

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**VLIV ANTIGLYKOLYTICKÉHO ČINIDLA NA  
STABILITU KONCENTRACE GLUKÓZY VE VZORCÍCH  
KRVE**

**Gabriela Vávrová**

**Vedoucí bakalářské práce: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

**Konzultant: RNDr. Martin Novák**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2018**

## **Poděkování**

Touto cestou děkuji své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za její cenné rady, připomínky, trpělivost a odborný dohled.

Mé poděkování patří i RNDr. Martinu Novákovi, který je konzultantem mé bakalářské práce a zároveň vedoucím Laboratoře klinické biochemie a hematologie LAB KM s.r.o., kde mi bylo umožněno provést měření hodnot glukózy v krvi. Děkuji i zaměstnancům laboratoře za ochotu, rady, poskytnutí materiálů a přístrojů pro tuto práci.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 5. 5. 2018

Gabriela Vávrová

# OBSAH

<b>Obsah</b> .....	<b>4</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>7</b>
2.1 DEFINICE SACHARIDŮ .....	7
2.2 DEFINICE GLUKÓZY .....	8
2.3 METABOLISMUS GLUKÓZY .....	9
2.4 PORUCHY METABOLISMU .....	10
2.5 GLYKOLÝZA .....	12
2.5.1 Jednotlivé kroky glykolýzy .....	13
2.6 INHIBITORY GLYKOLÝZY .....	20
<b>3 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>22</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>23</b>
4.1 PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A POMŮCKY .....	23
4.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ KRVE PRO VLASTNÍ MĚŘENÍ .....	24
4.3 POSTUP A PRINCIP MĚŘENÍ NA ANALYZÁTORU BIOSEN C- LINE .....	24
4.3.1 Postup práce při měření hladin glukózy .....	24
4.3.2 Princip měření .....	24
4.4 POSTUP A PRINCIP MĚŘENÍ NA ANALYZÁTORU COBAS 6000 .....	25
4.4.1 Postup práce při měření hladin glukózy .....	25
4.4.2 Princip měření .....	25
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>27</b>
5.1 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ NAMĚŘENÝCH NA ANALYZÁTORU COBAS 6000 .....	29

5.2	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ NAMĚŘENÝCH NA ANALYZÁTORU BIOSEN C-LINE .....	31
5.3	POROVNÁNÍ ANALYZÁTORŮ DLE NAMĚŘENÝCH HODNOT .....	33
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>41</b>

# 1 ÚVOD

Se socioekonomickým růstem a kulturními změnami se v posledních letech změnil životní styl obyvatelstva po celém světě. Procento případů s abnormální hladinou glukózy se tak výrazně zvýšilo. Důvodem vysoké hladiny glukózy v krvi je především nadváha a obezita, které patří k alarmujícím a neustále se zvyšujícím problémům 21. století a to mezi všemi věkovými skupinami. Jedním z hlavních faktorů zvyšujících tyto problémy jsou jednoduché sacharidy, které se běžně vyskytují v populárních sladkých nápojích, a nedostatek fyzické aktivity (Pinhas-Hamiel et al., 1996; Skop-Lewandowska et al., 2017).

Vyšetření krve na hladinu glukózy je jedním z nejčastěji prováděných laboratorních testů používaných hlavně pro diagnostiku a monitorování léčby diabetu neboli cukrovky. Hladinu glukózy v krvi je nutno kontrolovat u obézních pacientů, u pacientů starších 45 let, u pacientů s hypertenzí, u pacientů s výskytem diabetu v rodinné anamnéze, u gravidních žen a u pacientů s příznaky typickými pro zvýšenou hladinu cukru v krvi jako je zvýšené močení, žízeň a hlad (NIDDK, 2016).

Poruchy metabolismu glukózy se však objevují také u pacientů vážně nemocných netrpících cukrovkou. U takto kritických onemocnění jako je multiorgánové poranění, sepsy, popáleniny či pooperační stav dochází ke zvýšené sekreci stresových hormonů a zánětlivých cytokinů, což vede k inzulinové rezistenci a hyperglykémii (Fahy et al., 2009).

Je proto důležité kontrolovat hladinu glykémie a udržovat ji v cílovém rozsahu. Testy glukózy v krvi jsou prováděny za použití různých specializovaných analyzátorů. V krvi fyziologicky dochází k rozpadu glukózy, proto je nezbytné odebrat vzorky krve pro vyšetření do zkumavek či kapilár s antiglykolytickým činidlem, aby se zabránilo procesu glykolýzy a výsledky tak nenabývaly falešně nízkých hodnot.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 DEFINICE SACHARIDŮ

Sacharidy (lat. saccharum = cukry) definujeme jako deriváty aldehydů, ketonů nebo polyhydroxyalkoholů. Sacharidy jsou jedním z hlavních druhů živin a mají nezastupitelnou strukturální i metabolickou roli. Poskytují důležitý zdroj energie pro lidský organismus a jsou komponentami buněčných membrán. Mimo jiné určují také specifickou determinantu na povrchu buněk (Novák, 2002).

*Sacharidy dělíme na:*

- a) Monosacharidy, které nelze hydrolyzovat na jednodušší sacharidy. Dělí se podle počtu atomů uhlíku na triózy, tetriózy, pentózy, hexózy nebo heptózy, nebo podle přítomnosti aldehydové či ketonové funkční skupiny na aldózy a ketózy. Mezi nejdůležitější zástupce monosacharidů řadíme D-ribózu, D-glukózu, D-fruktózu a D-galaktózu.
- b) Disacharidy vznikají spojením hydroxylových skupin dvou molekul monosacharidů pomocí glykosidické vazby. Tato vazba může být hydrolyzována za vzniku dvou stejných či odlišných monosacharidů. Řadíme sem maltózu, která vzniká spojením molekuly D-fruktózy a D-glukózy, dále laktózu, která vzniká spojením molekuly D-galaktózy a D-glukózy, či sacharózu, která vzniká spojením dvou molekul D-glukózy.
- c) Oligosacharidy jsou sloučeniny 3-10 molekul monosacharidů. Většina z nich není štěpitelná lidskými enzymy.
- d) Polysacharidy jsou sloučeniny více jak 10 monosacharidových jednotek. Do této skupiny sacharidů řadíme škroby a dextriny. Mezi neškrobové polysacharidy obsažené v potravinách patří celulóza, což je polymer glukózy, nebo polymer fruktózy zvaný inulin (Murray et al., 2009).

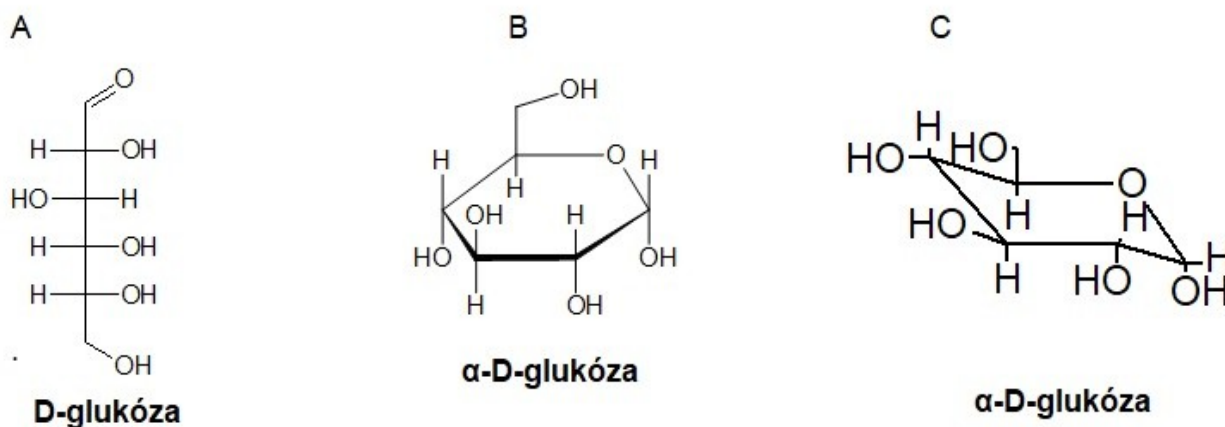
## 2.2 DEFINICE GLUKÓZY

Glukóza (z řeckého slova glyky = sladký) se řadí mezi aldohexózy a je základní složkou mnoha oligosacharidů a polysacharidů. Je označována za nejdůležitější sacharid. Živočiškové mohou glukózu získávat syntézou z aminokyselin, ve většině případů je však glukóza přijímána ve formě rostlinné potravy (Murray et al., 2012).

Je rychlým a hlavním zdrojem energie pro organismus. Pro svou lehkou vstřebatelnost se glukóza využívá v lékařství jako součást nutriční výživy.

Tato bílá, sladká a ve vodě dobře rozpustná látka označovaná také jako hroznový cukr je obsažena v ovoci, včelím medu i v krvi. Množství glukózy v krvi je udáváno hladinou glykémie, která se u zdravého člověka pohybuje v rozmezí 3,3 – 5,6 mmol/l. Po jídle se hladina glukózy v krvi může zvýšit až na 7,8 mmol/l. Při glykémii 10 mmol/l je překročen renální práh pro glukózu. Glukóza tudíž není v proximálních tubulech ledvin resorbována zpět do krve, ale vylučuje se močí ven z těla (Beránek et al., 2013, Dostál, 2003).

Molekulární vzorec glukózy je  $C_6H_{12}O_6$ . Její struktura však může být vyjádřena třemi způsoby (Obr. 1). Na obrázku 1A je znázorněna lineární řetězcová struktura molekuly glukózy. Na obrázku 1B je znázorněna projekce molekuly glukózy dle Hawortha. Obrázek 1C znázorňuje židličkovou formu (Murray et al., 2009).



Obrázek 1. Vzorce glukózy



## 2.3 METABOLISMUS GLUKÓZY

Centrální postavení v metabolismu sacharidů zaujímá D-glukóza, která je nejrozšířenějším a zároveň fyziologicky nejvýznamnějším rozpustným sacharidem, který může významně ovlivnit vnitřní prostředí organismu i funkci orgánů (Ledvina, 2009).

Glukózu přijímáme v potravě. Trávení sacharidů začíná v ústech pomocí slinné  $\alpha$ -amylázy. Tento enzym má optimální účinek při pH 6,7 a je označován také jako ptyalin. Po promísení potravy s kyselou žaludeční šťávou se tento enzym inaktivuje. Škroby jsou poté štěpeny až ve střevě pomocí pankreatické  $\alpha$ -amylázy. Účinkem disacharidáz v glykokalyx enterocytů se disacharidy hydrolyzují na monosacharidy, které jsou následně v duodenu a jejunu resorbovány (Holeček, 2006).

