

Glukometrie I

Doc. MUDr. Petr Schneiderka, CSc.

**Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci
výuky preklinických a klinických předmětů na LF UP a
FZV UP v Olomouci**
Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/15.0313

Úvod

- Stanovení glukózy v biologických tekutinách patří v klinické laboratoři k nejčastějším požadavkům.
- Bývá součástí panelu vstupních vyšetření při hospitalizaci, je požadováno před operacemi, v graviditě a při celé řadě nemocí.
- Stěžejní místo zaujímá glukometrie při diagnostice a dlouhodobém sledování léčby diabetes mellitus.

Úvod

- V historii glukometrie se již dlouhá léta využívalo schopnosti glukózy redukovat vhodné substráty za vzniku barevného produktu, který lze měřit fotometricky.
 - Teprve v poslední třetině minulého století se ve stanovení glukózy začaly uplatňovat enzymové metody, a to nakonec i formou tzv. enzymových elektrod.
 - Referenční metodou pro stanovení glukózy zůstává plynová chromatografie s izotopovou dilucí.
- Moderní metody stanovení glukózy ve vzorcích biologického materiálu jsou dobře automatizovatelné, a to:
 - jak v samostatných (jednoúčelových) glukometrech nebo v kombinaci s několika jinými testy (např. v analyzátoch pH a krevních plynů),
 - tak v komplexních multiparametrových biochemických analyzátoch.

Glukometrie v diagnostice diabetes mellitus

- Stanovení glukózy v plazmě žilní krve nalézá nejširší uplatnění v diabetologii. Přesto se podle nejnovějších doporučení diabetes mellitus (DM) nedignostikuje jen na základě glykémie.
- K diagnostickým účelům DM dnes slouží stanovení glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}).
- Těžištěm užití glukometrie je screening rizika DM a provádění orálního glukózového tolerančního test (OGTT) nebo sestrojení glykemické křivky.

DM a IFG

- Stanovení glukózy se provádí po nejméně 8hodinovém lačnění ve vzorku (plazmy) žilní krve. Výsledná fyziologická hodnota má být nižší než 5,6 mmol/l (Fasting plasma glucose, FPG).
- Při porušené glukózové toleranci (=impaired fasting glucose, IFG) jsou hodnoty v rozmezí 5,6 až 6,9 mmol/l
- Pro diabetes mellitus svědčí hodnoty nad 7 mmol/l.

OGTT

- Orální glukózový toleranční test (OGTT) se provádí vypitím roztoku 75 g glukózy ve 100 ml vody a stanovením glukózy v plazmě žilní krve v čase 0 a po 2 hodinách.
- Fyziologická hodnota OGTT po 2 h má být pod 7,8 mmol/l, při porušené glukózové toleranci se nachází mezi 7,8 a 11 mmol/l a u diabetu nad 11,1 mmol/l.
- Pro diagnostiku gestačního diabetu se vyšetřuje OGTT u těhotných ve 24. až 28. týdnu těhotenství. Rozhodovací limity jsou nalačno do 5,1 mmol/l, po 1 h do 10 mmol/l a po 2 h do 8,5 mmol/l.

Diagnostika diabetes mellitus

- Pro účely diagnostiky a sledování DM se provádí stanovení glykovaného hemoglobinu. Metoda je celosvětově standardizována a má návaznost na referenční metodu nejvyššího metrologického řádu. Výsledky se mají vydávat v jednotkách mmol/mol podle IFCC, existují však i hodnoty v % (tzv. DCCT) s možností vzájemných přepočtů:

$$\text{mmol/mol IFCC} = (\% \text{ DCCT} \times 11) - 24$$

$$\% \text{ DCCT} = (\text{mmol/mol IFCC} \times 0,0915) + 2,15.$$

- Rozhodovací limity pro HbA1c jsou pro diagnózu diabetu ≥ 48 mmol/mol, pro zvýšené riziko diabetu 39-46 mmol/mol a pro kompenzovaný DM ≤ 53 mmol/mol.

