní do červeno-fialova, pokud se roztok odbarví, bylo červené zbarvení způsobeno pouze kreatininem (fyziologická součást moči).

Lestradetova zkouška

Pracovní postup:

Navlhčíme filtrační papír, nasypeme na něj malé množství práškového Lestradetova činidla a přidáme 1–2 kapky moči. Asi do 1 minuty se v případě přítomnosti ketolátek vytvoří fialové zbarvení.

Stanovení ketolátek diagnostickými proužky

Pracovní 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 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 acetoctové.

Úkol:

Proveďte Legalovu zkoušku, Lestradetovu zkoušku a zkoušku diagnostickým proužkem na ketolátky

- v moči s ketolátkami,
- ve fyziologické moči,
- v neznámém vzorku moči.

Výsledky vyhodnoťte.

Interpretujte výsledky vyšetření neznámého vzorku moči na glukózu a ketolátky.

5. Stanovení glykémie osobním glukometrem

Stanovení glykémie osobním glukometrem bude provedeno dle instrukcí vyučujícího.