Podstatným krokem v metabolismu glukózy je usnadněný transport přes plazmatickou membránu. Důležitými komponentami membrány jsou přenašeče neboli transportéry glukózy. Jsou to glykoproteiny, které jsou ve tkáních distribuovány různě a liší se svou afinitou ke glukóze. Vysokou afinitu mají transportéry GluT-1, GluT-3 a GluT-5. GluT-1 a GluT-3 jsou lokalizovány zejména na inzulin-dependentních buňkách a buňkách citlivých na glukózu jako jsou erytrocyty a mozkové buňky. Tyto transportéry umožní vstup glukózy do buňky i při nízkých hladinách glukózy. Střední afinitou se vyznačují přenašeče GluT-4, které se vyskytují na buňkách svalových a tukových, které jsou závislé na inzulinu. Nejmenší afinitu ke glukóze vykazují přenašeče GluT-2, které se vyskytují na buňkách účastnících se regulace glukózy v krvi (renální tubuly, sliznice tenkého střeva,  $\beta$ -buňky pankreatu a jaterní buňky) a zajistí vstup glukózy do buněk při zvýšené hladině krevní glukózy nezávisle na hladině inzulinu (Novák, 2002).

Důležitou roli v homeostáze glukózy hrají regulační systémy, a to především hormony pankreatu - inzulin a glukagon.

Inzulin je polypeptidický hormon produkovaný  $\beta$ -buňkami pankreatu a je vylučován při vzestupu hladiny glukózy v krvi. Při vstupu do krevního řečiště inzulin zajistí průnik glukózy do buněk, kde dochází k její přeměně na energii pro tělo. Inzulin také způsobuje, že játra a svaly cukr ukládají a nedochází tak ke vzniku nového cukru v játrech. V důsledku toho klesá hladina cukru v krvi.

Jakmile se hladina cukru v krvi sníží, pankreas uvolní do krevního řečiště glukagon, který je produkován  $\alpha$ -buňkami pankreatu. Hlavním účinkem tohoto enzymu je štěpení glykogenu na jednotlivé molekuly glukózy (glykogenolýza) a tvorba glukózy z glukoplastických aminokyselin serinu, alaninu a glycinu (glukoneogeneze). Pokud hladina cukru v krvi vzroste, uvolňování glukagonu se zastaví (Beránek et al., 2013).

## 2.4 PORUCHY METABOLISMU

Metabolismus sacharidů může být postižen buď v rámci vrozené poruchy enzymů účastnících se na látkové přeměně sacharidů, nebo při onemocněních získaných v průběhu života, při kterých hrají velkou roli i faktory zevního prostředí.

Pokud organismus není schopen udržet homeostázu příslušného sacharidu ve fyziologickém rozmezí, projeví se to buď nedostatkem, nebo naopak nadměrným hromaděním daného sacharidu v extracelulárním či intracelulárním prostoru.

Je-li poruchou metabolismu postižena glukóza, dojde k ovlivnění metabolických drah i ostatních základních živin jako jsou lipidy či proteiny.

Glukóza je důležitým energetickým zdrojem pro zajištění správné funkce orgánů či tkání. Její nedostatek vede k tomu, že orgány získávají energii z jiných zdrojů, např. z volných mastných kyselin.

Jelikož sacharidy nejsou inertní sloučeniny, nadměrné hromadění glukózy způsobí proces oxidace, což vede ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku, a tedy i ke zvýšenému oxidačnímu stresu. Dlouhodobý oxidační stres může způsobit nejenom funkční, ale i morfologické změny orgánů, které následně vedou k orgánovému selhání (Zima, 2013).

Nadbytek glukózy v krvi je označován pojmem hyperglykémie. Ke zvýšené hladině glukózy v krvi přispívá celá řada faktorů jako pankreatitida, dysfunkce štítné žlázy, selhávání ledvin či jaterní choroby. Mezi nejčastější příčinu hyperglykémie však řadíme diabetes mellitus, vznikající z nedostatečné sekrece či účinku inzulínu (Beránek et al., 2013).

Diabetes mellitus 1. typu, označovaný také jako inzulin dependentní diabetes mellitus, je geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění. Jedinci s predispozicí vzniku tohoto typu diabetu jsou nosiči rizikových alel DR/DQ HLA systému, které souvisí s imunitními ději vedoucími k destrukci  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, z čehož vyplývá, že produkce inzulinu těmito buňkami je výrazně snížena. Naopak hladina glukagonu v krvi je zvýšena.

U diabetu mellitu 2. typu, označovaného také jako non-inzulin dependentní diabetes mellitus, je hladina inzulinu v krvi normální nebo dokonce zvýšená, ale buňky jsou vůči působení inzulinu rezistentní. Toto onemocnění je velmi závažné, jelikož se s ním pojí celá řada komplikací. Mezi akutní komplikace diabetu řadíme hyperglykemické kóma s ketoacidózou, hypoglykemické kóma či laktátovou acidózu. K chronickým komplikacím diabetu patří změny metabolismu cukrů, glykace bílkovin, diabetická nefropatie, retinopatie, neuropatie, mykotické infekce, ateroskleróza, poruchy koagulace, diabetická noha a spousta dalších (Beránek et al., 2013; Thomas, 1998).

Zvýšenou hladinu glukózy v krvi mají také těhotné ženy. Pokud se hyperglykémie vyskytuje v prvním trimestru těhotenství, může způsobit závažné vrozené poruchy plodu označované jako diabetická embryopatie. Tento typ diabetu se označuje jako gestační a jedná se ve většině případů pouze o přechodnou formu. Po porodu se hladina glukózy vrací zpět na fyziologické hodnoty.

Hyperglykémie je také přítomna u všech stresových situací, kdy dochází k vyplavení katecholaminů a glukokortikoidů, tedy hormonů, které se podílí na zvyšování hladin glukózy v krvi. K těmto situacím patří úrazy, pooperační stavy, šok, infarkt myokardu či cévní mozková příhoda (Racek, 2006).

Nedostatek glukózy v krvi je označován pojmem hypoglykémie, která se vyskytuje méně často. K nízkým hladinám glukózy přispívá inzulinom či hypoglykémie vyvolaná inzulinem (Beránek et al., 2013).

## 2.5 GLYKOLÝZA

Při tomto ději dochází k odbourávání molekuly glukózy na pyruvát a k uvolnění energie ve formě ATP. Tento děj se také nazývá Embden-Mayerhoferova cesta. Veškeré enzymy účastníci se tohoto procesu jsou lokalizovány v cytosolu a nevytvářejí organizované komplexy.

***Glykolýzu můžeme rozdělit na 2 základní fáze:***

- a) Přípravné stádium - v této fázi musí nejdříve dojít k dodání energie formou fosforylace a následnému štěpení na 2 molekuly trióza-fosfátů.
- b) Tvorba ATP - zde dochází k přeměně molekul trióza-fosfátů na pyruvát za uvolnění energie ve formě ATP (Skálová, 2004).

***Dle redoxního stavu tkáně můžeme glykolýzu rozdělit na:***

- a) Anaerobní – za těchto podmínek není umožněna reoxidace molekuly NADH na  $\text{NAD}^+$ . Kumulace NADH tedy inhibuje vstup pyruvátu do citrátového cyklu, proto dochází k redukci pyruvátu na laktát. Tato reakce je katalyzována enzymem laktátdehydrogenázou. Laktát je uvolněn do krevního oběhu a následně zužitkován v řadě tkání. V myokardu je využíván jako zdroj energie, v játrech a ledvinách zase pro opětovnou syntézu glukózy. Pokud organismus nestíhá laktát spotřebovat, stoupá jeho koncentrace v tělních tekutinách a rozvíjí se laktátová acidóza. Anaerobní glykolýza je charakteristická pro erytrocyty, kosterní svalstvo, nádorovou tkáň a fyzickou zátěž. Při anaerobní glykolýze je však čistý zisk pouze 2 moly ATP z 1 molu glukózy.
- b) Aerobní – za těchto podmínek se pyruvát dostává do mitochondrií, kde se procesem oxidativní dekarboxylace přemění na acetylkoenzym A, který je následně v citrátovém cyklu oxidován na molekulu  $\text{CO}_2$ . V mitochondriální matrix vzniká NADH, který je v dýchacím řetězci mitochondrií základním substrátem pro syntézu ATP. Aerobní glykolýza je nejvýznamnějším zdrojem ATP pro celou řadu tkání a nenahraditelným zdrojem ATP pro nervovou tkáň. Celkový zisk je 38 molů ATP na 1 mol glukózy (Holeček, 2006; Murray et al., 2012).

### 2.5.1 Jednotlivé kroky glykolýzy

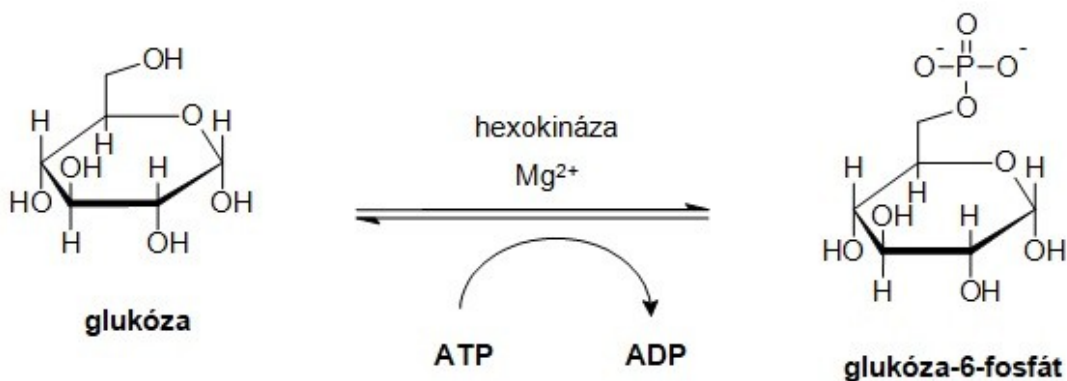
Tento proces se sestává z deseti na sebe navazujících kroků, z nichž každý je katalyzován specifickým enzymem.

a) První krok - spotřeba první molekuly ATP (Obr. 2)

#### Hexokináza

Tento enzym zprostředkuje přenos fosfátové skupiny z molekuly ATP na molekulu glukózy za vzniku glukóza-6-fosfátu, který je důležitou sloučeninou na spojení několika metabolických drah (glykolýzy, glukoneogeneze, pentózafosfátové dráhy, glykogeneze a glykogenolýzy).

Jelikož může být allostericky inhibován produktem reakce (glukóza-6-fosfátem), označuje se za klíčový enzym glykolýzy. Nachází se ve formě izoenzymů v cytosolu každé buňky těla. Jeho vysoká afinita ke glukóze umožní její efektivní zpracování i při nízkých koncentracích.



Obrázek 2. První krok glykolýzy

#### Glukokináza

Jedná se o izoenzym IV obsažený v jaterních buňkách obratlovců. Na rozdíl od hexokinázy se uplatní pouze při vysoké koncentraci glukózy v hepatocytu a není inhibován

molekulou glukóza-6-fosfátu. Aktivita tohoto enzymu se zvyšuje po příjmu vysokosacharidové stravy a je důležitá pro udržování koncentrace glukózy v krvi.

b) Druhý krok - přeměna aldózy na ketózu (Obr. 3)

### Glukózafosfátizomeráza

Tento striktně specifický enzym způsobí, že dojde k přechodnému otevření cyklické molekuly glukóza-6-fosfátu a po izomeraci dojde k uzavření kruhu. Produktem této reakce je fruktóza-6-fosfát.

