

2. Stanovení obsahu glukosy v kapilární krvi

Teoretická část: detekce glukosy a její význam.

Praktická část: K určení obsahu krevního cukru bude využito automatizované analýzy a senzorového glukometru. Bude sledován efekt požití glukosy na změnu její hladiny v krvi – glukosový toleranční test.

I. ÚVOD

1. Glukosa

Glukosa, mimo chemii podle PČP glukóza (z řec. γλυκός, tj. glykys, česky sladký nebo γλευκος, gleukos, česky mošt, sladké víno), v běžné řeči označovaná jako hroznový cukr nebo krevní cukr, je jedním z monosacharidů ze skupiny aldohexos. V chemických vzorcích oligosacharidů a polysacharidů se značí symbolem Glc. V čistém stavu je glukosa bílá krystalická látka sladké chuti.

1.1 Výroba

D-glukosa se může připravit krystalizací z rostlinných šťáv, zejména z hroznů vinné révy, ale hlavní metodou její výroby je kyselá nebo enzymatická hydrolýza rostlinného škrobu, v Česku především bramborového.

1.2 Chemické vlastnosti

Glukosa existuje ve dvou enantiomerech a to jako D-glukosa (vyskytující se v přírodě), nazývaná též dextrosa a její zrcadlový obraz, L-glukosa. Ty se svými chemickými a fyzikálními vlastnostmi neliší, s výjimkou toho, že jejich vodný roztok stáčí rovinu polarizovaného světla opačným směrem. V živých organismech jsou však nezaměnitelné.

Vzhledem k přítomnosti aldehydické skupiny patří glukosa k redukujícím sacharidům, tj. např. redukuje soli dvojmocné mědi na jednomocné, čehož se v minulosti užívalo ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení cukru v roztoku (napří v moči). Přitom se aldehydická skupina D-glukosy se mění na karboxylovou a vzniká kyselina D-glukonová. Při použití silnějších oxidačních činidel, jako např. kyseliny dusičné se oxiduje též primární alkoholická skupina na opačném konci molekuly též na karboxylovou skupinu za vzniku kyseliny D-glukarové. Zoxiduje-li se pouze primární alkoholická skupina na posledním uhlíku (s lokačním číslem 6), vzniká kyselina D-glukuronová.

Redukcí glukosy např. hydrogenací vodíkem za přítomnosti katalyzátorů se naopak redukuje aldehydická skupina na primární alkoholickou skupinu a vzniká D-glucitol, známější pod názvem sorbitol (sorbit), používaný jako umělé sladidlo pro diabetiky.

V roztoku přechází glukosa do cyklické hemiacetalové formy s šestičlenným kruhem (pyranosa), která v rovnovážném stavu za laboratorní teploty 20 °C obsahuje dva anomery, lišící se orientací hemiacetalového hydroxyly: 36 % α -glukopyranosy a 64 % β -glukopyranosy. Tyto anomery jsou v dynamické rovnováze a procesem mutarotace (viz předchozí reakční schema) přecházejí s poločasem řádu hodin jeden v druhý. V obou případech prostorové uspořádání šestičlenného heterocyklu odpovídá židličkové konformaci (Z-forma). Čisté anomery v pevné fázi můžeme získat krystalizací za určitých podmínek. Při krystalizaci z methanolu se vytvářejí krystaly α -D-glukopyranosy, zatím při krystalizaci z kyseliny octové krystaly β -D-glukopyranosy. Při krystalizaci z vodného roztoku obvykle dostáváme monohydrát D-glukosy. V zelených rostlinách vzniká procesem fotosyntézy z oxidu uhličitého a vody za přítomnosti chlorofylu a dodávky energie ve formě světelných kvant, přičemž vzniká kyslík. Přesně opačným procesem je proces, kterým organismy rostlin a živočichů odbourávají („spalují“) D-glukosu na původní látky a získávají tak potřebnou energii.

1.3 Výskyt v přírodě

Čistá D-glukosa se nachází v rostlinách jako jeden z produktů fotosyntézy a představuje pro rostliny zásobu energie. Hromadí se především v plodech. Kromě toho je podjednotkou řady

přírodních oligosacharidů, např. maltosy, sacharosy, galaktosy aj. a polysacharidů, např. škrobu nebo glykogenu. Je také součástí mnoha heteroglykosidů, vyskytujících se v rostlinách. Je také přítomna v krvi a lymfě živočichů, i v některých živočišných produktech, zejména v medu.

