

Obsah:

Úvod	7
1. Glukóza	8
1.1 Glykémie	9
1.2 Měření glykémie	10
2. Glukometr	10
2.1 Historie vývoje glukometrů	11
2.2 Konstrukce glukometru	14
2.2.1 Typy převodníků pro elektrochemické biosenzory	14
2.2.2 Elektrody	16
3. Elektrochemické glukometry	17
3.1 Enzymy	17
3.2 Stanovení glukózy s využitím glukóza-oxidázy	19
3.2.1 Biosenzory I. generace	19
3.2.2 Biosenzory II. generace	21
3.2.2.1 Mediátory	22
3.2.3 Biosenzory III. generace	25
3.3 Stanovení glukózy s využitím glukóza-dehydrogenázy	25
4. Fotometrické glukometry	27
4.1 Metody měření optických glukometrů	28
5. Měření a manipulace s osobními glukometry	31
5.1 Odebrání a proměření vzorku krve	31
5.2 Přesnost a správnost při měření s osobními glukometry	33
5.2.1 Vliv teploty na měření	34
5.2.2 Interferující látky	34
6. Budoucnost osobních glukometrů	35
6.1 Kontinuální invazivní měření glykémie	36
6.2 Kontinuální neinvazivní měření glykémie	38
Závěr	40
Seznam použité literatury a internetových zdrojů	41

Úvod

Znalost hladiny glukózy v krvi je základním předpokladem pro kvalitní život lidí trpící dnes už bohužel celosvětově rozšířenou nemocí diabetes. Na základě hodnoty koncentrace glukózy v krvi si pacienti nejenom upravují dávkování inzulínu, ale jsou schopni předcházet i větším zdravotním komplikacím, mezi které patří především hypoglykemické a hyperglykemické záchvaty.

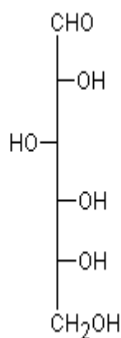
Ve druhé polovině 20. století přichází vědecká dvojice Leland C. Clark a Champ Lyons s myšlenkou využít pro stanovení glukózy specifické reakce s příslušným enzymem. To vede k tomu, že počátkem 60. let je představen první koncept biosenzoru využívajícího enzym glukóza-oxidázu, který je schopen velice přesně změřit koncentraci glukózy v předloženém vzorku. Touto událostí je odstartován vývoj biosenzorů, které jsou postupem času stále zdokonalovány a dnes je známe v podobě malých lehkých plastových zařízení schopných z malé kapičky krve během několika sekund určit přesnou koncentraci glukózy.

1. Glukóza

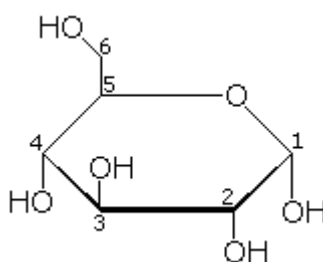
Glukóza je organická látka patřící mezi sacharidy, což jsou karbonylové sloučeniny typu aldehydů nebo ketonů. V běžné řeči je také označována jako hroznový cukr nebo krevní cukr.¹ Je to jeden z nejdůležitějších sacharidů a také jedna z nejrozšířenějších organických sloučenin na Zemi. Je stavební složkou mnoha oligosacharidů, polysacharidů i heteroglykosidů. Patří mezi nejdůležitější zdroje energie živých organismů.³

Glukóza je bílý krystalický šestiuhlíkatý monosacharid (proto je také označovaná jako hexóza) obsahující aldehydovou skupinu. Molekula glukózy může existovat v otevřené (lineární, acyklické) formě a kruhové (cyklické) formě. Druhý případ je důsledkem intramolekulární reakce mezi uhlíkem aldehydové skupiny a hydroxylovou skupinou na pátém atomu uhlíku, při níž vzniká intramolekulární poloacetal. Ve vodném roztoku jsou obě formy v rovnováze.²

Glukóza se vyskytuje v několika enantiomerech, „zrcadlových obrazech“. Z toho důvodu, že obsahuje tzv. střed chiralidy, optické centrum, což je uhlíkový atom, na kterém jsou navázány čtyři různé substituenty.¹ Glukóza má čtyři optická centra, to znamená, že teoreticky může mít 15 optických stereoisomerů. Těchto izomerů, včetně samotné glukózy, se v živých organismech vyskytuje 8. Všechny tyto izomery patří k tzv. D-sérii.²



Obr. 1a



Obr. 1b

Obr. 1a: Aldehydická forma D-glukózy ve Fisherově projekci.

Obr. 1b: Poloacetalová α -D- a β -D-forma.

D-glukóza je pro existenci organismů nezbytná, je to nejrychlejší a nejzákladnější zdroj energie pro všechny buňky, který se tvoří v rostlinných a živočišných tkáních.

V rostlinách vzniká jako produkt fotosyntézy a hromadí se v plodech, u živočichů vzniká v procesu glykogenolýzy postupným rozpadem molekuly glykogenu.²

Přesahuje-li přívod glukózy spotřebu, ukládá se její přebytek ve formě glykogenu a při poklesu hladiny v krvi dochází k jeho zpětnému odbourávání.

V klinickém významu je to nejčastěji stanovovaný analyt, neboť porucha sacharidového metabolismu v podobě diabetu je časté onemocnění, jeho diagnóza a kontrola terapie se bez stanovení koncentrace glukózy neobejdou.¹³

1.1 Glykémie

Glykémie je termín používaný pro vyjádření koncentrace glukózy v krvi. Normální hodnoty glykémie v kapilární krvi se pohybují v hodnotách 3,5 - 6,4 mmol/l na lačno a po jídle stoupají o 1 - 2 mmol/l. U diabetiků by hodnota glykémie neměla přesáhnout 7,0 mmol/l na lačno a 9,0 mmol/l po jídle.

Pokles glykémie pod dolní hranici normy (< 3,3 mmol/l) se nazývá hypoglykémie. Naopak zvýšená hladina (>6,4 mmol/l - na lačno pro nediabetika) se označuje jako hyperglykémie. Pro lidi trpící cukrovkou má horší následky hypoglykémie, která je definována jako patologický pokles glykémie pod 3,3 mmol/l doprovázený klinickými projevy, jež jsou způsobeny vylučováním antiregulačních hormonů a dalšími biochemickými procesy.⁴ V těchto kritických situacích může dojít k poškození důležitých orgánů, především mozku, a nervů. V extrémním případě až k ohrožení života.⁵

Hladina glukózy v krvi je regulována řadou hormonů. Nejdůležitějším z nich je inzulin, který její koncentraci snižuje.¹³ Tento hormon vzniká v buňkách slinivky břišní (pankreas) a jeho vylučování závisí právě na koncentraci glukózy v krvi.⁵ Pokud tyto buňky přestanou fungovat nebo nemohou tvořit tolik inzulinu, kolik ho organismus potřebuje, hovoříme o vzniku onemocnění zvaného diabetes, česky cukrovka. Toto celosvětově rozšířené chronické onemocnění, projevující se poruchou metabolismu sacharidů, postihuje obě pohlaví a všechny věkové kategorie.⁶

V současnosti je hlavním cílem léčby diabetu umožnit nemocnému plnohodnotný aktivní život, který se kvalitativně blíží co nejvíce normálu. Toho lze dosáhnout dlouhodobou uspokojivou kompenzací diabetu, kvalitní léčbou a hlavně prevencí.⁷

A právě pravidelné sledování hladiny glukózy v krvi je jednou z nejdůležitějších povinností diabetika. V dnešní době jsou dostupné přístroje, tzv. osobní glukometry, které

umožňují pacientovi stanovit si hodnotu glykémie bez lékařské asistence a v pohodlí domova, tzv. „self-monitoring“.