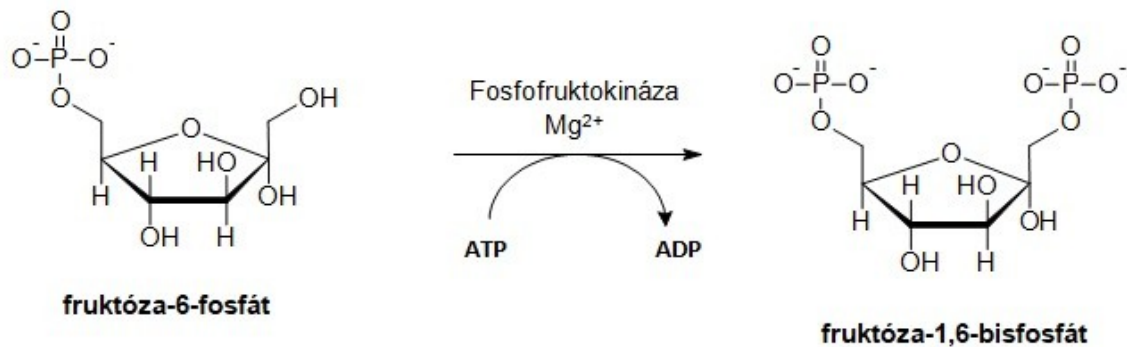


Obrázek 3. Druhý krok glykolýzy

c) Třetí krok - spotřeba druhé molekuly ATP (Obr. 4)

### Fosfofruktokináza

Jedná se o enzym, který odnímá fosfát z molekuly ATP a přenáší jej na OH skupinu uhlíku C<sub>1</sub> molekuly fruktóza-6-fosfátu za vzniku molekuly fruktóza-1,6-bisfosfátu. Tato tetramerní molekula je allostericky inhibována molekulou ATP, citrátem nebo působením H<sup>+</sup> iontů a aktivována molekulou fruktóza-2,6-bisfosfátu. Jelikož fosfofruktokináza reguluje reakční rychlost celé dráhy, jedná se o klíčový enzym glykolýzy.

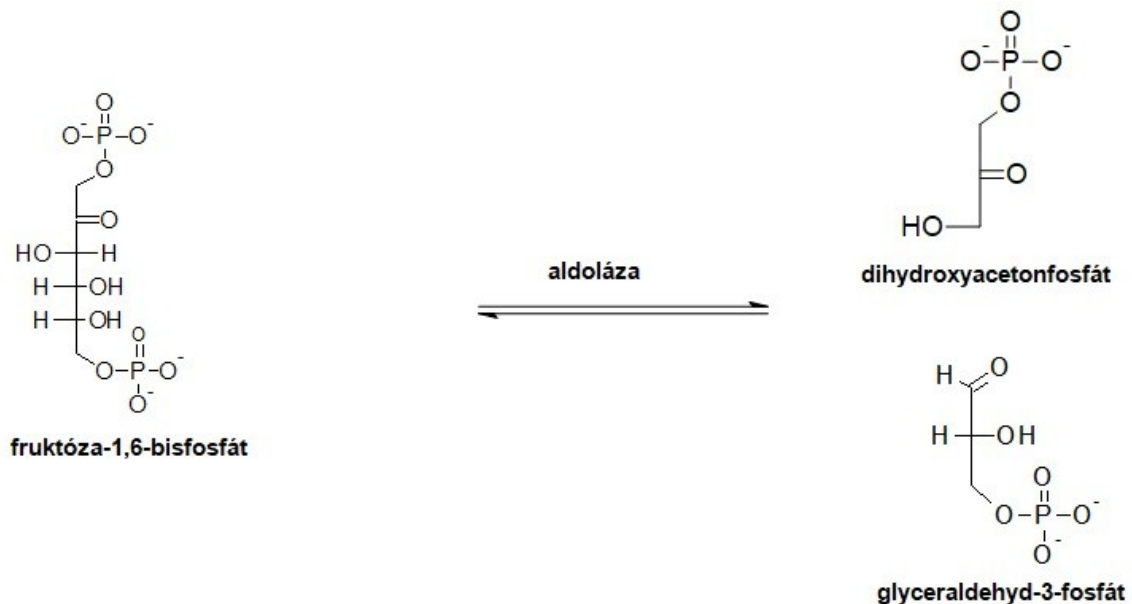


Obrázek 4. Třetí krok glykolýzy

d) Čtvrtý krok - rozštěpení cukerného bisfosfátu (Obr. 5)

#### Aldoláza

Z fosforylované hexózy vznikají působením tohoto enzymu, který je zodpovědný za rozštěpení vazby mezi uhlíky  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$ , dvě triózy – dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát.

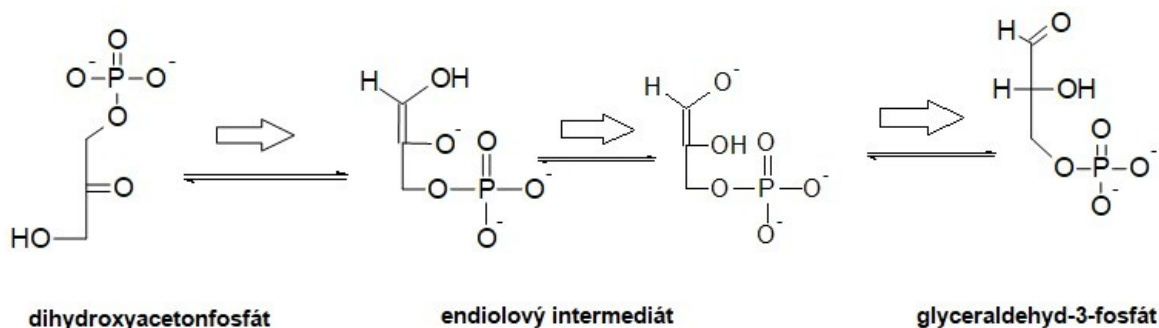


Obrázek 5. Čtvrtý krok glykolýzy

e) Pátý krok - přeměna ketotriózy na aldotriózu (Obr. 6)

### Triózafosfátizomeráza

Pro další kroky glykolýzy je důležitá pouze molekula glycerinaldehyd-3-fosfátu, proto je nezbytné zajistit přeměnu ketotriózy dihydroxyacetonfosfátu na aldotriózu glycerinaldehyd-3-fosfát.



Obrázek 6. Pátý krok glykolýzy

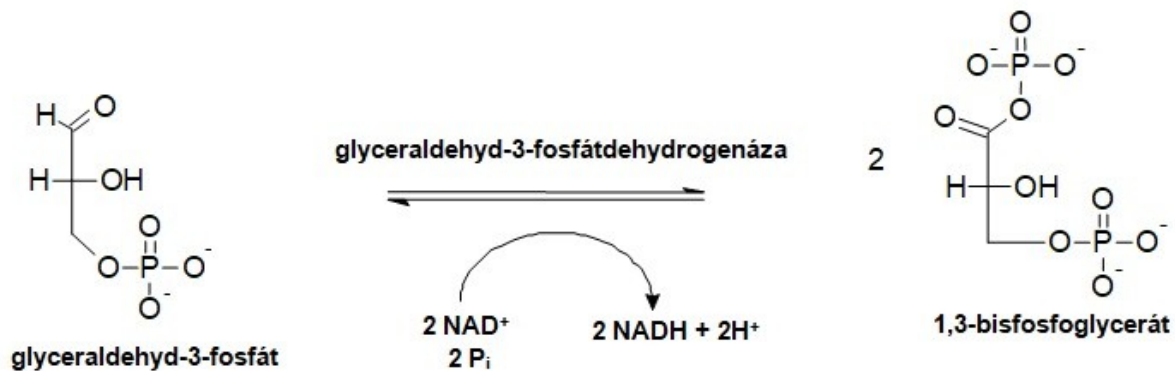
Zde končí přípravné stádium glykolýzy.

f) Šestý krok - tvorba prvního makroerního produktu (Obr. 7)

### Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza

Pomocí tohoto enzymu dochází nejen k oxidaci molekuly glycerinaldehyd-3-fosfátu, při které se uvolní energie potřebná k syntéze acylfosfátu (sloučenina s vysokým potenciálem přenosu fosfátové skupiny s makroerní vazbou v pozici 1), ale i k fosforylaci této molekuly za vzniku molekuly 1,3-bisfosfoglycerátu.



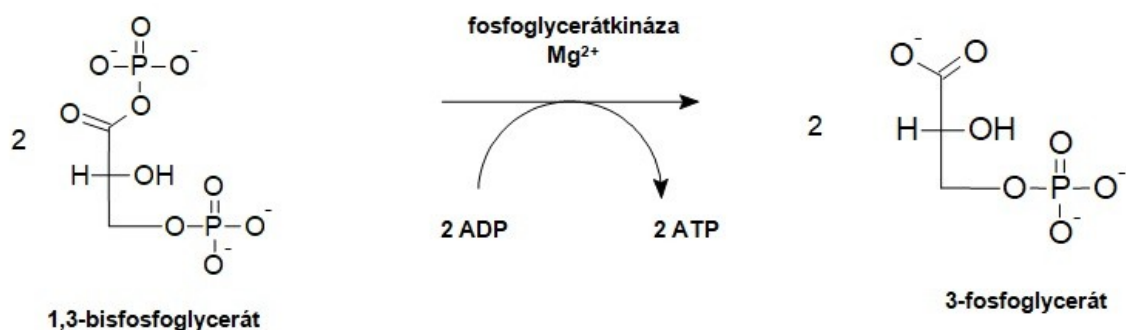


Obrázek 7. Šestý krok glykolýzy

g) Sedmý krok - tvorba první molekuly ATP (Obr. 8)

### Fosfoglycerátkináza

Pomocí tohoto enzymu dochází k uvolnění fosfátu z molekuly 1,3-bisfosfoglycerátu a jeho přenosu na molekulu ADP za následného vzniku molekul ATP a 3-fosfoglycerátu. Tvorba ATP probíhá bez přítomnosti kyslíku, proto je tato reakce označována jako substrátová neboli anaerobní fosforylace.

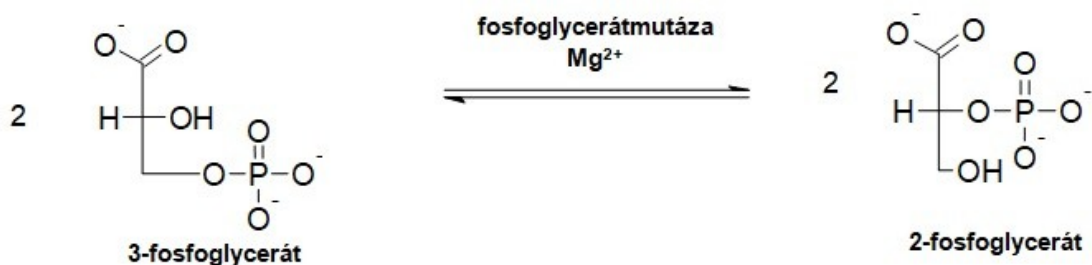


Obrázek 8. Sedmý krok glykolýzy

h) Osmý krok - přenos fosfátové skupiny (Obr. 9)

### Fosfoglycerátmutáza

Enzym katalyzující přenos fosfátové skupiny v molekule 3-fosfoglycerátu z polohy 3 do polohy 2 za vzniku molekuly 2-fosfoglycerátu. Iniciátorem této reakce je 2,3-bisfosfoglycerát.

