

Úloha č. 2

STANOVENÍ GLUKOSY

Stanovení glukosy v krevním séru či plasmě má velký význam při diagnostice diabetu.

A) Stanovení proved'te setem Glukosa a Oxochrom Glukosa fy. Lachema, a to bez deproteinace. Popište mechanismus provedeného stanovení.

B) Na enzymové metodě stanovení glukosy lze dokumentovat negativní interferenci kys. askorbové.

Proved'te opět enzymové stanovení glukosy - nasad'te k pokusu blank, standard, vzorek séra plus vzorek séra s 50 μ l kys. askorbové. Vysvětlete vliv kys. askorbové.

C) Semikvantitativní stanovení - Pomocí reagenčních papírků Dextrostix stanovte koncentraci glukosy ve vlastní kapilární krvi.

D) Za použití enzymového analyzátoru stanovte obsah glukosy ve vzorcích séra a vlastní kapilární krvi.

HEMOGLOBIN A JEHO DERIVÁTY

Základní typy hemoglobinů nacházejících se v krevním řečišti oxyhemoglobin HbO₂ a jeho deoxygenovaná forma deoxyhemoglobin _deoxyHb se liší svými absorpčními spektry v oblasti 500 - 600 nm. HbO₂ vykazuje dvě výrazná absorpční maxima při 541 a 576 nm, zatímco deoxyHb v této oblasti pouze jediný široký absorpční pás (555 nm).

Dalším modifikovaným hemoglobinem v krvi je toxický karboxylhemoglobin (karboxyHb, HbCO). CO se fyziologicky v malém množství tvoří odbouráváním bilirubinu, vyšší koncentrace v inhalovaném vzduchu způsobují otravu. Afinita hemoglobinu k CO je 218 krát vyšší než ke kyslíku (při koncentraci 0.1 % CO v inhalovaném vzduchu je přes 50 % hemoglobinu zablockováno). Ačkoli CO "reaguje" s hemoglobinem podstatně pomaleji než kyslík, vzniklá jednotka je velmi stálá a CO se z molekuly uvolňuje 10 000 krát pomaleji než kyslík.

Absorpční spektrum HbCO je velmi podobné spektru oxyhemoglobinu (maxima 539 a 568 nm). Rozlišení obou spekter lze docílit přidávkem redukčního činidla, který vyčerpá z roztoku kyslík a HbO₂ přejde na deoxyHb. Absorpční spektrum HbCO se nemění.

Methemoglobin (metHb) je oxidovaná forma hemoglobinu (oxy- či deoxy-), ve které je Fe²⁺ oxidováno na Fe³⁺. MetHb není schopen reverzibilně vázat kyslík a není schopen ho ani

transportovat. Fyziologicky vzniká autooxidací hemoglobinu, jeho koncentrace v krvi je však nižší než 1 %. Ve vysokých koncentracích vede k cyanóze.

Princip stanovení hemoglobinu v krvi

Z hemoglobinu se reakcí s KCN v přítomnosti $K_3[Fe(CN)_6]$ připraví stabilní derivát kyanmethemoglobin, který vykazuje ve viditelné oblasti jediné absorpční maximum při 540 nm, $\epsilon = 11\,000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Příprava hemolyzované krve

Do Eppendorfy odpipetujte 0.5 ml nesrážlivé krve a zcentrifugujte (5min). Krevní plasmu odlejte a buňky promyjte fyziologickým roztokem. Opět zcentrifugujte. K sedimentovaným buňkám přidejte 1 ml destilované vody a intenzivně protřepejte a zcentrifugujte.

Do dvou zábrusných zkumavek se 2 ml vody pipetujte vždy 250 μl supernatantu. První poslouží jako HbO_2 , z druhé připravíte HbCO .

B. Příprava karboxylhemoglobinu

COHb připravte těsně před měřením spekter.

CO se připraví rozkladem kys. mravenčí kyselinou sírovou. Do odsávací nádoby nalejte 30 ml kys. mravenčí, opatrně připusťte 50 ml konc. kys. sírové, případně opatrně krouživým pohybem promíchejte. Vyvíjejícím se plynem opatrně probublávejte jednu ze zkumavek. Pozorujte ztmavnutí hemolyzované krve.

Ostatní formy hemoglobinu

K oxidaci hemoglobinu na **metHb** použijete $K_3[Fe(CN)_6]$, k přípravě **deoxyHb** dithioničitan sodný.

C. Měření spekter

Přímo do měřicí kyvety pipetujte 2 ml dest. vody + definované množství hemolyz. krve (cca 200 μl). Jednotlivá spektra proměřte v rozmezí 500 - 600 nm.

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 1. HbO_2 | 4. HbCO |
| 2. + dithioničitan | 5. + dithioničitan |
| 3. + $K_3[Fe(CN)_6]$ + KCN (jed!) | 6. + $K_3[Fe(CN)_6]$ + KCN |

D. Stanovení hemoglobinu

Do zkumavky pipetujte 2 ml roztoku podle van Kampena a Zijlstra (0.2 g/l $K_3[Fe(CN)_6]$, 0.05 g/l KCN, 0.14 g/l KH_2PO_4) přidejte 20 μl krve. Po 10 min. změřte absorbanci při 540 nm proti slepému vzorku.

STANOVENÍ GLUKOSY ZA POUŽITÍ ENZYMOVÉHO ANALYZÁTORU ECA 20

Ke stanovení se používají vzorky krve n. krevního séra ředěné v poměru 1:50 (20 μ l + 1 ml tlumivého roztoku).

Příprava měření:

1. Připravte standardní roztok glukosy (ředění zásobního roztoku 1:50). Do eppendorfky odlijte 1.5 ml a vložte do kruhového stojanu přístroje do fialové pozice (pozice označené čarou resp. fialové jamky jsou určeny pro standardní roztoky).
2. Nařed'te do mikrozkuavek připravené vzorky krevního séra výše uvedeným způsobem a vložte do stojanu za standard. Totéž proved'te s kontrolním sérem Exa. Stanovení proved'te v tripletech.
3. Stanovte koncentraci glukosy ve vlastní kapilární krvi. Připravte si mikrozkuavku s 1 ml tlumivého roztoku. Z kapky krve odpipetujte přímo do skleněné mikropipety 20 μ l krve a dokonale vypláchněte v nachystaném roztoku. Po promíchání vložte do stojanu.

Přístroj uvedete do provozu přepnutím tlačítka ze STAND-BY polohy do polohy +.

Po stabilizaci přístroje se vlastní měření spouští zmáčknutím tlačítka START/STOP.