1.2 Měření glykémie

Aby mohl diabetik dobře kompenzovat projevy své nemoci, musí si pravidelně měřit hladinu glukózy v krvi. Podle těchto hodnot pak upravuje jak své dávky inzulínu, tak stravovací režim. Dnes existuje široký sortiment osobních glukometrů, které jsou založeny na principu měření glykémie z kapky krve nanesené na testovací proužek.

Vynález proužků pro domácí měření glykémie představoval na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let neobyčejný přínos pro léčení diabetu.²⁰ Tyto testovací proužky obsahují speciální reagenty (enzymy, koenzymy, mediátory a indikátory), které jakmile přijdou do styku s krví, přesněji s glukózou obsaženou v krvi, iniciují chemické a elektrochemické reakce, jejichž konečným výsledkem je analytický signál odpovídající hladině glukózy v pacientově krvi. Rychlost těchto měření, specifčnost, přesnost a preciznost jsou hlavní důvody, díky kterým se testovací proužky a osobní glukometry staly důležitou součástí při současné léčbě cukrovky a předcházení zdravotních komplikací.¹⁷ Poprvé v historii tak získal člověk s diabetem možnost kdykoliv se sám přesvědčit o své glykémii, kvalifikovaně upravovat svoji inzulínovou léčbu a udržovat si přehled o kompenzaci vlastního diabetu.²⁰

2. Glukometr

Glukometr je přístroj pro měření hladiny glukózy v krvi. Umožňuje domácí měření diabetikům, kteří si díky znalosti své aktuální glykémie mohou přizpůsobovat dávky inzulínu a tak mohou správným kompenzováním diabetu předcházet pozdějším komplikacím.²¹ Glukometr je konstruován jako lehké a malé zařízení („kapesní velikosti“), které je napájené baterií a pracuje na principu vyhodnocování elektrochemického nebo fotometrického signálu.²² Elektronická paměť a možnost propojení a komunikace s osobním počítačem už dnes nejsou u glukometrů žádnou zvláštností. Jejich ovládání je jednoduché a intuitivní a v poslední době se osobní glukometry rychle zařazují mezi běžnou konzumní elektroniku.

Hlavní částí stojící za technologií glukometrů jsou tzv. testovací proužky.¹⁷ Tyto testovací proužky jsou jednorázová zařízení, která jsou masově vyráběna jako tenké plátky. Používání jednorázových proužků je snadné a je tak zabráněno zbytečným problémům s přenášením, kontaminací nebo zničením.²² V současné době se při měření glukózy pomocí osobních glukometrů využívá dvou různých měřicích principů. Jde o metodu

elektrochemickou a fotometrickou. Díky tomu se můžeme setkat se dvěma typy testovacích proužků.²⁰

Každý proužek pro elektrochemické stanovení obsahuje minimálně dvě miniaturní elektrody, indikační (pracovní, měrnou) a referentní (srovnávací). Povrch proužku je potisknut vrstvou chemikálií, je zde specifický enzym, mediátor, stabilizátor a pokud je to nutné tak i další látky. Tato vrstva bývá obvykle na proužek nanášena speciální technologií. Proužek může zahrnovat i přepážku a další pracovní elektrodu.²²

Pro přístroje pracující na fotometrickém principu jsou určeny proužky, na jejichž povrchu je vrstva chemikálie, která poskytuje se stanovovanou glukózou barevnou sloučeninu. Měření se vyhodnocuje prozkoumáním světelných vlastností proužku po reakci s krví. Ovšem tato metoda měření glykémie je dnes už zastaralá a je stále více vytlačována přesnější a rychlejší elektrochemickou metodou.²¹

2.1 Historie vývoje glukometrů

Jak už bylo výše zmíněno, diabetes je celosvětově rozšířený problém a toto onemocnění je jedním z vedoucích příčin úmrtí na planetě. Její diagnóza a léčení vyžadují přísné monitorování hladiny glukózy v krvi. A právě tento problém, poskytnutí rychlé a spolehlivé kontroly glykémie, se stal výzvou a předmětem enormního zájmu mnoha výzkumných týmů po celém světě. Podstatou výzkumu se staly specifické reakce mezi glukózou a enzymem glukóza-oxidázou.

První výchozí koncept vedoucí k vývoji glukózo-enzymové elektrody pochází už z roku 1962 od dvojice Clark-Lyons.²² Samostatné měření glykémie pak začalo počátkem 70. let, ale překvapivě ne pomocí elektrochemické metody.¹⁷ První komerčně vyrobený glukometr od firmy Ames využíval pro měření refraktometru, který byl vynalezen Antonem H. Clemensem v roce 1971. Vývoj refraktometru byl totiž o mnoho rychlejší než vývoj Clarkovy glukózo-enzymové elektrody.²³ Pro rok 1975 byly typické měřicí produkty od již zmíněné firmy Ames (Elkhart, IN) nebo Boehringer Mannheim (Mannheim, Německo). Pacient při práci s těmito glukometry potřeboval, při porovnání s dnešními hodnotami, relativně velké množství krve (až 30 μ l). Měřicí interval přístroje trval okolo jedné minuty, pak byla krev rozložena, a po další minutě mohlo být vzniklé zbarvení porovnáno se zbarvením na přiložené barevné stupnici. Pouze dostatečně proškolení nebo zkušení pacienti byli schopni odečíst koncentraci glukózy s dostatečnou přesností.¹⁷ Navíc samotný glukometr bylo drahé zařízení, dostupné pouze na doporučení lékaře, bylo velké (30x20x15 cm) a těžké (hmotnost

činila přibližně 1 kilogram). Ale navzdory tomu všemu byl přístroj vyvinutý firmou Ames úspěšný a odstartoval vývoj mnoha jiných výrobků.

Během 80. let vzrůstal důraz na výzkum biotechnologií a proto se biosenzory staly opět „horkým“ tématem. Během tohoto desetiletí se vše soustředilo na vývoj „druhé generace“ glukózových biosenzorů, hlavně na vývoj lepších mediátorů a na vývoj modifikovaných elektrod se zvýšenou citlivostí.²³ Další „revoluce“ přišla v roce 1987, kdy firma LifeScan (Milpitas, CA) představila systém *The One Touch*. Byl to testovací proužek, opět fungující na principu fotometrie, vyrobený z umělé hmoty s dírkou, která byla potažena membránou, na jejíž vrchní stranu se umisťovala kapka krve. Tato membrána nebyla ale



Obr. 2: Glukometr „Ames Reflectance Meter“ využívající pro měření refraktometr (1971).

schopna separovat erythrocyty, výsledná barva produktů reakce byla tedy dána směsí červené barvy hemoglobinu a modré barvy vzniklé z přítomného činidla. Vizuální hodnocení nebylo tedy dost dobře možné. Ovšem přístroj po 45 vteřinách proměřil vzorek z vnitřní strany proužku za použití dvou vlnových délek, aby tak kompenzoval přítomnost krevního barviva.