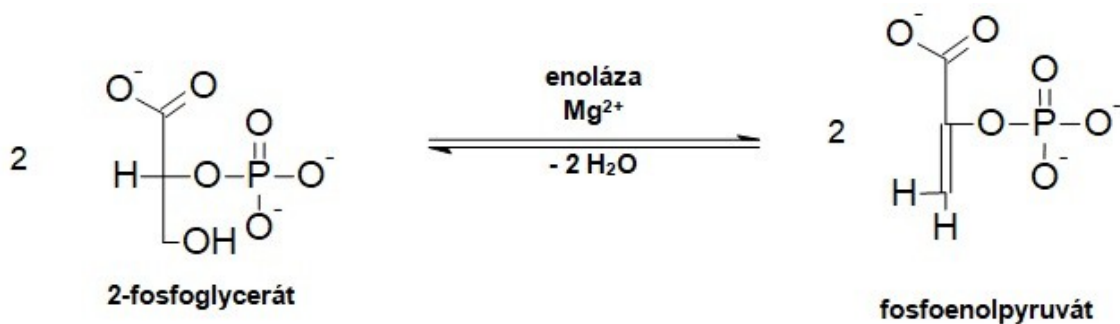


Obrázek 9. Osmý krok glykolýzy

i) Devátý krok - tvorba druhého makroergního produktu (Obr. 10)

### Enoláza

Enzym katalyzující odštěpení molekuly vody v přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů za vzniku nestabilní molekuly fosfoenolpyruvátu s dvojnou vazbou mezi uhlíky a makroergní vazbou v poloze 2. Tento enzym je inhibován  $F^-$  anionty, které vyvazují k reakci nezbytné  $Mg^{2+}$  ionty.

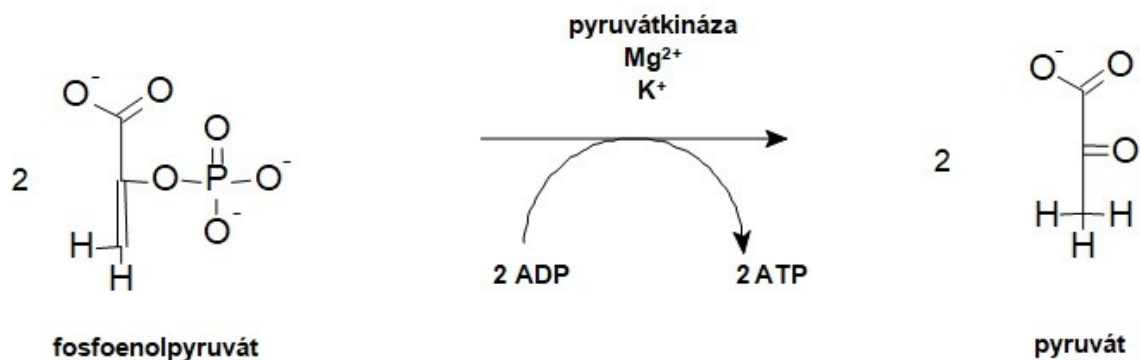


Obrázek 10. Devátý krok glykolýzy

j) Desátý krok - tvorba druhé molekuly ATP (Obr. 11)

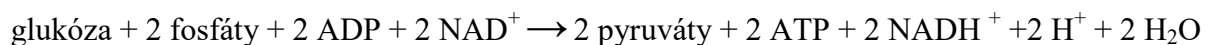
### Pyruvátkináza

Tento enzym katalyzuje přenos fosfátové skupiny z makroergního fosfoenolpyruvátu na molekulu ADP za vzniku molekuly ATP a pyruvátu. Jedná se o substrátovou neboli anaerobní fosforylaci. Jedná se o klíčový enzym glykolýzy, který je inhibován ATP a alaninem.



Obrázek 11. Desátý krok glykolýzy

*Celková energetická bilance glykolýzy je tedy:*



## 2.6 INHIBITORY GLYKOLÝZY

Stabilita glukózy ve vzorku závisí na bakteriální kontaminaci, teplotě skladování a glykolýze. Právě glykolýza snižuje významně koncentraci glukózy ve vzorku odebrané krve.

Preanalytická ztráta glukózy ve vzorcích během prvních 2 hodin po odběru je pravděpodobně větší zdroj chyby, než je analytická chyba v klinických laboratořích. Manipulace s krevními vzorky odebranými pro analýzu glukózy byla v posledních letech velmi málo studována, nicméně existuje několik způsobů, kterými lze zabránit rozpadu glukózy v odebraných vzorcích krve (Bruns et al., 2009).

***Glykolýzu můžeme potlačit několika způsoby:***

- 1) uložením vzorků do ledové tříště
- 2) centrifugací vzorků s minimálním zpožděním v chlazené odstředivce - oddělení plazmy od krevních elementů do 30 minut po odběru (jedním z důvodů je stabilita koncentrace glukózy v séru/plazmě nejméně po dobu 8 hodin, druhým důvodem je, že v plné krvi dochází ke srážení a snižuje se koncentrace glukózy až o 7% za 1 hodinu)
- 3) použitím antiglykolytického přípravku (Dzúrik et al., 1990; Friedecký et al., 2015)

Pro potlačení glykolýzy se zpočátku používala směs fluoridu sodného a EDTA. Jelikož fluoridy deaktivují enzym nacházející se téměř na konci glykolytické metabolické cesty (enolázu), byla inhibice glykolýzy nedostatečná. Proto byla v roce 1988 vyvinuta zlepšená inhibice glykolýzy přidáním citrátu sodného a kyseliny citronové. V odebraném vzorku krve tak dojde ke snížení pH na hodnotu 5,3 – 5,9 a tudíž k deaktivaci pH dependentních enzymů (hexokinázy a fosfofruktokinázy), proto nedochází ke glykolýze ihned po odběru. Účinnou inhibicí glykolýzy způsobí i jodacetát, který inhibuje enzym glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu.

Na trhu je celá řada odběrových zkumavek, které obsahují antikoagulační činidlo (EDTA), látku ke snížení pH (citrát sodný) a inhibitory glykolýzy - fluorid sodný (jehož koncentrace by měla být alespoň 2,5 mg na 1 ml krve, aby došlo k účinné inhibici glykolýzy) a jodacetát. Použitím této kombinace látek získáme po centrifugaci vzorek plazmy s dostatečnou stabilitou koncentrace glukózy (Friedecký et al., 2015).

Pro správné hodnocení glykémie je také nezbytné odebírat krev po předchozím 8 hodinovém lačnění, s vyloučením fyzické námahy a kouření den před odběrem. Je zapotřebí si také uvědomit, že v celé krvi je glykémie nižší než v plazmě/séru a ve venózní krvi je glykémie nižší než v krvi kapilární (Racek, 2006).

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce bylo:

- 1) Prokázat stabilitu koncentrace glukózy (po 4 hodinách po odběru) ve vzorcích krve odebraných do zkumavek s antiglykolytickým činidlem.
- 2) Prokázat pokles koncentrace glukózy (po 4 hodinách po odběru) ve vzorcích krve odebraných do zkumavek bez antiglykolytického činidla.
- 3) Porovnat výsledky naměřené přístroji Biosen C-Line a Cobas 6000.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A POMŮCKY

Přístroje:

- Biosen C-Line - MEDESA
- Cobas 6000 - Roche
- Centrifuga - Eppendorf

Chemikálie:

- Systémový roztok pro analyzátor glukózy Biosen C-Line vyráběný firmou SKALAB s.r.o. (složení: fosfátový pufr, NaF, KCl, stabilizátory a detergenty)
- Reagencie pro stanovení glukózy pomocí přístroje Cobas 6000

Složení – reagencie 1 – pufr,  $Mg^{2+}$ , ATP, NADP, konzervancia, pH 6,0

reagencie 2 – pufr,  $Mg^{2+}$ , hexokináza (kvasinky), konzervancia, pH 8,0, glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (*Escherichia coli*)

Pomůcky:

- Automatické pipety
- Mikrozkuřavky
- Mikrokepy
- Buničina
- Stojany na vzorky
- Gumové rukavice

## 4.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ KRVE PRO VLASTNÍ MĚŘENÍ

Vzorek žilní krve byl odebrán do dvou odběrových zkumavek. První zkumavka obsahovala fluorid sodný pro minimalizaci glykolýzy, K<sub>3</sub>EDTA proti srážení krve a citrát sodný pro dosažení pH 5,7. Druhá odběrová zkumavka neobsahovala ani jednu z výše uvedených látek. Po centrifugaci první odběrové zkumavky se oddělily krevní elementy od plazmy, ve druhé zkumavce došlo k oddělení krevních elementů od séra.

## 4.3 POSTUP A PRINCIP MĚŘENÍ NA ANALYZÁTORU BIOSEN C- LINE

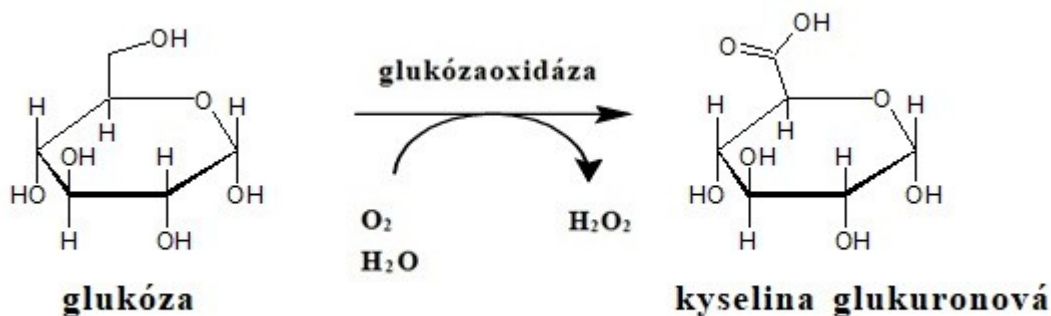
### 4.3.1 *Postup práce při měření hladin glukózy*

10 µl plazmy či séra jsem přepipetovala do plastových mikrozkušavek a pomocí dávkovače jsem přidala 0,5 ml systémového roztoku. Mikrozkušavku jsem uzavřela, důkladně promíchala a vložila do analyzátoru, kde probíhalo vlastní měření. Přístroj Biosen C-Line vydal výsledky měření zhruba po 5 minutách v jednotkách mmol/l.

### 4.3.2 *Princip měření*

Stanovení koncentrace glukózy je založeno na elektrochemickém principu s použitím čipového senzoru. Vzorek z mikrozkušavky je automaticky nasáván přístrojem. Stanovovaný analyt ( $\beta$ -D glukóza) je veden do systému, kde se na čipu analyzátoru nachází na membráně fixované enzymy (glukózaoxidázy), které katalyzují oxidaci glukózy na kyselinu glukuronovou a peroxid vodíku (Obr. 12), jehož následný rozklad je detekován na měřící elektrodě. Výsledný proud je přímo úměrný koncentraci glukózy ve vzorku. Stanovení koncentrace glukózy je založeno na porovnání signálu neznámého vzorku a signálu kalibrátoru o známé koncentraci.