Neenzymové metody

- Historické metody pro stanovení glukózy byly založeny na jejích **oxidoredukčních** vlastnostech v alkalickém prostředí:
 - oxidace glukózy kyselinou pikrovou,
 - oxidace hexakynoželezitanem,
 - stanovení přes hydroxymethylfurfural, apod.
- K rozšířeným a běžně používaným chemickým metodám v klinických laboratořích v nedávné minulosti patřila **metoda o-toluidinová**. Glukóza tvoří s o-toluidinem (2-aminotoluenem) v kyselém prostředí ledové kyseliny octové a za teploty varu modrozelený komplex vhodný k fotometrickému stanovení (630 nm).

Neenzymové metody

- Metoda o-toluidinová byla manuální metoda vyžadující předchozí deproteinaci vzorku biologického materiálu a potom zahřívání reakční směsi.
- Z tohoto důvodu a také pro účast agresivních chemikálií nebyla automatizovatelná, a proto se již nepoužívá.
- Moderní metody pro stanovení glukózy jsou založeny na enzymové oxidaci glukózy.

Enzymy používané v glukometrii

- Nejvíce se používají enzymy:
 - glukózadehydrogenáza (GD),
 - dvojice hexokináza (HK) + glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (G-6-PD),
 - a dvojice glukózaoxidáza (GOD) + peroxidáza (POD).
- Při **glukózadehydrogenázové** reakci se glukóza oxiduje za katalýzy GD na kyselinu glukonovou a koenzym NAD^+ přebírá redukční ekvivalenty a přeměňuje se na $\text{NADH} + \text{H}^+$, který se měří fotometricky při 340 nm.

Enzymy používané v glukometrii

- V **hexokinázové** reakci se glukóza nejprve přeměňuje na glukóza-6-fosfát, a ten poskytuje v reakci katalyzované G-6-PD glukonolakton-6-P. Současně se přítomný koenzym NADP^+ redukuje na $\text{NADPH} + \text{H}^+$, který se fotometricky měří opět při 340 nm.
 - Nejvíce se používají enzymy ze skupiny: glukózaoxidáz (GOD) a glukózadehydrogenáz s pyrrolochinolin-chinonovým koenzymem (PQQ-GDH).
- Tyto dvě enzymové rodiny se liší svými redox potenciály, silou vazby mezi apoenzymem a koenzymem, svými kosubstráty, číslem přeměny, Michaelisovou konstantou a selektivitou vůči glukóze.

Enzymy používané v glukometrii

- **Glukózaoxidáza (GOD)** používá jako akceptor elektronů kyslík.
 - Koenzym flavinadenindinukleotid (FAD) je silně vázán k apoenzymu GOD a reaguje s kyslíkem za vzniku peroxidu vodíku. GOD je pro glukózu relativně specifická.
- **PQQ-glukózadehydrogenáza** katalyzuje nejen oxidaci glukózy, ale i dalších sacharidů (např. maltózy).
 - Koenzym PQQ je středně silně vázán k apoenzymu v přítomnosti nadbytku iontů Ca^{2+} , které zároveň tuto vazbu stabilizují. Na rozdíl od FADH_2 není redukovaný koenzym PQQH_2 oxidován kyslíkem.

Enzymy používané v glukometrii

- V poslední době se začíná používat:
 - glukózadehydrogenáza s nikotinamidadenindinukleotidovým koenzymem (NAD-GDH),
 - a glukózadehydrogenáza s flavinadenindinukleotidovým koenzymem (FAD-GDH).
- Tyto enzymy spojují nezávislost na kyslíku PQQ-GDH se substrátovou specifitou GOD, a je pravděpodobné, že budou v budoucnu více používány.

Principy detekce

- Peroxid vodíku jako produkt glukózaoxidázové reakce je možné využít k oxidaci leukobarviva za katalýzy enzymem peroxidázou a barevný produkt stanovit **fotometricky**.
- Častou aplikací je „oxidační kopulace“ 4-aminoantipyrinu s aromatickým aminem nebo substituovaným fenolem.
- Dalšími chromogenními akceptory mohou být o-tolidin, indofenol, o-dianisidin a jiné.
- Fotometrickou detekci lze využít i u glukózadehydrogenázových proužků. V tomto případě jsou elektrony z enzymové reakce přeneseny prostřednictvím mediátoru na redoxní indikátor.