Ke konci roku 1988 byl představen první testovací proužek, který už k měření glykémie využíval elektrochemických principů, ExacTech®Pen meter (Medisense, Waltham, MA; nyní Abbott Diabetes

Care, Alameda, CA). Od této doby končí éra glukometrů s vizuálním nebo spektrálním vyhodnocováním.¹⁷ Od počátku 90. let máme možnost být svědky intenzivní aktivity ve vývoji glukózových biosenzorů, které využívají k měření specifických reakcí mezi glukózou a enzymy glukóza-oxidázou (GOx) nebo glukóza-dehydrogenázou (GDH).²²

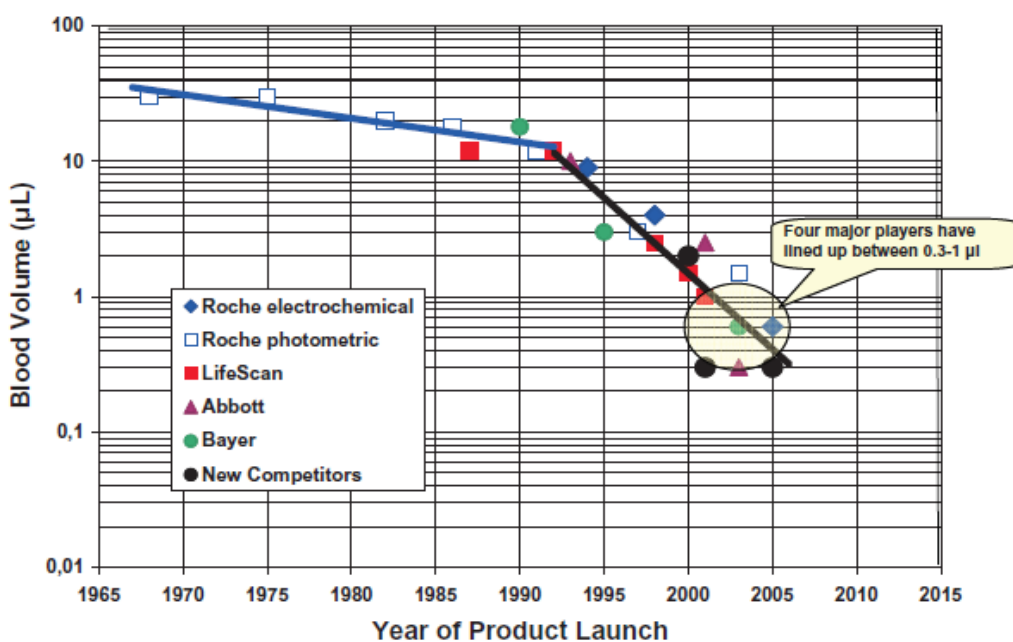
V dnešní době pracují osobní glukometry o mnoho rychleji a snižuje se také množství vzorku potřebného pro měření. Nejmodernější přístroje jsou schopny zobrazit výslednou hodnotu po 5 vteřinách a zatím nejnižší objem krve potřebný k měření je 0,3 μ l.

Následující tabulka shrnuje hlavní historické mezníky ve vývoji elektrochemických biosenzorů pro stanovení obsahu glukózy v krvi:¹⁷

Rok	Událost
1962	První glukózo-enzymová elektroda.
1973	Glukózo-enzymová elektroda založená na detekci peroxidu vodíku.
1975	Uvedení do prodeje prvního glukózového sensorového systému.
1982	Demonstrace <i>in vivo</i> monitorování glukózy.
1984	Vývoj ferrocenových mediátorů.
1987	Uvedení prvního osobního glukometru.
1999	Uvedení komerčního <i>in vivo</i> glukometru.
2000	Představení nositelného neinvazivního glukózového monitoru.

Po roce 2000 vstoupil vývoj glukometrů do pátého desetiletí své existence. V tomto období se očekává využití moderních technologických výhod, které by zajistily „bezbolestné“ *in vitro* měření glykémie, vývoj nových biokompatibilních membránových materiálů a také nalezení systému neinvazivního monitorování glykémie se současným dávkováním inzulínu.¹⁷

Následující graf ukazuje, jak s dobou vývoje glukometrů klesal objem krve potřebný k měření. Na ose y jsou hodnoty objemu krve v μL a ose x zobrazuje časovou přímku. V legendě jsou barevně zvýrazněny jednotlivé firmy zabývající se vývojem a výrobou glukometrů.²²



2.2 Konstrukce glukometru

Glukometr není nic jiného než elektronické zařízení převádějící signál elektrochemické reakce na digitální hodnotu, která se zobrazí na displeji přístroje. Pod vnějším plastovým obalem je glukometr zařízení pracující na bázi ampermetru v případě, že jde o měření využívajících elektrochemických metod, nebo fotometru, pokud na testovacích prouzcích dochází k reakcím s barevnou změnou. Klíčem k úspěšnému změření glykémie je převedení hodnoty koncentrace glukózy na specifický signál. Ten se měří z malé kapičky krve pacienta. Neustálé vylepšování technologie a řada výzkumů umožnila dnešním testovacím proužkům vyhodnotit výsledky už za 5 vteřin a to z pouhých 5 μl vzorku krve.¹⁷

Drtivá většina technologie osobních glukometrů je založena na použití jednorázových testovacích proužků. Tyto proužky se dají souhrnně označit jako biosenzory.²² Biosenzor lze definovat jako přenosné analytické zařízení sestávající ze dvou základních komponent, z biologické složky, tzv. selektoru (enzym, protilátka, antigen, receptor, ...), která rozpoznává analyt, a fyzikálního převodníku (transducer), který tuto biointerakci převádí na vhodný analytický signál.²⁴ Tento signál je přímo úměrný koncentraci jedné nebo více chemických látek ve vzorku.²⁵ V případě glukometru jde o enzymový biosenzor a převodníkem je tu elektrodový systém. Enzymové biosenzory využívají čištěných enzymů, které umožňují až několikanásobné zvýšení selektivity. V podstatě všechny enzymové senzory jsou schopny pracovat po imobilizaci enzymu na jakýkoliv převodník.⁸

Všechny současné proužky využívají enzymy specifické pro glukózu. Tyto enzymy, patřící do skupiny oxidoreduktáz, oxidují glukózu na glukonát. Elektrony uvolněné z glukózy jsou většinou přeneseny na oxidovanou formu molekuly přítomného mediátoru a tím způsobí jeho přeměnu na redukovanou formu. Mediátorem je obvykle organická nebo anorganická látka, která je schopna existovat jak v oxidované, tak v redukované formě a která je ochotna darovat nebo přijímat elektrony. Takový mediátor přenáší elektrony k elektrodě, v případě potenciometrického měření, nebo k molekule indikátoru, u kterého dojde při redukci k barevné změně.¹⁷

2.2.1 Typy převodníků pro elektrochemické biosenzory

Elektrochemické biosenzory jsou založeny na spotřebě nebo produkci elektroaktivních částic během interakce biosložky a substrátu. Při konstrukci biosenzorů se využívají nejčastěji, protože se vyznačují rychlou odezvou, jednoduchostí a v porovnání s jinými typy převodníků jsou levnější. Jednou z jejich mála nevýhod je možnost znečištění povrchu

elektrod interferujícími látkami, čemuž se však dá ve většině případů zabránit použitím vhodné membrány.⁹

Potenciometrické převodníky vyžadují měření potenciálu indikační elektrody vůči referentní při nulovém proudu. Základem tohoto měření je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem.⁸ Výsledný potenciál je úměrný logaritmu koncentrace stanovované látky.

U biosenzorů jsou potenciometrické převodníky složeny z iontově selektivní elektrody (ISE) kombinované s imobilizovaným enzymem. Jednoduchost potenciometrických technik je založena na závislosti koncentrace stanovovaného analytu na potenciálu E , který odpovídá u reversibilní redox elektrody Nernst-Petersově rovnici (v ideálních roztocích lze aktivity nahradit koncentracemi):

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{a_{ox}}{a_{red}} \right].$$

ISE vykazují jen velmi malé proudy a tak vyžadují měřicí přístroje s velkou vstupní impedancí. Molekuly enzymů jsou imobilizovány do iontově citlivé povrchové vrstvy elektrody a výsledný povrchový náboj mění rozmístění náboje v oblasti rozhraní polovodič-izolátor.¹⁰

Amperometrické převodníky poskytují jako signál proud vzniklý elektrochemickou reakcí při konstantním napětí pracovní elektrody. Ten je úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Biosenzor vyniká rychlou odezvou a vyšší citlivostí, selektivita je pak řízena redox potenciálem látek přítomných ve vzorku.