1.4 Fyziologický význam

D-Glukosa je pro existenci našeho organismu nezbytná. Je to nejrychlejší a nejzákladnější zdroj energie pro lidské tělo, obzvláště při sportu nebo jiné pohybové aktivitě; glukosa je *de facto* lék na hypoglykémii. Pro některé lidské orgány, zejména pro mozek a červené krvinky, je glukosa zcela nezbytná. Je to jejich jediný zdroj energie, bez kterého se neobejdou. Tyto tkáně spotřebují za 24 hodin přibližně 150 g glukosy. To je tedy minimum, které musí zdravý člověk (ale i diabetik) přijmout, aby zabránil rozvoji katabolismu (tj. rozkládání složitějších látek na látky jednodušší) - získávání glukosy glukoneogenezí nebo ketogenezí (získávání energie za rozkladu mastných kyselin; při tomto ději vznikají jako odpadní látky ketolátky, v první řadě aceton). Při poklesu hladiny glukosy (hypoglykémii) se ve žlázách s vnitřní sekrecí (pankreatu a nadledvinkách) začnou ihned uvolňovat kontraregulační hormony (glukagon a adrenalin), které mobilizují její tvorbu ze zásobního glykogenu (obsaženého převážně v játrech a ve svalstvu) procesem glykogenolýzy. Organismus nemá schopnost vytvořit glukosu z tuků vyjma velmi malého množství, které vzniká z glycerolu. Jako energetický zdroj je glukosa využívána i v umělé výživě (infuze) a její roztoky se podávají do žíly k zavodnění nemocných nebo jako nosiče pro jiné léky. Kaloricky je glukosa stejně vydatná jako cukr řepný, má však nižší sladivost, přibližně o 20 %. Z biochemického hlediska je aktivní formou D-glukosy D-glukosa-fosfát, vznikající z ní působením adenosin trifosfátu (ATP). Koncentrace (hladina) D-glukosy v krvi se nazývá glykemie.

Za běžných fyziologických podmínek získává organismus glukosu:

- a) přísunem z vnějšího prostředí – potravou, ve formě buď samotné glukosy, či z disacharidů (sacharosa) popřípadě polysacharidů (škrob);

- b) z vlastních zásob – glykogenu, který je uložen zejména v játrech, ale i ve svalstvu. Tyto zásoby jsou omezené, činí od 150 do 400 g, podle situace, ve které se organismus nalézá;
- c) glukoneogenezi z aminokyselin – tento zdroj je sice organismu k dispozici, ale je velmi nevýhodný, protože bílkoviny jsou v organismu jako strukturální látky, které mají svou pevně stanovenou funkci, a organismus má velmi malé množství bílkovin, které sloužily pouze jako zásobní látky.

2. Stanovení glukózy u diabetiku

V oblasti klinické biochemické analýzy zůstává stále středem zájmu měření hladiny glukózy u diabetiku. *Diabetes mellitus* (cukrovka) a s ním spojené komplikace tvoří v dnešní době velký sociální problém. Kromě běžných poruch souvisejících s diabetem, jako je hyperglykemie, metabolická acidóza a glykosurie, se u diabetiku vyskytují i další komplikace, které výrazně ovlivňují kvalitu života pacientu. *Diabetes mellitus* je klinicky definován jako chronické, endokrinní a metabolické onemocnění, vznikající v důsledku nedostatečného působení inzulínu. Existují dva typy tohoto onemocnění. 1. typ neboli inzulín-dependentní *diabetes mellitus* (IDDM, četnost 3 až 7 případů na tisíc osob) je charakterizován sníženou nebo prakticky chybící produkcí inzulínu, takže pacienti ho musí denně přijímat v injekčních dávkách. 2. typ je inzulín-independentní *diabetes mellitus* (NIDDM), pacienti na vlastní nebo injekčně podaný inzulín nereagují (rezistence). Vznik a vývoj komplikací při tomto onemocnění je velmi těsně spjat s porušenou regulací hladiny krevní glukózy. Za normálních okolností je koncentrace glukózy v krvi udržována mezi 4.4 a 6.6 mM pomocí zpětné vazby - nárůst koncentrace glukózy po jídle stimuluje rychlé uvolnění inzulínu, který umožní vstup glukózy dovnitř buněk a současně zabrání její tvorbě v játrech [1].