**Obrázek 12. Oxidace glukózy na kyselinu glukuronovou**

V prvním kroku tedy dochází k oxidaci molekuly glukózy na kyselinu glukuronovou. Produktem této reakce je také peroxid vodíku, který se poté rozkládá za uvolnění 2 elektronů na kyslík a vodíkový kation. Tento rozklad je detekován na měřící elektrodě amperometricky (dle standardizovaného protokolu laboratoře).

## 4.4 POSTUP A PRINCIP MĚŘENÍ NA ANALYZÁTORU COBAS 6000

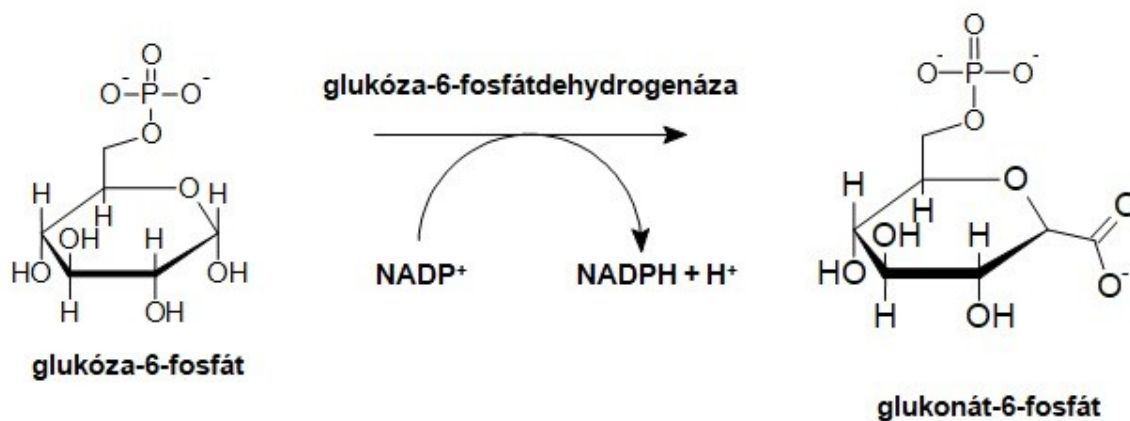
### 4.4.1 Postup práce při měření hladin glukózy

100  $\mu$ l plazmy či séra jsem přepipetovala z primárních odběrových zkumavek do mikrokepů. Tyto nádobky jsem poté umístila do stojánek určených pro přístroj Cobas 6000. V počítačovém programu jsem zadala požadavek na změření glukózy v jednotlivých nádobkách. Stojánek jsem vložila do přístroje a spustila měření. Výsledky měření byly zapsány do počítače asi po 10 minutách v jednotkách mmol/l.

### 4.4.2 Princip měření

Stanovení koncentrace glukózy v séru či v plazmě je prováděno metodou absorpční spektrofotometrie. V prvním kroku dojde k enzymatické reakci glukózy s hexokinázou, která katalyzuje přenos fosfátové skupiny z molekuly ATP na molekulu glukózy. Produktem této reakce je glukóza-6-fosfát a molekula ADP (viz první krok glykolýzy).

Následně je molekula glukóza-6-fosfátu oxidována pomocí enzymu glukóza-6-fosfátdehydrogenázy v přítomnosti  $\text{NADP}^+$  na glukonát-6-fosfát (Obr. 13), přičemž žádný jiný uhlovodík oxidován není. Při této reakci dochází také k redukci  $\text{NADP}^+$  na  $\text{NADPH}$ .



Obrázek 13. Oxidační reakce

V posledním kroku dochází k proměření nárůstu absorpance při 340 nm. Rychlost vzniku  $\text{NADPH}$  během reakce je přímo úměrná koncentraci glukózy v krvi (dle standardizovaného protokolu laboratoře).

## 5 VÝSLEDKY

Měření bylo provedeno v plazmě i v séru po centrifugaci krve odebrané od 30 pacientů. V této skupině náhodně vybraných pacientů byli jak zdraví jedinci, tak diabetici a těhotné ženy.

Biologické vzorky byly měřeny na biochemických analyzátoch Biosen C-Line a Cobas 6000. Zatímco první ze zmíněných analyzátorů provádí měření glukózy na principu elektrochemie, druhý zmíněný měří koncentraci glukózy principem spektrofotometrickým.

Nejdříve se změřily vzorky plazmy a séra ihned po odběru krve, poté probíhalo měření za 4 hodiny po odběru.

Před prvním měřením byla provedena kalibrace daného analytického systému pomocí kontrolních materiálů, které obsahují stanovený analyt (v našem případě glukózu) o známé koncentraci. Kontrola provedená tímto způsobem slouží k ověření spolehlivosti analytického systému, což znamená, že získané výsledky budou kvalitní.

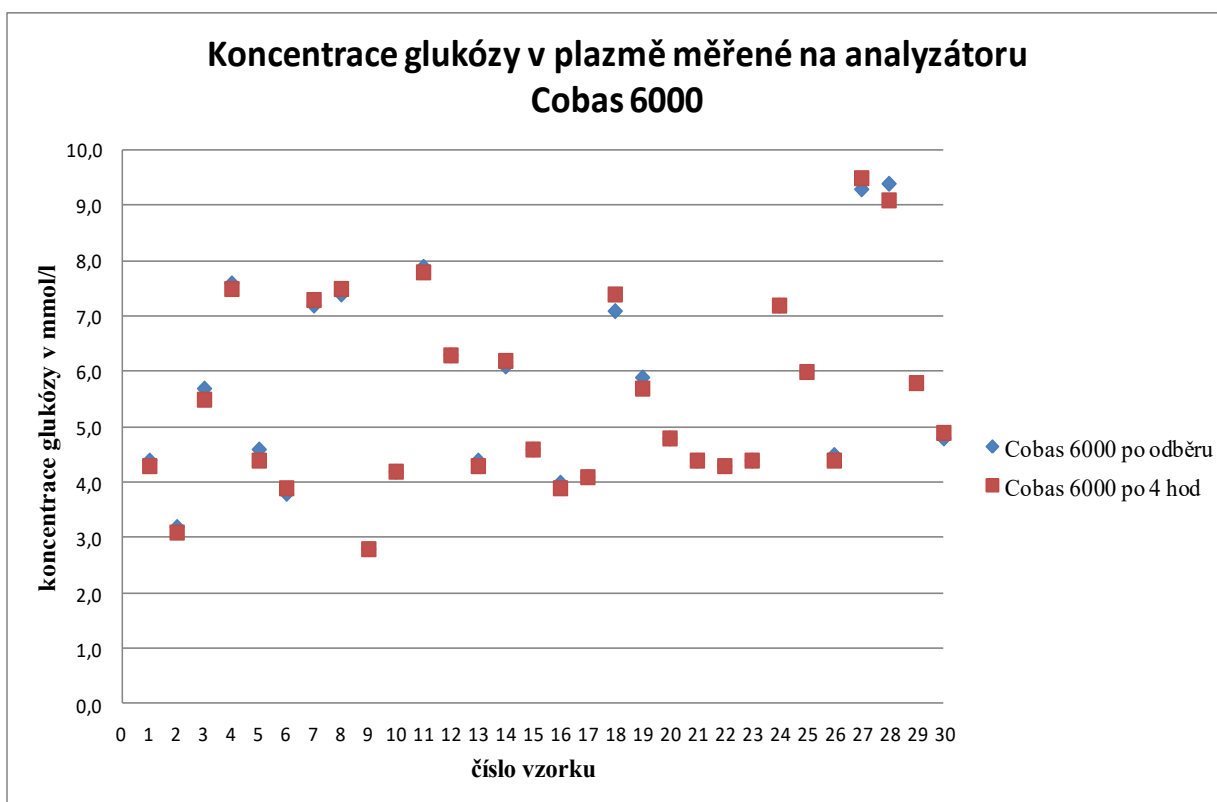
Oba analyzátoři vydávají naměřenou koncentraci glukózy v číselné hodnotě se dvěma desetinnými místy v jednotkách mmol/l. Jelikož laboratoř vydává výsledky lékařům v číselné hodnotě s jedním desetinným místem, byly výsledky zaokrouhleny (Tabulka 1).

**Tabulka 1 - výsledky měření (hodnoty glukózy udávané v mmol/l)**

číslo vzorku	plazma				sérum			
	Cobas 6000		Biosen C-Line		Cobas 6000		Biosen C-Line	
	po odběru	po 4 hod	po odběru	po 4 hod	po odběru	po 4 hod	po odběru	po 4 hod
1	4,4	4,3	4,0	3,7	4,5	3,0	4,2	3,8
2	3,2	3,1	3,1	3,0	3,1	3,1	3,5	3,1
3	5,7	5,5	5,5	5,3	6,1	5,0	5,8	5,0
4	7,6	7,5	6,9	6,8	7,9	6,9	8,3	7,7
5	4,6	4,4	4,2	4,1	4,7	3,0	4,1	3,6
6	3,8	3,9	3,7	3,8	4,2	4,1	4,0	3,8
7	7,2	7,3	7,1	6,7	7,8	7,8	7,6	7,4
8	7,4	7,5	6,9	6,7	7,9	6,2	7,6	7,1
9	2,8	2,8	2,8	2,8	3,0	2,6	2,8	2,9
10	4,2	4,2	4,3	4,2	4,4	3,9	4,4	3,9
11	7,9	7,8	7,9	7,9	8,3	7,7	8,7	7,3
12	6,3	6,3	5,8	5,9	6,7	5,4	6,9	6,2
13	4,4	4,3	4,2	4,0	4,6	3,9	4,6	3,8
14	6,1	6,2	6,2	6,0	6,5	5,7	6,5	5,5
15	4,6	4,6	4,9	4,1	4,9	4,9	5,0	4,3
16	4,0	3,9	3,8	3,8	4,2	3,4	4,0	3,3
17	4,1	4,1	4,3	4,4	4,4	4,0	4,5	3,6
18	7,1	7,4	7,2	7,2	7,7	7,4	7,7	7,0
19	5,9	5,7	5,6	5,6	6,2	4,8	5,4	4,4
20	4,8	4,8	4,8	4,9	5,2	4,1	6,4	5,0
21	4,4	4,4	3,8	4,1	4,8	3,6	4,8	3,3
22	4,3	4,3	4,7	4,4	4,6	3,6	4,8	3,6
23	4,4	4,4	4,6	4,6	4,7	3,5	4,8	2,7
24	7,2	7,2	7,0	7,1	7,7	6,7	7,2	6,5
25	6,0	6,0	6,2	6,0	6,3	5,4	6,6	4,8
26	4,5	4,4	4,6	4,6	4,7	3,9	4,6	4,0
27	9,3	9,5	8,8	8,9	9,9	9,1	10,2	9,2
28	9,4	9,1	9,2	9,1	9,7	8,3	10,3	8,1
29	5,8	5,8	5,8	6,2	6,3	5,1	6,5	6,0
30	4,8	4,9	5,2	4,9	5,0	4,0	5,0	3,7