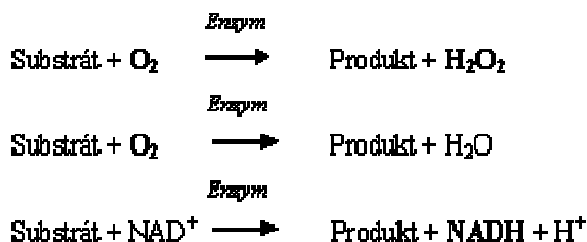
Bioelement při oxidaci substrátu odevzdává elektrony pracovní elektrodě, na jejímž povrchu dochází k elektrochemické regeneraci celé transportní kaskády, čímž se celý redoxní koloběh uzavře. Základním předpokladem tohoto tvrzení je skutečnost, že elektrodová reakce probíhá mnohem rychleji než transport analytu k elektrodě. Rychlost určujícím stupněm je potom transport elektroaktivní látky k elektrodě, přičemž rychlost tohoto transportu se s rostoucí tloušťkou difúzní vrstvy zpomaluje podle druhého Fickova zákona. Pokud se po dobu měření zajistí konstantní tloušťka difúzní vrstvy, zaznamenává se limitní difúzní proud i_d :

$$(i_d)_t = nFAD \frac{(c - c_0)}{\delta},$$

kde c je koncentrace analytu ve stanovovaném roztoku, c_0 koncentrace analytu na povrchu pracovní elektrody a δ tloušťka difúzní vrstvy.⁸

Vlastnosti amperometrických bisenzorů založených na enzymech jsou určovány především schopností imobilizovaných enzymů vyměňovat elektrony s elektrodou a zjevně měnit poměr přesunu elektronů.¹⁰

Amperometrické biosenzory využívají enzymové reakce, při nichž se spotřebovává kyslík (všechny oxidázy), tvoří se peroxid vodíku nebo produkují (nepřímo) redukovanou formu β -nikotinamidadenindinukleotidu(fosfátu), NAD(P)H (dehydrogenázy). Obecné rovnice výše zmíněných typů jsou:⁸



Při redoxních enzymových reakcích lze použít vhodný redoxní mediátor, který funguje jako přenašeč elektronů. Výhodou tohoto systému je, že se eliminuje potřeba měření koncentrace kyslíku, minimalizuje se vliv interferujících látek, je možno pracovat s nižšími potenciály a zlepšit se linearita a citlivost stanovení.⁹

2.2.2 Elektrody

Pro konstrukci enzymových biosenzorů představují právě elektrochemické systémy nejrozšířenější typ převodníku. Hlavní výhodou je jednoduchá konstrukce, nízké pořizovací náklady a výborná citlivost. Pro sestavení elektrochemického měřicího systému jsou zapotřebí nejméně dvě elektrody, pracovní (měrná) a referentní (srovnávací). Konstrukční uspořádání elektrod může být velice různorodé.

Referentní elektrody slouží jako srovnávací bod pro měření respektive nastavování potenciálu pracovní elektrody. Jejich vlastní potenciál je přesně definovaný a pokud možno časově stálý.²⁵ Na rozdíl od pracovní elektrody, potenciál referentní elektrody nezávisí na koncentraci analytu.¹¹ U amperometrických biosenzorů, kde stabilita referentní elektrody není až tak kritická, se často používá holý povrch stříbra a jako elektrolyt slouží okolní prostředí.

Pomocné elektrody musí být tvořeny dobrým vodičem s dostatečnou plochou a musí být elektrochemicky neaktivní.²⁵ Referentní elektrody slouží k nastavení potenciálu a zároveň tvoří zpětnou vazbu při měření.

Pracovní elektrody použitelné pro biosenzory zahrnují velmi širokou škálu materiálů i konfigurací: ušlechtilé kovy (Pt, Au), mnoho forem uhlíku a nejrůznější kompozitní směsi. Použitelný rozsah pracovního potenciálu je vždy nutno volit tak, aby nedocházelo k elektrochemickému rozkladu materiálu elektrody nebo interferenčním reakcím.

Historicky velmi ranným typem pro enzymové elektrody byly *potenciometrické elektrody*. Převodníkem je v tomto případě ISE v kombinaci s enzymovou vrstvou. Měří se potenciál pracovní elektrody proti referenční elektrodě (ta musí být kvalitní, časově stálá), přitom v systému neteče proud.

Amperometrické elektrody poskytují jako signál proud, který je úměrný koncentraci analytu. Proud se obvykle měří při konstantním napětí (potenciálu) pracovní elektrody. Velikost proudu prošlého za daný čas t pak udává náboj Q , který odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách:²⁵

$$Q = I \cdot t = \frac{z \cdot F \cdot m}{M_r},$$

kde m značí hmotnost přeměněné látky, I prošlý proud, z počet vyměněných elektronů, M_r molekulovou hmotnost přeměněné látky a F Faradayovu konstantu ($F = 96\,487 \text{ C/mol}$).

Amperometrické měření je v případě biosenzorů využívajících enzymy možno provádět ve dvou- nebo tříelektrodovém uspořádání. Pro první systém se napětí na pracovní elektrodě nastavuje klasicky proti referenční elektrodě, jak už bylo zmíněno výše. V druhém případě se navíc použije druhá pracovní elektroda. Na této elektrodě není, narozdíl od první pracovní elektrody, vrstva enzymu, a proto zde nedochází ke specifické enzymové reakci a hodnota proudu naměřeného touto elektrodou slouží jako rozdílová hodnota k proudu.²⁵

3. Elektrochemické glukometry

3.1 Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory, které umožňují případně urychlují chemické přeměny. Jsou syntetizovány buňkami všech živých organismů, v nichž zajišťují metabolismus. Účastní se syntézy látek nepostradatelných pro organismus a také degradace látek nežádoucích a nepotřebných. Patří mezi globulární bílkoviny a jsou většinou (60 až 70 %) povahy složených bílkovin. Součástí molekul enzymů jsou nízkomolekulové neaminokyselinové struktury nazývané kofaktory. Jejich funkce spočívá v přenosu atomů nebo jejich skupin, nebo

elektronů při biochemických reakcích, které enzymy katalyzují. Je-li kofaktor pevně vázán na bílkovinou složku enzymu, je tato složka nazývána prosthetická skupina. Jindy je kofaktor s bílkovinou složkou vázán slabě a může se od ní lehce oddělovat; takový kofaktor nazýváme koenzym.⁸

Ve zkratce lze říci, že enzymy jako analytická činidla se používají pro stanovení substrátů, aktivátorů nebo inhibitorů. Znamená to, že enzymová analýza může být použita všude tam, kde jde o stanovení látek, které jsou substráty, aktivátory či inhibitory enzymových reakcí.

Enzymové metody umožňují zásadní zjednodušení práce při stanovení složek či jednotlivých látek ve velmi komplexních směsích, s nimiž se lze setkat v přírodě. Specificita používaných enzymů totiž umožňuje stanovit většinu látek ve směsi bez jejich předchozího dělení, aniž by hrozilo přílišné nebezpečí interference dalších látek.¹⁴

Enzym se v biosenzorech používá převážně v purifikovaném stavu.²⁵ V případě enzymů je nutno mít na paměti, že jde o velmi labilní činidla, která snadno podléhají inaktivaci až denaturaci.¹⁴ Nejčastěji se používá jeden enzym, někdy je ovšem výhodnější použít současně dva nebo výjimečně i více enzymů, které navzájem kooperují – katalyzují například následné reakce nebo recyklační procesy.²⁵

Koncentrace sloučeniny, která se účastní enzymové reakce jako substrát, může být měřena dvěma základními způsoby:

1) stanovením obsahu vytvořeného produktu nebo stanovením úbytku startovního materiálu (substrátu) po proběhnutí enzymové reakce a to fyzikální, chemickou nebo enzymovou metodou (rovnovážná metoda);

2) z rychlosti enzymové reakce, která závisí na koncentraci substrátu, enzymu, kofaktoru, aktivátoru ev. inhibitoru (kinetická metoda).

