

## Glukometrie I

### 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.

V historii glukometrie se již dlouhá léta využívalo schopnosti glukózy redukovat vhodné substráty za vzniku barevného produktu. Teprve v poslední čtvrtině minulého století se při rutinním stanovení glukózy v biologickém materiálu začaly uplatňovat enzymové metody, a to nejnověji také formou tzv. enzymových elektrod.

Stanovení glukózy ve vzorcích biologického materiálu je dobře automatizovatelné jak v samostatných (jednoučelových) glukometrech nebo v kombinaci s několika jinými testy (např. v analyzátoch pH a krevních plynů), tak v komplexních multiparametrových biochemických analyzátoch. Referenční metodou pro stanovení glukózy zůstává plynová chromatografie s izotopovou dilucí.

### Glukometrie v diagnostice diabetes mellitus

Stanovení glukózy v plazmě žilní krve nalézá nejširší uplatnění v diabetologii. Přesto podle nejnovějších doporučení se podle něj diabetes mellitus (DM) nediodagnostikuje. K diagnostickým účelům DM dnes slouží stanovení glykovaného hemoglobinu (HbA<sub>1c</sub>). Těžištěm glukometrie je screening rizika DM a provádění orálního glukózového tolerančního test (OGTT).

**Stanovení glukózy** se provádí po nejméně 8hodinové 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 a pro diabetes mellitus svědčí hodnoty nad 7 mmol/l.

**Orální glukózový toleranční test** se provádí se zátěží 75 g glukózy, tj. podáním roztoku glukózy ve 100 ml vody a stanovením glukózy v plazmě žilní krve před podáním (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 a s odběry krve v čase 0, 1 h a 2 h. Rozhodovací limity jsou na lačno do 5,1 mmol/l, po 1 h do 10 mmol/l a po 2 h do 8,5 mmol/l.

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 HbA<sub>1c</sub> jsou pro zvýšené riziko diabetu 39-46 mmol/mol, pro diagnózu diabetu  $\geq 48$  mmol/mol a pro kompenzovaný DM  $\leq 53$  mmol/mol.

### Neenzymové metody

Historické metody pro stanovení glukózy byly založeny na jejich 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). Šlo o manuální metodu 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 rutinní stanovení glukózy v klinických laboratořích jsou založeny na enzymové oxidaci glukózy.

### Enzymy používané v glukometrii

Používají se 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  $\text{NAD}^+$  přebírá redukční ekvivalenty a přeměňuje se na  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , který se měří fotometricky při 340 nm.

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  $\text{NADP}^+$  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.

**Glukózaoxidáza** používá jako akceptor elektronů kyslík. Koenzym flavinadenin dinukleotid (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  $\text{Ca}^{2+}$ , které zároveň tuto vazbu stabilizují. Na rozdíl od  $\text{FADH}_2$  není redukovaný koenzym  $\text{PQQH}_2$  oxidován kyslíkem.

V poslední době se začínají používat glukózadehydrogenáza s nikotinamidadenin dinukleotidovým koenzymem (NAD-GDH) a glukózadehydrogenáza s flavinadenin dinukleotidovým koenzymem (FAD-GDH). Tyto enzymy spojují nezávislost na kyslíku PQQ-GDH se substrátovou specificitou 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-aminoantipyridinu 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.

Při **elektrochemické** detekci převažuje ampérometrie, méně se používá coulometrie. Výhodou elektrochemických principů je dosažení vyšší přesnosti (na rozdíl od fotometrie výsledek nezávisí 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. Měl by 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.

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.

### 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 glukózooxidázové reakce s ampérometrickou detekcí.

Základními částmi přístroje jsou otáčivý karusel pro vzorky, nasávací mechanismus s jehlou, měřicí modul s vyměnitelným glukózovým senzorem, nádoby pro reagenty, promývací roztok a odpad, ovládací panel a termotiskárna.

Žádanky s požadavky lékařů na glukometrii se registrují do řídicího počítače glukometru (není zobrazen).

Práce začíná kalibrací. Kalibrační roztoky se ze zásobních lahvíček 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 žádkách. 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.

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. ISBN 978-80-904539-3-7

**ČSN EN ISO 15189:2007** Zdravotnické 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>

**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.