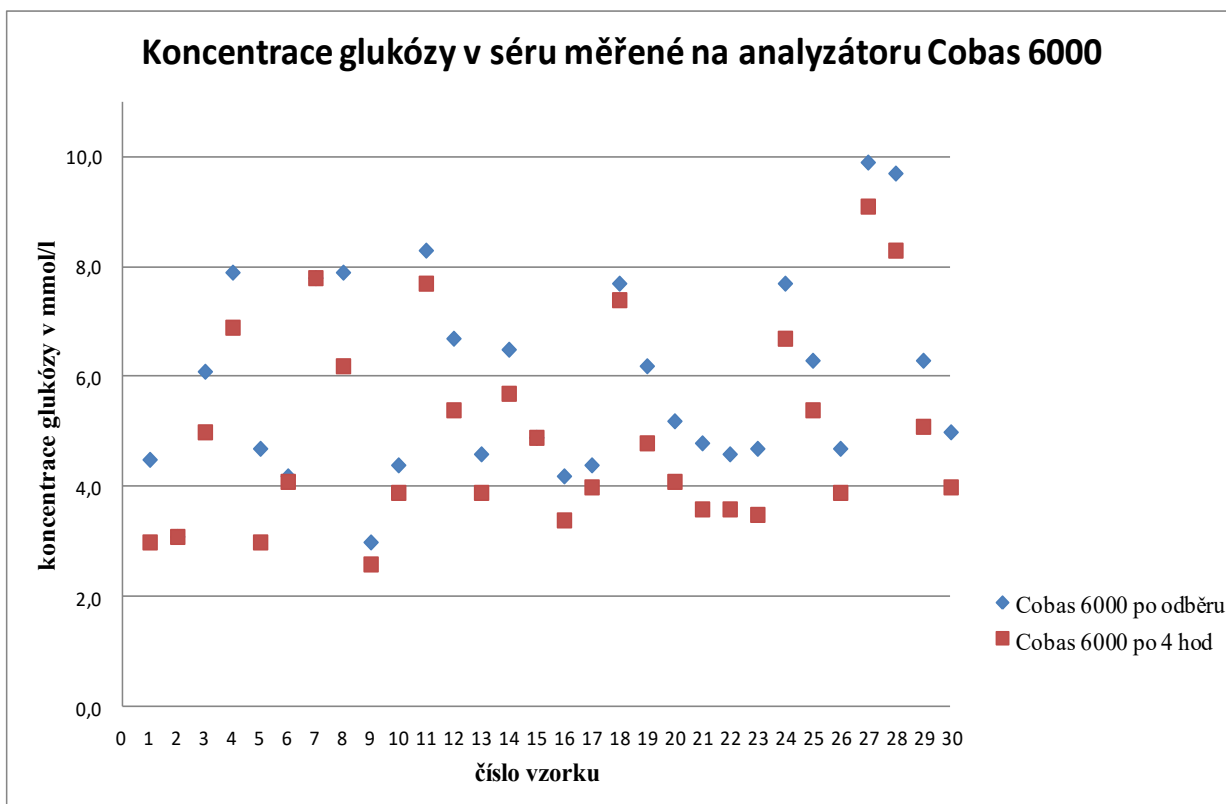
## 5.1 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ NAMĚŘENÝCH NA ANALYZÁTORU COBAS 6000

Výsledky měření ukázaly, že koncentrace glukózy v plazmě naměřené ihned a za 4 hodiny po odběru na analyzátoru Cobas 6000 se liší jen nepatrně (Obr.14). Je to dáno tím, že krev byla odebrána do zkumavek s antiglykolytickým činidlem, které by mělo zabránit rozpadu glukózy. U vzorku číslo 18 došlo dokonce k navýšení hladiny glukózy o 0,3 mmol/l, pouze u vzorku číslo 28 došlo k významnějšímu poklesu hladiny glukózy.



Obrázek 14. Koncentrace glukózy v plazmě měřené na analyzátoru Cobas 6000

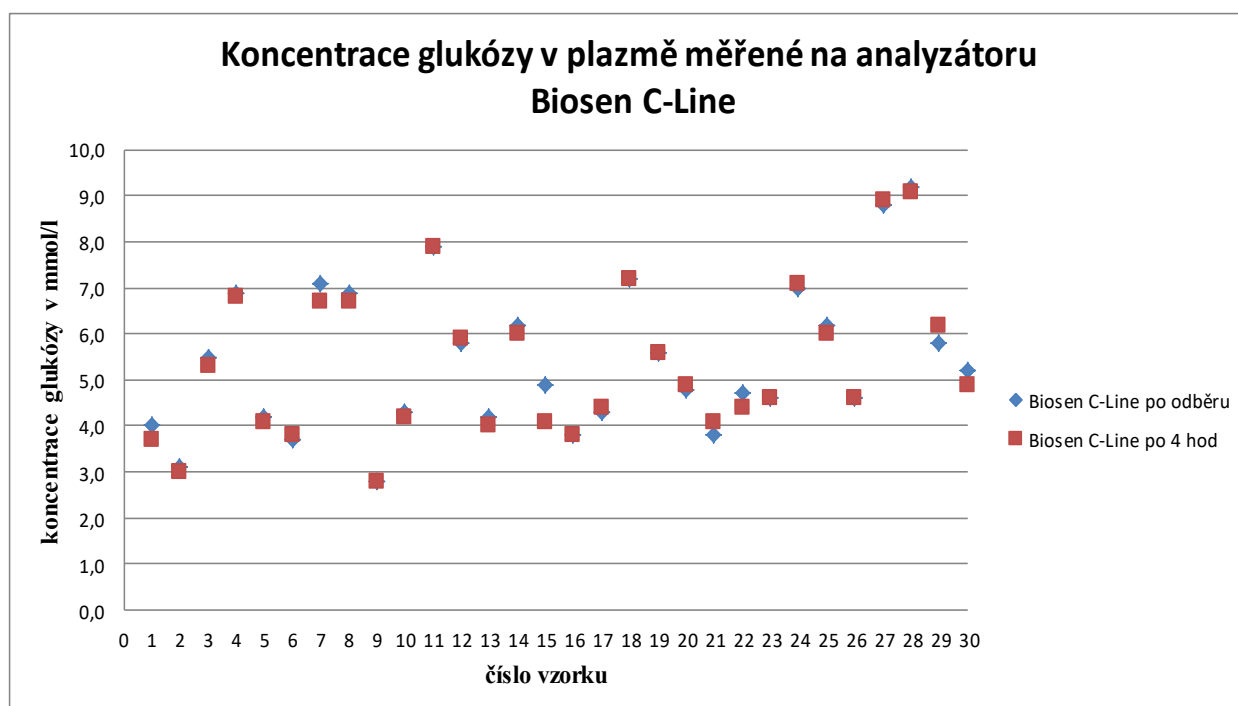
Stanovení koncentrace glukózy v séru analyzátořem Cobas 6000 ukázalo pokles hladiny glukózy v séru po 4 hodinách po odběru (Obr. 15). V tomto případě je pokles předpokládáný, neboť do odběrových zkumavek nebylo přidáno antiglykolytické činidlo. Nicméně u některých vzorků k poklesu nedošlo. U vzorků číslo 2, 7 a 15 byly naměřeny naprosto stejné hodnoty. Ve vzorku číslo 6 došlo jen k nepatřnému poklesu hladiny glukózy.



**Obrázek 15. Koncentrace glukózy v séru měřené na analyzátořu Cobas 6000**

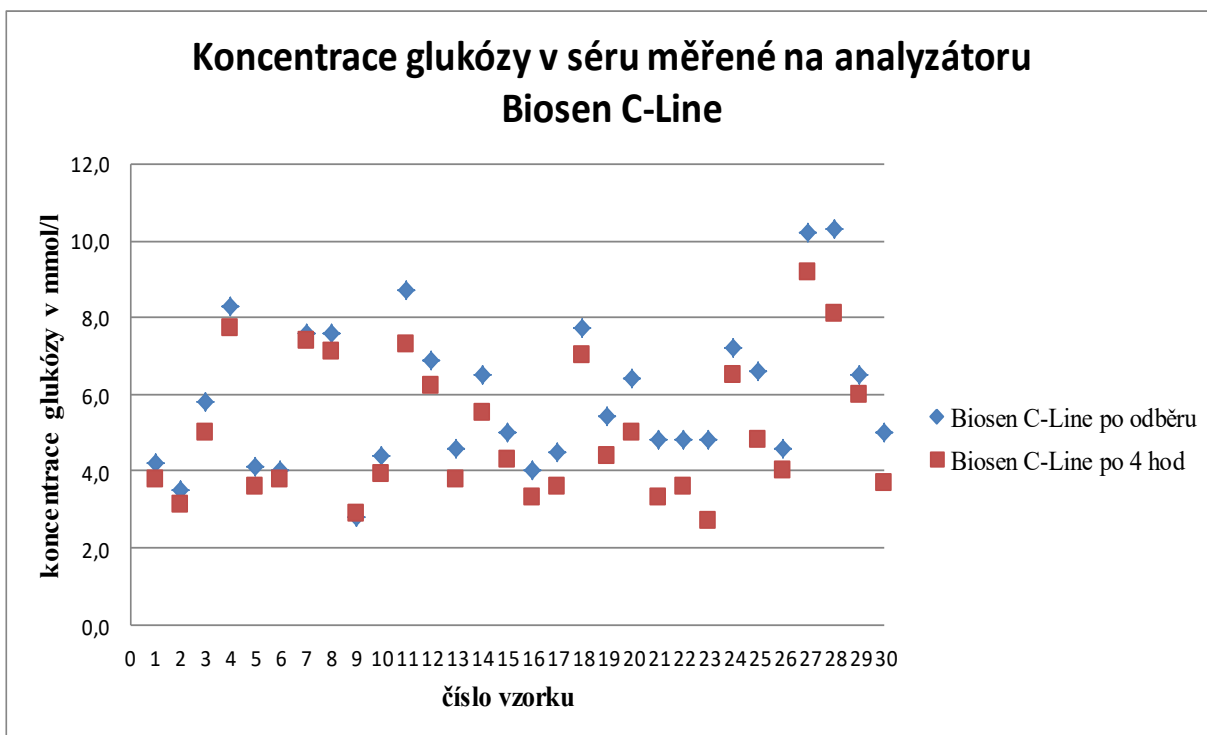
## 5.2 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ NAMĚŘENÝCH NA ANALYZÁTORU BIOSEN C-LINE

Stejně vzorky plazmy byly měřeny také analyzátozem Biosen C-line (Obr. 16). V tomto případě by opět měly být naměřené hodnoty glukózy téměř shodné, neboť bylo do odběrových zkumavek přidáno antiglykolytické činidlo. Jak ale můžeme vidět, u několika vzorků došlo k výraznějšímu poklesu hladiny glukózy. Největší pokles můžeme pozorovat u vzorku číslo 15, kde koncentrace glukózy klesla o 0,8 mmol/l. Výrazný pokles koncentrace glukózy je i u vzorků číslo 7 a 22.



Obrázek 16. Koncentrace glukózy v plazmě měřené na analyzátoru Biosen C-Line

Také stejné vzorky séra byly měřeny analyzátozem Biosen C-line (Obr. 17). V tomto případě by opět mělo dojít ke snížení hladiny glukózy měřené 4 hodiny po odběru. V tomto případě je pokles předpokládáný, neboť do odběrových zkumavek nebylo přidáno antiglykolytické činidlo. Nicméně i zde se nachází vzorky, kde koncentrace glukózy klesla jen nepatrně. U vzorku číslo 9 byla koncentrace glukózy po 4 hodinách po odběru dokonce o 0,1 mmol/l vyšší než koncentrace glukózy naměřená ihned po odběru.