Rovnovážnou metodou, t.j. proměřením celkové změny koncového produktu či substrátu po dosažení rovnováhy, je možno stanovit pouze ty sloučeniny, které se reakce účastní jako substráty.¹⁴



Reakce musí dojít do rovnovážného stavu, pak je možno počítat obsah substrátu ve vzorku a to i z obsahu vzniklého produktu. Předpokladem ovšem je, že produkt musí být nějakým způsobem odlišitelný od substrátu.¹⁴

Rychlost vzniku produktu popisuje známá rovnice Michaelis-Mentenové:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]},$$

kde V_{\max} je maximální rychlost při saturaci enzymu substrátem, K_M značí Michaelisovu konstantu a $[S]$ je koncentrace substrátu.

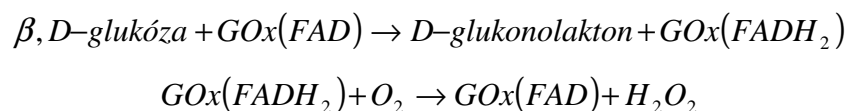
Pro stanovení glukózy se nejčastěji volí enzym glukóza-oxidáza (dále jako GOx). Je běžně dostupná z plísní *Aspergillus niger* nebo *Penicillium notatum*. GOx je dimer se dvěma FAD kovalentně vázanými na podjednotky, obsahuje asi 16 % glykosylových zbytků a je poměrně stabilním enzymem.²⁵ Aktivním centrem tohoto enzymu je adenindinukleotid (FAD), který při reakci s glukózou přechází na redukovanou formu (FADH₂).²⁶ Dalším použitelným enzymem je glukóza-dehydrogenáza (dále jako GDH).²⁵

Oba tyto enzymy, GOx i GDH, patří do skupiny tzv. oxidoreduktáz. Jsou to enzymy katalyzující intermolekulové oxidačně-redukční přeměny látek a patří mezi nejpočetnější třídu enzymů. Oxidoredukční děje realizují buď přenosem atomů vodíku nebo elektronů, případně vestavěním atomu kyslíku do substrátu. Dělí se na podskupiny podle funkčních skupin, které jsou donory protonů nebo elektronů.⁸

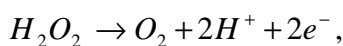
3.2 Stanovení glukózy s využitím glukóza-oxidázy

3.2.1 Biosenzory I. generace

První koncept glukózo-enzymové elektrody byl navržen v roce 1962 Clarkem a Lyonsem.²² Clark nejdříve hledal elektrodu, která by mu umožnila stanovit koncentraci kyslíku. Umístil jednoduchou provizorní membránu na platinovou elektrodu a měřil koncentraci kyslíku monitorováním proudu protékajícího po vložení napětí na elektrodu. Poté přišel s myšlenkou umístění enzymu, GOx, do elektrolytu mezi membránu a elektrodu.²⁷ Přesněji, GOx byla imobilizována v polyakrylamidovém gelu na povrchu membrány, která byla permeabilní pro plyny.⁹ Tím byl schopen stanovit koncentraci glukózy monitorováním poklesu tlaku kyslíku, který se spotřebovává při enzymatické oxidaci glukózy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku.²⁷ U tohoto, vlastně prvního, amperometrického biosenzoru pro stanovení glukózy byl na platinovou katodu vložen potenciál v rozmezí -0,6 až -0,9 V vs. Ag/AgCl (chlorido-stříbrná elektroda).⁸ Děje při této oxidaci se dají popsat následujícími rovnicemi:²⁷



Použití tohoto typu biosenzoru však narazilo na mnoho problémů. Je potřeba kontrolovat hladinu koncentrace rozpuštěného kyslíku a udržovat ji konstantní. V opačném případě nebude odezva biosenzoru na úbytek kyslíku úměrná koncentraci glukózy. Další problém představuje poměrně vysoký potenciál potřebný pro redukci kyslíku, -0,7 V, při kterém může docházet k interferencím. Jedním ze způsobů, jak tento problém obejít, je měřit proud spojený s oxidací vznikajícího peroxidu vodíku:

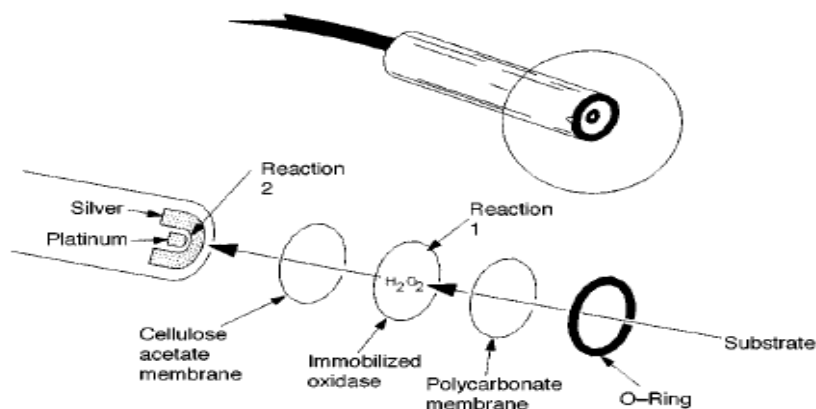


ke které dochází při potenciálu +0,65 V. Při této hodnotě potenciálu jsou významné vlivy interferujících složek schopných oxidace.⁹

Potenciál, který se používá pro měření peroxidu vodíku, je stejný jako u kyseliny močové nebo askorbové, které jsou také elektroaktivní. Během 80. let bylo mnoho úsilí věnováno minimalizování chyby způsobené právě těmito rušivými látkami. Vhodnou strategií se ukázalo použití selektivní vrstvy (membrány), která by minimalizovala přístup interferujících látek k povrchu snímače. K tomuto účelu bylo použito mnoho rozmanitých polymerů, látek vícevrstevných, smíšených, se specifickými přenosovými vlastnostmi založenými na rozměru, náboji nebo polaritě. Tyto membrány nejen že zadržovaly rušivé látky a povrchově aktivní makromolekuly, ale také spolu s použitím GOx zvyšovaly selektivitu měření.

Clarkův originální patent počítá s použitím jednoho nebo více enzymů pro přeměnu elektroneutrálního substrátu na elektroaktivní produkty. V roce 1973 byla tato elektroda konvertována na zařízení schopné měřit glukózu v plné krvi pomocí amperometrického (anodického) monitorování uvolňovaného peroxidu vodíku. To probíhá právě podle poslední z výše uvedených rovnic.

