ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK A VFN

Vybraná vyšetření u pacientů s diabetes mellitus

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství

Martin Vejražka

2023/24

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 ⚠
   - glukózaoxidáza ≥ 166,0 μkat · l^{-1}
   - peroxidáza ≥ 16,0 μkat · l^{-1}
   - 3-metylfenol 10,0 mmol · l^{-1}
   - 4-aminoantipyrin 1,0 mmol · l^{-1}
   - fosforečnanový pufr, pH 8 140,0 mmol · l^{-1}
2. standardní roztok glukózy 10,0 mmol · 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

$$\text{S-Glc} = \frac{A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{standard}}} \cdot c_{\text{standard}}$$

(koncentrace standardu: 10 mmol · l^{-1})

Úkol:

Vyhodnoťte oGTT.

2. Stanovení glykovaných proteinů (fruktosaminu)

Reagencie:

1. Činidlo s NTB ⚠
   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}
2. standard glykovaných bílkovin 250,0 µmol · l^{-1}
3. hovězí sérum
4. glukóza 0,2 mmol · l^{-1} v uhličitanovém pufru 100 mmol · l^{-1}, pH 10,3–10,4
5. 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

Princip:

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.

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: smísíme 50 µl hovězího séra se 100 µl roztoku glukózy.
2. Fotometrické kyvety předehřejeme na 37 °C. Přímo v kyvetách pak smísíme

Odměřit v ml:	Krátká glykace	Dlouhá glykace	Standard
Čerstvě připravená směs séra s glukózou (viz bod 1)	0,1	–	–
Sérum glykované několik dní („vzorek“)	–	0,1	–
Standard	–	–	0,1
Činidlo s NTB	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

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

3. Kvalitativní a semikvantitativní průkaz glukózy v moči

Reagencie:

1. Fehlingův roztok I – pentahydrát síranu měďnatého 70 g · 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 g · 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 ml acetátového pufru o pH 4,7, promícháme, povaříme asi 1 minutu a sraženinu odstraníme filtrací).

Čerstvý pracovní roztok Fehlingova činidla připravíme smícháním Fehlingova roztoku I a II v poměru přibližně 1:1. Pro každý zkoušený vzorek budeme potřebovat asi 1 ml činidla, navíc budeme potřebovat asi 1 ml činidla pro negativní zkoušku.

Nejprve provedeme negativní zkoušku: Do zkumavky odlijeme přibližně 1 ml činidla a zahřejeme jej ve vroucí vodní lázni. Činidlo nesmí změnit barvu.

Vlastní zkoušku provedeme tak, že do zkumavky odlijeme asi 1 ml zkoumaného vzorku, přidáme k němu asi 1 ml Fehlingova činidla a ohřejeme ve vroucí vodní lázni. V přítomnosti redukujících látek, např. glukózy, vznikne zelenožlutá, žlutá až cihlově červená sraženina. Barva sraženiny závisí na koncentraci redukujícího cukru v moči (zelená sraženina – cca 25 mmol · l^{-1} glukózy, hnědočervená sraženina – cca 100 mmol· l^{-1} glukózy, červená sraženina – nad cca 150 mmol · 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 nasákavé 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, uhličitan 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. 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

Pracovní postup:

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

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 nasákavé 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.