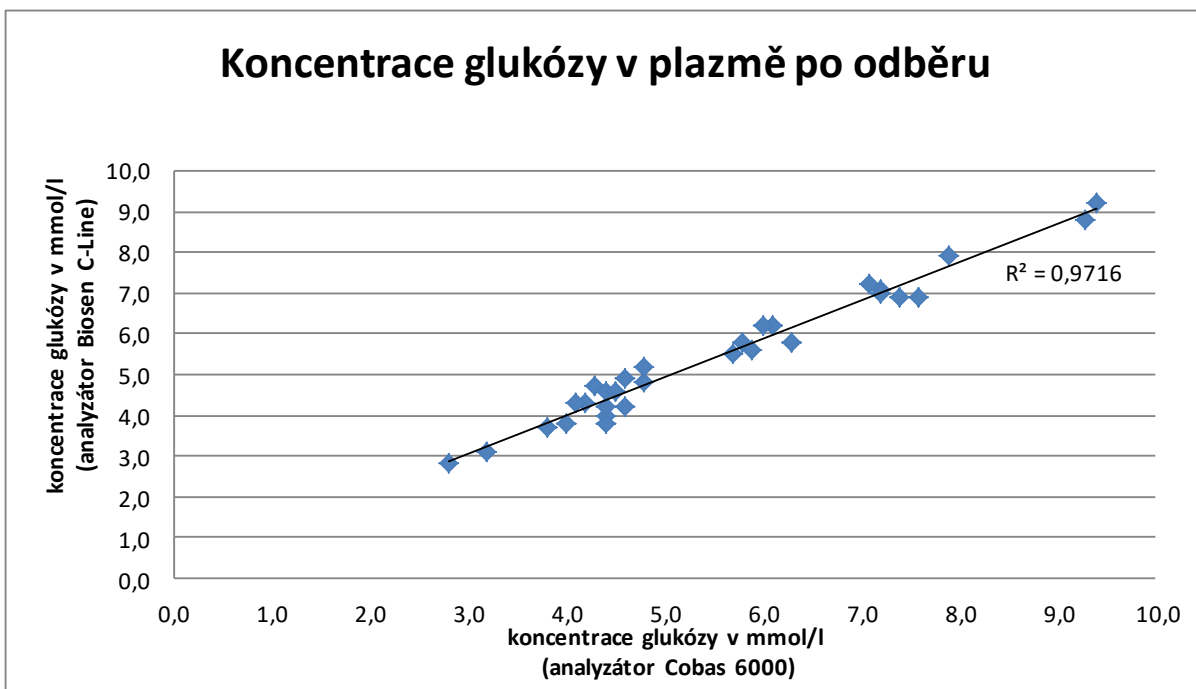
**Obrázek 17. Koncentrace glukózy v séru měřené na analyzátozu  
Biosen C-Line**



### 5.3 POROVNÁNÍ ANALYZÁTORŮ DLE NAMĚŘENÝCH HODNOT

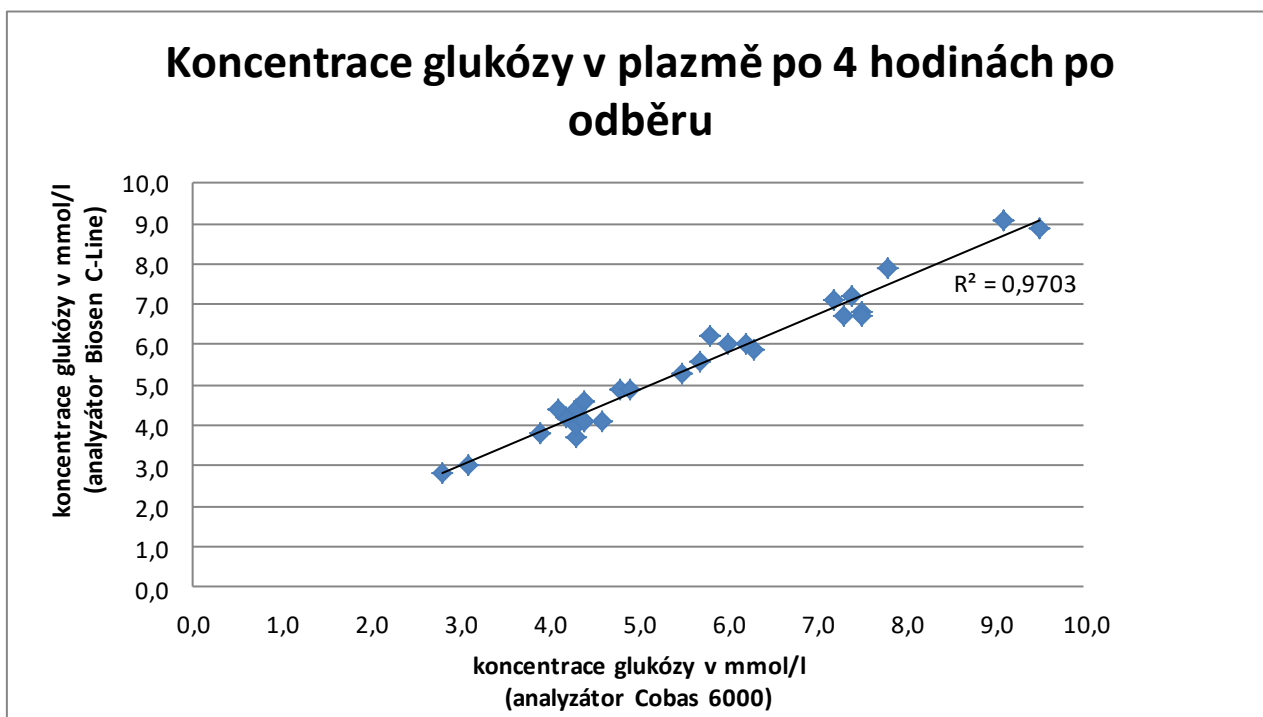
Bylo provedeno porovnání výsledků naměřených na 2 odlišných analyzátorech. Porovnatelnost ovšem neznamená, že naměřené výsledky budou stejné, budou pouze vykazovat stejný trend. Grafické porovnání spočívá v tom, že na osu x jsou vyneseny hodnoty naměřené na analyzátoru Cobas 6000 a na osu y jsou vyneseny hodnoty naměřené na analyzátoru Biosen C-Line. Vzniklé body se proloží lineární regresní přímkou. Seskupí-li se body kolem přímky, existuje mezi body určitá lineární závislost. Míru korelace neboli vzájemného vztahu nám určuje hodnota determinačního koeficientu  $R^2$ . Hodnota této veličiny by se měla ideálně pohybovat kolem hodnoty 1.

Porovnání výsledků naměřených ihned po odběru krve do zkumavek s antiglykolytickým činidlem na 2 odlišných analyzátoch (Obr. 18) ukázalo, že se naměřené hodnoty od sebe liší, nicméně hodnota determinačního koeficientu je relativně uspokojivá, čemuž odpovídá i rozložení jednotlivých bodů v grafu. Ty jsou rozptýleny v relativní blízkosti spojovací přímky.



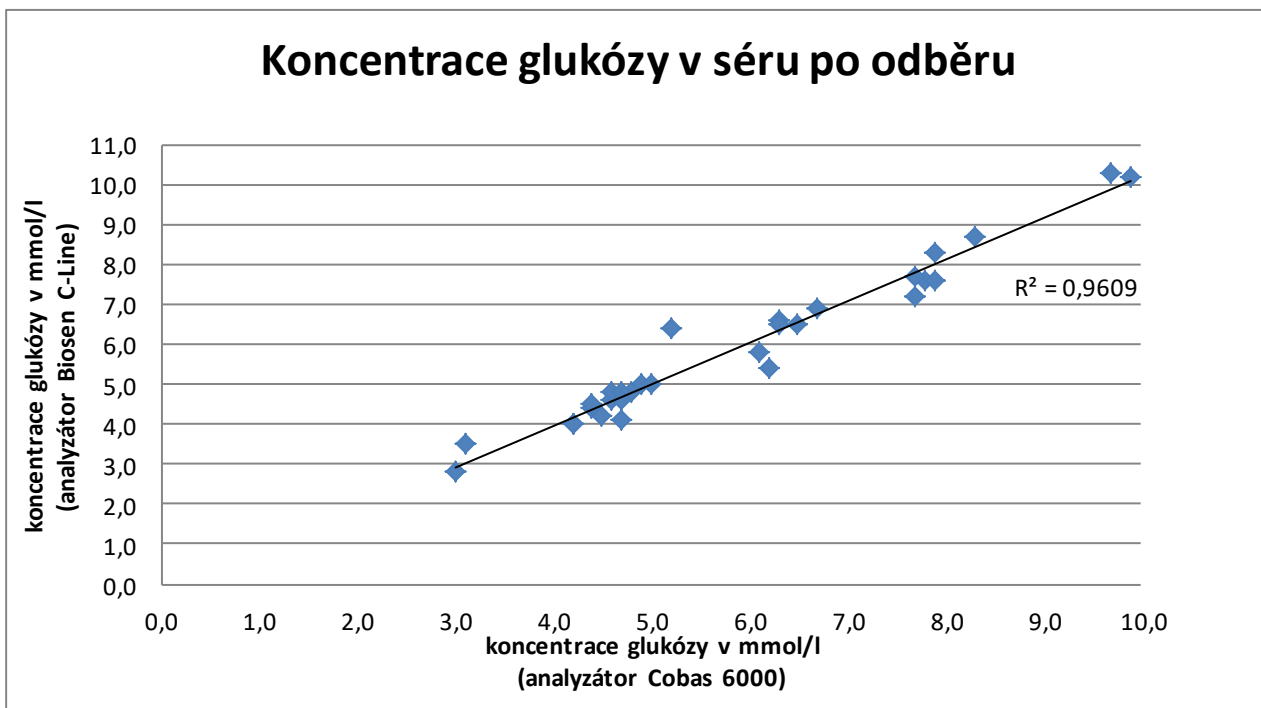
**Obrázek 18. Porovnání výsledků získaných měřením plazmy ihned po odběru na 2 odlišných analyzátoch**

Po provedení porovnání výsledků naměřených za 4 hodiny po odběru krve do zkumavek s antiglykolytickým činidlem na 2 odlišných analyzátořech (Obr. 19), bylo zjiřtěno, že hodnota determinačního koeficientu je zde o něco snížena než je hodnota této veličiny u předchozího porovnání. Naměřené výsledky vykazují určitou míru korelace, což můžeme pozorovat na rozložení bodů v grafu kolem spojovací přímky.