Clarkova technologie byla využita v roce 1975 společností Yellow Spring Instruments pro sestavení prvního účelového analyzátoru, který byl určen k přímému měření glukózy v plné krvi a který potřeboval k měření objem 25 μ l. Technologie Clarkovy elektrody byla rozvinuta dvojicí Updike



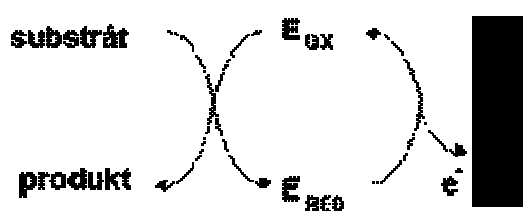
Obr. 3: Schematický diagram glukózového biosenzoru společnosti YSI z roku 1975.

a Hicks, kteří použili při svých pokusech dvojici kyslíkových elektrod (jedna s obsahem GOx) a díky měření rozdílů proudů mohli provést korekci vůči rušivému pozadí ve vzorcích.²²

Glukózový biosenzor vyvinutý YSI se musel potýkat s problémem kontaminace elektrodového povrchu nánosem proteinů, červených krvinek a interferujících látek, jakou je třeba kyselina askorbová nebo močová. Jak už bylo popsáno výše, řešením bylo umístění selektivní membrány nad elektrodový povrch.

Bylo ale téměř neproveditelné a cenově velice neefektivní používat takovou membránu na „elektrodu pro jedno použití“. A právě tento fakt vyloučil detekci peroxidu vodíku z principu stanovení glukózy pomocí osobních glukometrů. Když není přímá oxidace glukózy proveditelná přímo na elektrodě, je nutné přidat do reakčního prostředí mediátor, látku, která je schopna přenést elektrony z aktivního centra enzymu GOx (FAD skupina) k povrchu elektrody.²⁷

Přímý přenos je za normálních podmínek nemožný vzhledem ke vzdálenosti mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou.⁸ Navíc je flavinové redox centrum obklopeno tlustou



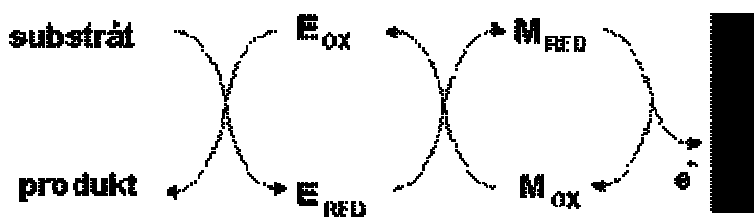
Obr. 4: Znárodnění přenosu elektronu z enzymu na povrch elektrody.

vrstvou proteinů, která způsobuje prostorovou separaci.²² V případě větších a složitějších molekul je kontakt redoxní skupiny s povrchem elektrody možný pouze pro určitým způsobem orientované molekuly.⁸

3.2.2 Biosenzory II. generace

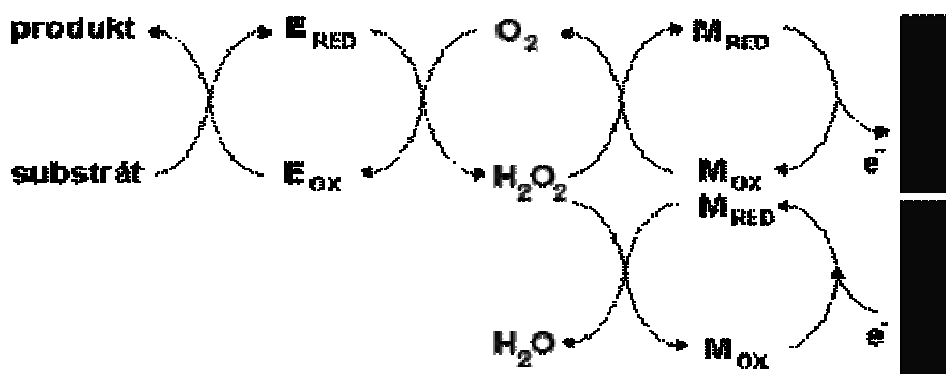
Tyto biosenzory představují způsob, jak se vyhnout použití kyslíku jako oxidačního činidla. Redoxní reakce mediátorů, látek fungujících jako přenašeče elektronů, jsou reversibilní, je možné s nimi pracovat při nižších potenciálech a koncentraci mediátoru lze lehce kontrolovat.⁹

Na níže uvedeném obrázku je schematicky znázorněn přenos elektronu k povrchu elektrody za pomoci mediátoru během oxidace glukózy.²² Jde konkrétně o případ, kdy



mediátor působí přímo na enzym. Substrát nejprve reaguje s oxidovanou formou enzymu za vzniku produktu a pak mediátor oxiduje redukovaný enzym a získané elektrony předává k povrchu elektrody.

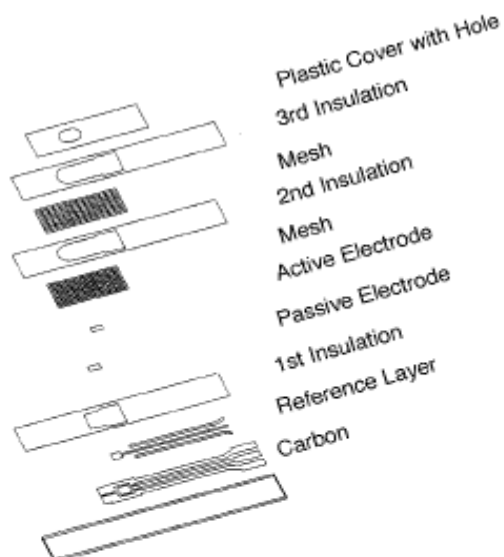
Často je využíváno působení mediátoru na produkty enzymových reakcí.



3.2.2.1 Mediátory

První typ biosenzoru určený pro domácí měření a založený na elektrochemickém principu s použitím mediátoru přišel na trh v roce 1987 z dílen firmy MediSence, Inc. Jako mediátor k oxidaci redukované formy GOx zde slouží ferrocenový derivát (1,1'-dimethylferrocenethanolamin). Testovací proužky byly vyráběny z polyvinylchloridu a jednotlivé vrstvy chemikálií na ně byly nanášeny metodou sítotisku. Proužek sám o sobě obsahuje tříelektrodovou komůrku.

Zde se nachází pracovní elektroda potažená vrstvou enzymu a mediátoru, pomocná elektroda, která obsahuje pouze mediátor, a elektroda referentní. Funkcí pomocné elektrody je kvantitativně určit hodnotu interferujících látek, které mohou být ve vzorku přítomny. Samotná koncentrace glukózy je pak měřena odečtením proudu vzniklého na pomocné elektrodě od proudu vzniklého na pracovní elektrodě. Jako referentní elektroda je použita elektroda chloridostříbrná.²⁷



Obr. 7: Konstrukční provedení testovacího proužku firmy MediSence, Inc. (1987).

Aby byl mediátor vůbec použitelný, musí splňovat několik základních požadavků:

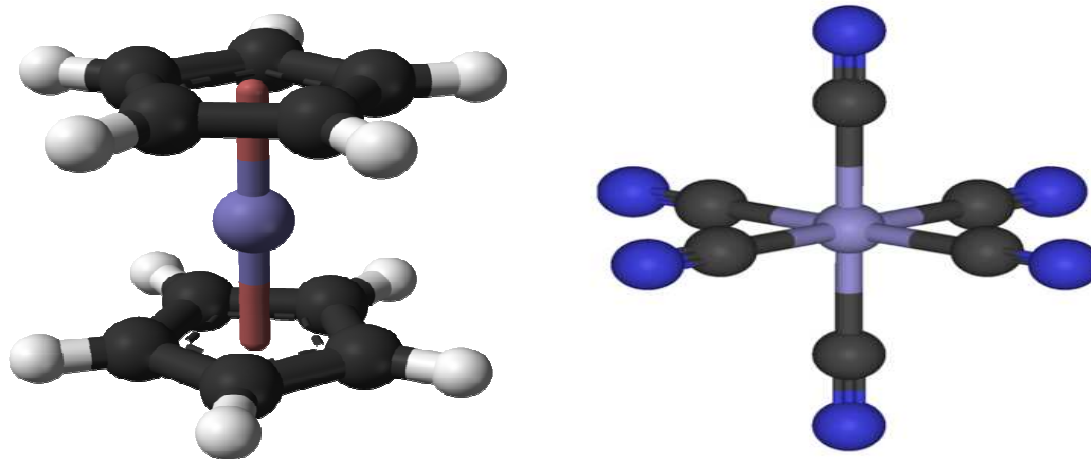
- reaguje s biokomponentou i elektrodou,
- musí dostatečně rychle přenášet elektrony (při známé stechiometrii a počtu přenášených elektronů),
- jeho formy musí být za podmínek použití dostatečně stabilní,
- stabilní v obou redox formách a nesmí se účastnit postranních reakcí (např. s kyslíkem),
- jeho přechod mezi redukovanou a oxidovanou formou musí být reversibilní,
- nízký redox potenciál,
- nezávislý na pH (neovlivňuje ani není ovlivněn hodnotou pH),
- netoxický,
- vhodný k imobilizaci na povrch elektrody.