Principy detekce

- Při **elektrochemické** detekci převažuje ampérmetrie, méně se používá coulometrie.
 - Výhodou elektrochemických principů je dosažení vyšší přesnosti (na rozdíl od fotometrie výsledek závisí na velikosti kapky krve), potřeba menšího množství krve a eliminace rizika znečištění měřicí jednotky.
- Stanovení glukózy s elektrochemickou detekcí je založeno na oxidaci redukovaného koenzymu.
- Přenos elektronů na elektrodu je zprostředkován mediátorem. Mediátor je malá molekula schopná existovat v oxidované i redukované formě s redox potenciálem blízkým redox potenciálu koenzymu.

Mediátory

- Mediátor by měl být stabilní a rozpustný ve vodě.
- Používají se mediátory:
 - organické (chinony, chinoidní barviva, deriváty bipyridylu, dihydropolyaziny),
 - anorganické ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) a organokovové (deriváty ferrocenu a komplexy $\text{Os}^{2+/3+}$ nebo $\text{Ru}^{2+/3+}$).
- Nevýhodou použití mediátorů je nižší selektivita, neboť mediátor může přenášet na elektrodu i elektrony z interferujících reakcí.

Elektrody

- Je možné použít:
 - dvě identické elektrody za účelem biampérometrického měření,
 - nebo elektrodu pracovní a elektrodu referenční,
 - nebo tříelektrodové zapojení, obsahující navíc pomocnou elektrodu.
- Další elektrody mohou být přidány za účelem detekce naplnění komůrky (v případě POCT glukometrů) nebo kompenzace hematokritu.
- Referenční elektroda z inertního kovu se vyrábí zpravidla ze stejného materiálu jako pracovní elektroda.



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Videosekvence „Glukometrie I“

- Stanovení glukózy ve vzorcích biologických materiálů je demonstrováno na jednoúčelovém glukózovém analyzátoru SensoStar G (Diasys).
- Jedná se o přístroj pracující na principu glukózaoxidázové reakce s ampérometrickou detekcí.
- Základními částmi přístroje jsou otáčivý karusel pro vzorky, nasávací mechanismus s jehlou, měřicí modul s vyměnitelným glukózovým senzorem, nádobky pro reagentie, promývací roztok a odpad, ovládací panel a termotiskárna.

Videosekvence „Glukometrie I“

- Žádanky s požadavky lékařů na glukometrii se registrují do řídicího počítače glukometru (není zobrazen).
- Práce začíná kalibrací. Kalibrační roztoky se ze zásobních lahviček přenesou do eppendorfských zkumavek a vloží do vyhrazených míst na karuselu.
- Dále si laborantka uspořádá a označí příslušné vzorky sér, močí nebo jiných biologických materiálů podle požadavků na žádankách. Z primárních zkumavek se aliquoty vzorků pipetují do eppendorfských zkumavek, a ty se v určeném pořadí vkládají do karuselu glukometru. Na videu je zobrazen pouze jeden vzorek.

Videosekvence „Glukometrie I“

- Potom se spustí analýza a glukometr postupně nasává jednotlivé kalibrační materiály a po nich vzorky.
- Přístroj provede automatické měření, sestrojí kalibrační závislost a vypočítá hodnoty koncentrací glukózy ve vzorcích.
- Součástí série měření je také měření kontrolních vzorků jako součást vnitřní kontroly kvality.
- Výsledky se mohou tisknout na termotiskárně, jinak jsou odesílány do řídicího software a odtud po schválení do LIS/NIS, kde jsou k dispozici žadatelům.

Doporučená literatura

- **Doležalová V. a kol.:** Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. IDVPZ Brno 1995, ISBN 80-7013-198-5
- **Chromý V. a kol.:** Bioanalytika. Učební text PŘF MU Brno, 2. vydání 2011
- **ČSN EN ISO 15189:2007** Zdravotní laboratoře – Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost.
- **Štern P. a kol.:** Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Karolinum Praha, 2. vydání 2011. ISBN 978-80-246-1979-8.
- **Balínová P., Matějčková J.:** Metabolismus sacharidů. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů. Dostupné na <http://portal.lf3.cuni.cz>

Doporučená literatura

- Další zdroje:
 - **Doporučení ČSKB** „Diabetes mellitus – laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů“. 2012. Dostupné na <http://www.cskb.cz> v sekci Doporučení
 - **Doporučení ČSKB** „Změna jednotky pro stanovení glykovaného hemoglobinu A1c a rozhodovacích mezí“. Prosinec 2011. Dostupné na <http://www.cskb.cz> v sekci Doporučení.