Tato regulace je však u diabetiku porušena a musí se docílit vnějším podáváním inzulínu. Dávkování však vyžaduje znalost aktuální hladiny glukózy, takže pacienti jsou nuceni několikrát denně. Denní průběh hladin krevní glukózy sami měří glykemií. A právě zde se velmi dobře uplatnily elektrochemické biosensory. Přenosné osobní glukometry představují podstatný podíl z

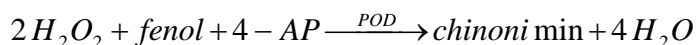
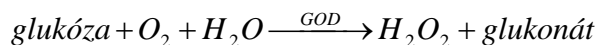
celkového počtu analýz glukózy. První osobní glukometr na bázi výměnného elektrochemického biosensoru představila firma MediSense. Distribuoval se pod názvem ExacTech a měl velikost psacího pera do kterého se zasunovaly měřicí pásky na jedno použití, další verze Companion má formát karty. Nyní spadá MediSense do skupiny Abbott Laboratories a současný její glukometr je distribuován pod názvem Precision QID. Oproti předchozím verzím potřebuje nyní pro analýzu pouze 5 mikrolitrů krve, takže pacient je méně zatěžován. Na tomto lukrativním trhu jsou samozřejmě zastoupeny také glukometry dalších firem. Elite (pro analýzu stačí pouze 3 mikrolitry krve) vyrábí japonské firmy Matsushita a Kyoto Daiichi Kagaku, distribuuje ho také Bayer. Accu-Chek Advantage (Boehringer Mannheim) na rozdíl od ostatních nevyužívá k výrobě páskových biosensoru síťotisk, ale originální vícevrstvou laminátovou technologii. Mimo to se používají také replektometrické systémy Encore (Bayer), One Touch (existuje ve verzích Basic a Profile, vyrábí firma LifeScan patřící pod Johnson & Johnson), Accu-Chek (verze Instant a Easy, Boehringer). Hlavním cílem však zůstává implantovatelný glukózový biosensor pro měření *in vivo*, který by přímo řídil pumpu dávkující kontinuálně inzulin podle okamžité potřeby pacienta. Tyto přístroje jsou velmi slibné, nicméně přístroje nevydrží v těle pacienta déle než několik měsíců a dále trpí kolísavou spolehlivostí [1].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3. Spektrofotometrické stanovení glukosy

3.1 Princip

Glukóza je oxidována glukóza-oxidázou na glukonát a peroxid vodíku poskytuje následující rovnice:



3.2 Chemikálie

TRIS pufr pH 7,492mmol/L
 Fenol0,3 mmol/L
 Glukóza-oxidáza15000 U/L
 Peroxidáza1000 U/L
 4-Aminofenazin2,6 mmol/L

3.3 Postup

Vlnová délka: 505 nm (490 – 550 nm)

Teplota: 25/30/37°C

Kyveta: 1 cm

	Blank	Standard	Vzorek
Standard (ul)	-	10	-
Vzorek (ul)	-	-	10
Reagent (ml)	1	1	1

Po promíchání všech složek inkubujeme 10 min při 37°C nebo 30 min při laboratorní teplotě. Barva je stabilní 30 min při pokojové teplotě.

3.4 Výpočet

$$\text{glukóza (mg / dL)} = \frac{\text{vzorek}}{\text{st.}} \times \text{konc. st.}$$

$$\text{mg / dL} \times 0,0555 = \text{mmol / L}$$

3.5 Linearita

Metoda je lineární do 500 mg/dL. Jestliže je koncentrace glukózy větší než 500 mg/dL, zřed'te vzorek na polovinu a výsledek vynásobte dvěma.

Doporučené hodnoty

Sérum: 55 – 110 mg/dL (3,05 – 6.11 mmol/L)

Stanovení neruší

Hemoglobin: 4g/L, Bilirubin: 20 mg/L, Kreatin: 100 mg/L, Galaktóza: 1g/L, EDTA 2g/L