Jako mediátory mohou být použita některá organická barviva, anorganické redoxní systémy (kovy, jejich oxidy), anorganické a organické komplexy přechodných kovů, vodivé organické soli a látky biologického původu.⁸

Nejčastěji se jako mediátory používají kationty přechodných kovů a jejich komplexy. Mnohé z nich obsahují ionty železa a jeho komplexy. Využívá se známých redox přeměn iontu železa:



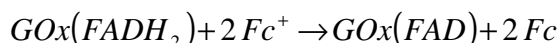
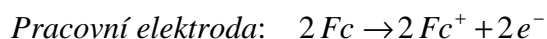
Volné Fe^{III} ionty nejsou vhodnými mediátory, protože snadno podléhají hydrolyze, a proto se vlastnostem ideálního mediátoru asi nejvíce blíží komplexy, jakým je například ferrocen a jeho deriváty a hexakynoželezitany.⁹



Obr. 8: Strukturní znázornění komplexu ferrocenu (vlevo) a hexakynoželezitanu (vpravo)

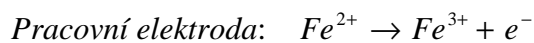
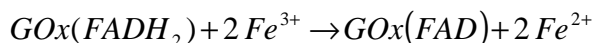
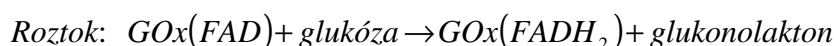
Používání ferrocenu však do jisté míry limituje malá stabilita oxidované kationtové formy, zvláště ve vodných médiích.⁸

U testovacího proužku, který obsahuje ferrocen jako mediátor a k měření využívá tříelektrodového systému, dochází v měřicí komůrce k následujícím elektrodovým dějům:²⁷



Testovací proužky pracující s hexakynoželezitanem mají v chemické vrstvě na svém povrchu daleko vyšší koncentraci GOx než tomu je u proužků s ferrocenovým mediátorem (5-10 jednotek enzymu na proužek oproti cca 0,2 jednotkám u ferrocenových proužků). To zajišťuje oxidaci většiny glukózy obsažené ve vzorku. Oxidace enzymaticky generovaného hexakynoželezitanu nastává na pracovní elektrodě a redukce hexakynoželezitanu na hexakynoželezitan na druhé elektrodě (která se chová jako pseudo-referentní elektroda). Také koncentrace hexakynoželezitanu na proužku je vysoká (cca 100 mM). To pak překonává relativně pomalou kinetiku oxidačních reakcí a zároveň poskytuje dostatek reagensů pro druhou elektrodu.

Děje v roztoku a na elektrodách jsou opět popsány níže:²⁷



Mediátor bývá, stejně jako biosložka, imobilizovaný na povrchu biosenzoru. Nejjednodušší metodou je příprava biosenzoru na bázi uhlíkové pastové elektrody, kde se mediátor smísí s uhlíkovou pastou, a potom se na povrch adsorbuje nebo jinak imobilizuje enzym. Další způsob, jak imobilizovat mediátor, je přímá kovalentní vazba na povrch kovové

elektrody nebo složitěji pomocí prostorové polymerní struktury, která mediátor obsahuje. Také existuje metoda, kdy se mediátor váže na povrch enzymu.⁹

Ovšem přítomnost mediátoru na testovacím proužku může přinést i problémy. Jednoduchý anorganický komplex, jakým je hexakynoželezitan, je látkou, která bez problémů reaguje s interferujícími látkami (kyselina askorbová a močová, acetaminofen, dopamin a jiné látky), které mohou být obsaženy v lidské krvi. Pro přesné měření je tedy daleko výhodnější používat mnohem komplexnější sloučeniny. Takovýto mediátor pak poskytuje společně s použitým enzymem vyšší chemickou selektivitu.

Příliš vysoká koncentrace mediátoru je dalším problémem spojeným s jeho použitím jako přenašeče elektronů. Při vysoké koncentraci oxidované formy mediátoru v reakční směsi může v extrémních případech dojít k tomu, že molekula mediátoru vstoupí do aktivního centra oxidovaného koenzymu (FAD) a ten pak nereaguje s přítomnou glukózou. Mediátor pak má vlastně inhibiční účinek.¹⁷

3.2.3 Biosenzory III. generace

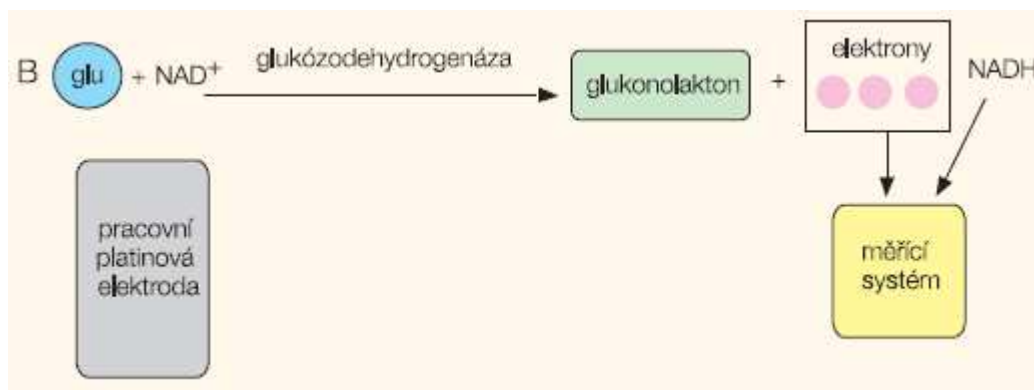
Jako biosenzory třetí generace jsou označovány enzymové elektrody založené na přímém přenosu elektronů.⁸ V tomto případě se mediátor využívá pro spojení enzymu s elektrodou. Enzym je nemožné redukovat (oxidovat) přímo na elektrodě, protože by docházelo k denaturaci jeho proteinové části a tím by se celý proces velmi zpomalil a stal by se ireversibilním. Jedním ze způsobů je např. modifikace povrchu zlaté elektrody 4,4'-bipyridylem. Bipyridyl samotný není elektroaktivní, ale může fungovat jako mediátor. Jiný způsob představují organické soli (tetrathiafulvalén), které se reversibilně oxidují nebo redukují. Několik těchto molekul vytvoří komplex schopný elektronového přenosu. Tyto organické soli je možno zakomponovat do materiálu elektrody ve formě krystalů nebo smícháním s uhlíkovým práškem. Nejnovější imobilizační techniky umožňují imobilizovat enzym přímo na elektrodu prostřednictvím *in situ* polymerizace použitím redox polymeru.⁹