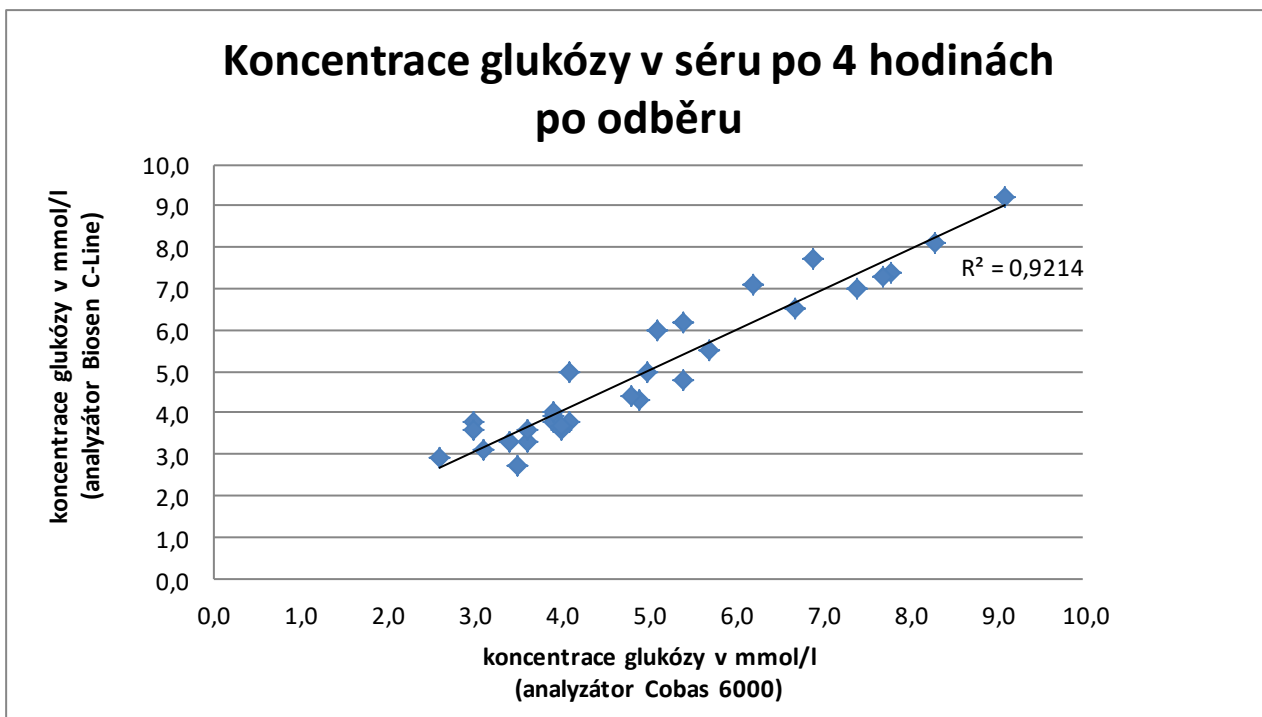
**Obrázek 19. Porovnání výsledků získaných měřením plazmy po 4 hodinách po odběru na 2 odlišných analyzátořech**

Bylo provedeno také porovnání výsledků naměřených ihned po odběru krve do zkumavek bez antiglykolytického činidla na 2 odlišných analyzátořech (Obr. 20). Zde je hodnota determinačního koeficientu nižší, z čehož plyne, že výsledky naměřené na analyzátořech se od sebe významněji liší, což můžeme pozorovat i na vzdálenosti bodů od spojnice přímky.



**Obrázek 20. Porovnání výsledků získaných měřením séra ihned po odběru na 2 odlišných analyzátořech**

Při porovnání výsledků naměřených za 4 hodiny po odběru krve do zkumavek bez antiglykolytického činidla na 2 odlišných analyzátoch (Obr. 21) bylo zjištěno, že pouze pár bodů leží na spojnici přímky. Ostatní body jsou kolem této přímky rozptýleny. Míra korelace je zde nízká, čemuž odpovídá i hodnota determinačního koeficientu.



**Obrázek 21. Porovnání výsledků získaných měření séra po 4 hodinách po odběru na 2 odlišných analyzátoch**

## 6 DISKUZE

Cílem této práce bylo prokázat stabilitu glukózy v krvi po 4 hodinách po odběru do odběrových zkumavek s antiglykolytickým činidlem a naopak prokázat pokles koncentrace glukózy v krvi po 4 hodinách po odběru do zkumavek bez antiglykolytického činidla. Cílem této práce bylo také porovnat hodnoty naměřené na 2 odlišných analyzátorech.

Ze získaných výsledků vyplynulo, že koncentrace hladiny glukózy v krvi naměřené za 4 hodiny po odběru krve do zkumavek s antiglykolytickým činidlem byla u většiny pacientů srovnatelná s hodnotou glukózy naměřenou ihned po odběru krve. Z toho tedy vyplývá, že antiglykolytický přípravek má významnou roli v udržování hladin glukózy ve vzorcích krve. Tento fakt také dokazují i hodnoty glukózy naměřené ve vzorcích krve bez přídavku antiglykolytického činidla. V těchto zkumavkách byly naměřené hodnoty ihned a za 4 hodiny po odběru nesrovnatelné. Hladina glukózy se po 4 hodinách po odběru snížila.

V klinické laboratoři se stanovuje koncentrace glukózy zejména v séru. Vzorek odebrané krve putuje do laboratoře s co nejmenším časovým zdržením, aby byly výsledky vydány co nejdříve. Úroveň kvality výsledků vyšetření se sleduje každodenním měřením kontrolních materiálů s přesně definovanými koncentracemi glukózy.

Ze získaných výsledků také vyplynulo, že koncentrace glukózy v plazmě ihned a po 4 hodinách po odběru naměřené analyzátozem Cobas 6000 byly až na pár výjimek téměř shodné. Koncentrace glukózy v plazmě ihned a po 4 hodinách po odběru naměřené na analyzátoru Biosen C-Line se od sebe lišily poněkud více. Důvodem neshodných výsledků na tomto analyzátoru může být ruční pipetování vzorku i systémového roztoku. Analyzátor Cobas 6000 má pipetování automatické, tudíž se zde eliminuje případná lidská chyba.

Protože pro měření hladin glukózy v krvi byly používány 2 přístroje pracující na odlišných principech měření, bylo třeba tyto naměřené hodnoty mezi sebou porovnat. Z výsledků vyplynulo, že výsledky koncentrace glukózy v plazmě naměřené na analyzátorech vzájemně korelují mnohem více, než výsledky koncentrace glukózy v séru, kde se naměřené hodnoty od sebe značně liší.

Zatímco analyzátor Biosen C-Line měří hodnoty koncentrace glukózy zejména u pacientů z diabetologických poraden, analyzátor Cobas 6000 měří hodnoty koncentrace glukózy u pacientů, kde je kromě vyšetření hladiny glykémie také požadováno vyšetření například na parametry lipidového metabolismu.

Pokud budeme na analyzátory nahlížet z pohledu jejich cenové dostupnosti, i zde najdeme mezi analyzátory výrazné rozdíly. Zatímco analyzátor Biosen C-Line pořídí laboratoř za 250 000,- Kč, analyzátor Cobas 6000 stojí okolo 12 milionů korun. Nicméně cena vyšetření glukózy dle sazebníků laboratorních vyšetření vychází zhruba na 15,- Kč.

Hodnota glykémie je nejčastěji stanovovaným parametrem v klinické laboratoři. Je proto nezbytné používat validované analyzátory, které budou vydávat spolehlivé, přesné a správné výsledky.

## 7 ZÁVĚR

Tato studie, jejímž cílem bylo zjistit, jaký je vliv antiglykolytického činidla na stabilitu glukózy v krvi, přinesla řadu výsledků. Po jejich zpracování a vyhodnocení jsem dospěla k těmto závěrům:

- 1) Stabilita glukózy po 4 hodinách po odběru ve vzorcích krve odebraných do zkumavek s antiglykolytickým činidlem byla prokázána. Hladiny koncentrace glukózy naměřené ihned a za 4 hodiny po odběru byly shodné nebo se lišily jen nepatrně.
- 2) Byl prokázán také pokles koncentrace glukózy po 4 hodinách po odběru v séru, tedy ve vzorcích krve odebraných do zkumavek bez antiglykolytického činidla. Hladiny koncentrace glukózy naměřené za 4 hodiny po odběru byly sníženy oproti hladinám koncentrace glukózy naměřených ihned po odběru.
- 3) Výsledky naměřené na analyzátoch Biosen C-Line a Cobas 6000 se od sebe v některých případech lišily nepatrně, v jiných případech byly výsledky poněkud více rozdílné. Může to být dáno rozdílnými metodami stanovení, ale také manuální chybou při pipetování.



## 8 SEZNAM LITERATURY

- 1) BERÁNEK, Martin a Miloš TICHÝ. Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2186-9.
- 2) BRUNS, David a William KNOWLER. Stabilization of Glucose in Blood Samples: Why It Matters. *Clinical Chemistry* [online]. 2009, 55(5), 850-852 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1373/clinchem.2009.126037. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2009.126037>
- 3) DOSTÁL, Jiří. Biochemie pro bakaláře. Brno: Masarykova univerzita, 2003. ISBN 80-210-3232-4.
- 4) DZÚRIK, Rastislav. Štandardná klinickobiochemická diagnostika. Martin: Osveta, 1990. Edícia pre postgraduálne štúdium lekárov a farmaceutov.
- 5) FAHY, Brenda et al. Glucose control in the intensive care unit. *Critical Care Medicine* [online]. 2009, 37(5), 1769-1776 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181a19ceb. ISSN 0090-3493. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003246-200905000-00033>
- 6) FRIEDECKÝ, Bedřich et al. Diabetes mellitus – laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů. Česká společnost klinické biochemie společně s Českou diabetologickou společností, 2015. Dostupné také z: [http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/DM/DM\\_dop\\_201601.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/DM/DM_dop_201601.pdf)
- 7) HOLEČEK, Milan. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. Praha: Grada Publishing, 2006. ISBN 80-247-1562-7.
- 8) LEDVINA, Miroslav et al. Biochemie pro studující medicíny. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1414-4.

- 9) MURRAY, Robert et al. Harperova ilustrovaná biochemie. Páté české vydání, první v nakladatelství Galén. Přeložil Bohuslav MATOUŠ. Praha: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-907-7.
- 10) MURRAY, Robert et al. Harper's illustrated biochemistry. 28th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2009. ISBN 9780071625913.
- 11) National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Risk Factors for Type 2 Diabetes [online]. 2016. [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/risk-factors-type-2-diabetes>
- 12) NOVÁK, František. Úvod do klinické biochemie. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0366-7.
- 13) PINHAS-HAMIEL, Orit et al. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. The Journal of Pediatrics [online]. 1996, 128(5), 608-615 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1016/S0022-3476(96)80124-7. ISSN 00223476. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347696801247>
- 14) RACEK, Jaroslav. Klinická biochemie. 2. přeprac. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 80-7262-324-9.
- 15) SKÁLOVÁ, Lenka. Základní biochemické dráhy v buňce: pracovní sešit k přednáškám z obecné biochemie pro posluchače FaF UK. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0819-7.
- 16) SKOP-LEWANDOWSKA, A. et al. Overweight and obesity vs. simple carbohydrates consumption by elderly people suffering from diseases of the cardiovascular system. Annals of Agricultural and Environmental Medicine [online]. [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.5604/12321966.1233555. ISSN 1232-1966. Dostupné z: <http://aaem.pl/abstracted.php?level=5&ICID=1233555>
- 17) THOMAS, Lothar. Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt, Germany: TH-Books, 1998. ISBN 3980521540.

18) ZIMA, Tomáš. Laboratorní diagnostika. 3. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013.  
ISBN 978-80-7492-062-2.

ZDROJE OBRÁZKŮ 1-13: počítačový program ChemSketch