3.3 Stanovení glukózy s využitím glukóza-dehydrogenázy

Základem novějších metod používaných pro některé glukometrové testovací proužky je reakce katalyzovaná enzymem glukózadehydrogenázou (GDH). Zatímco ve velkých laboratorních přístrojích užívajících tuto metodu je vzniklý NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) odpovídající koncentraci glukózy stanovován fotometricky, v přenosných

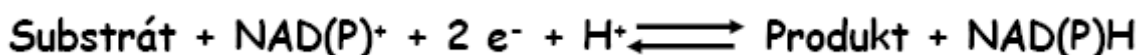
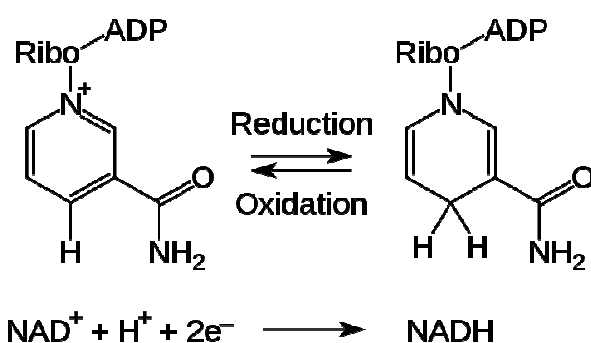
glukometrech jde opět o elektrochemický proces. Principiální výhodou metody oproti reakci s GOx je přímé měření elektronového toku bez zkreslujících vedlejších produktů (kyslíku).¹⁶

Koenzymem GDH je NAD⁺ (oxidovaná forma kofaktoru NADPH). Skládá se z nikotinamidu, adeninu, dvou molekul ribosy a dvou fosfátů, jež jsou navzájem propojeny jako nukleotidy.¹⁸ Mají charakter transhydrogenáz odnímajících substrátům dvojici atomů vodíku.⁸



Obr. 9: Schematické znázornění měření koncentrace glukózy s použitím enzymu GDH

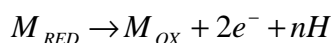
Enzymy patřící do třídy dehydrogenáz se dají rozdělit na tři podskupiny podle příslušných kofaktorů: enzymy obsahující FAD/FMN, PQQ (pyrrolchinolinchinon) a NAD⁺/NADP.⁸ K analytickým stanovením se využívá právě redox reakcí příslušného kofaktoru NAD⁺, které probíhají podle následujících rovnic:



Tato reakce má rovnovážný průběh, přitom oxidace obvykle probíhá v slabě alkalickém prostředí. Pro elektrochemickou detekci NAD⁺ je použitelná amperometrická reoxidace vznikajícího NADH ($E^0 = -0,56$ V vs. SKE). Přímá oxidace však vyžaduje vysoký

potenciál (přes 1 V), současně nastává i dimerizace a adsorpce produktů na povrch elektrody, jejímž důsledkem jsou pak nestabilní odezvy. Reoxidace se může provést pomocí modifikujících látek (E^0 -0,2 až 0,05 V) vázaných na povrch elektrody.

Nejčastěji se používají substituované fenaziny, fenoxaziny a fenothiaziny. Jinak lze užít také hexakvanoželezitan. Průběh reakce je homogenní, nejprve vzniká přenosový komplex (transfer complex, CT), po rozpadu je pak reoxidován mediátor, který umožňuje pracovat při podstatně nižším potenciálu.²⁵



Jedním z mediátorů používaným běžně dnešními testovacími proužky je i hexaaminruthenium(III)chlorid. Ten reaguje s NADH vzniklým reakcí GDH s glukózou v krevním vzorku a redukuje se na hexaaminruthenium(II)chlorid. Jeho reoxidací na elektrodě vzniká elektrický proud úměrný koncentraci glukózy ve zkoumané krvi.¹⁵

Další možností je použití tzv. chinon-proteinu GDH. Tento systém nevyžaduje k reakci kyslík a jako kofaktor je zde přítomen PQQ:



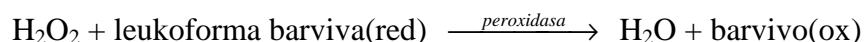
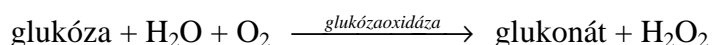
PQQ-GDH je účinný enzymový systém s rychlou schopností přenosu elektronů, ale jeho použití pro jednorázové testovací proužky je z ekonomického hlediska velmi nevýhodné.²³

4. Fotometrické glukometry

Základem všech optických biosenzorů, mezi něž fotometrické glukometry patří, je interakce světelného záření s chemickými látkami.²⁵ Fotometrický princip měření glykémie spočívá ve využití reakce mezi glukózou v krvi a látkou obsaženou v reagenční plošce testovacího proužku. Výsledkem této chemické reakce je určitá sytost zbarvení plošky. Glukometr poté „vyšle“ světelný paprsek, který se částečně odrazí nebo je částečně pohlcen

zbarvenou ploškou. Měření glykémie pak může probíhat z vyhodnocení pohlceného paprsku (měření absorbance při určité vlnové délce) nebo z intenzity odraženého paprsku.²⁰

Proužky pro glukometry měřící glykémii fotometricky mají podobnou konstrukci detekční zóny jako proužky pro elektrochemická stanovení. I v tomto případě je kapka krve přiložena k povrchu proužku a poté je nasána systémem kapilár do reakční komůrky, kde jsou obsaženy podobné látky, jako tomu bylo i u elektrochemických testovacích proužků.¹⁷ Oxidace glukózy je opět zajištěna specifickým enzymem, nejčastěji GOx. Látkou, která je zde navíc, je vlastní indikátor, barvivo, který je v redukované formě bezbarvý a v oxidované barevný (např. o-dianisidin, aminoantipyrin) a enzym peroxydáza, který katalyzuje rozklad vznikajícího peroxidu vodíku. Nejužívanější metodou pro stanovení glukózy je oxidace redukované formy barviva vznikajícím peroxidem vodíku za přítomnosti peroxidázy. Produktem této reakce je barevná látka. Vzniklé množství oxidované formy barviva je pak přímo úměrné koncentraci glukózy v krvi:¹⁴



Nevýhodou této metody je nepřesnost měření (výsledek může být ovlivněn intenzitou dopadajícího světla při měření), dlouhá doba měření (chemická reakce probíhá dlouho) a nutnost časté kalibrace glukometru.¹⁹ První kalibrace přístroje se provádí už při výrobě a pro domácí kalibraci jsou k dispozici tzv. kalibrační proužky, které se dodávají společně s glukometrem.¹⁷ Měření může být ovlivněno světelnými podmínkami, otřesy při měření apod.¹⁹

4.1 Metody měření optických glukometrů

Jak už bylo řečeno v kapitole 2.1, v sedmdesátých letech bylo zabarvení měřicí zóny proužku hodnoceno pouze vizuálně samotným pacientem. Toto odečtení výsledků bylo dost nepřesné a dá se srovnat s orientačním stanovením pH pomocí dnešních indikátorových papírků. Ke každému glukometru byla přiložena barevná stupnice jejíž rozsah barevné škály odpovídal jednotlivým koncentracím glukózy.¹⁷ Dnes jsou už optické glukometry považovány za zastaralé a jsou vytlačovány přesnějšími elektrochemickými přístroji. Ovšem na trhu se s nimi můžeme stále ještě setkat.

Absorpční spektroskopie měří pokles intenzity světelného paprsku (je dána počtem fotonů za čas) po průchodu vrstvou obsahující měřenou látku. Tento pokles je úměrný koncentraci stanovované látky. Protože absorbance závisí také na tloušťce vrstvy, jsou rozměry měřicího prostoru limitujícím faktorem.

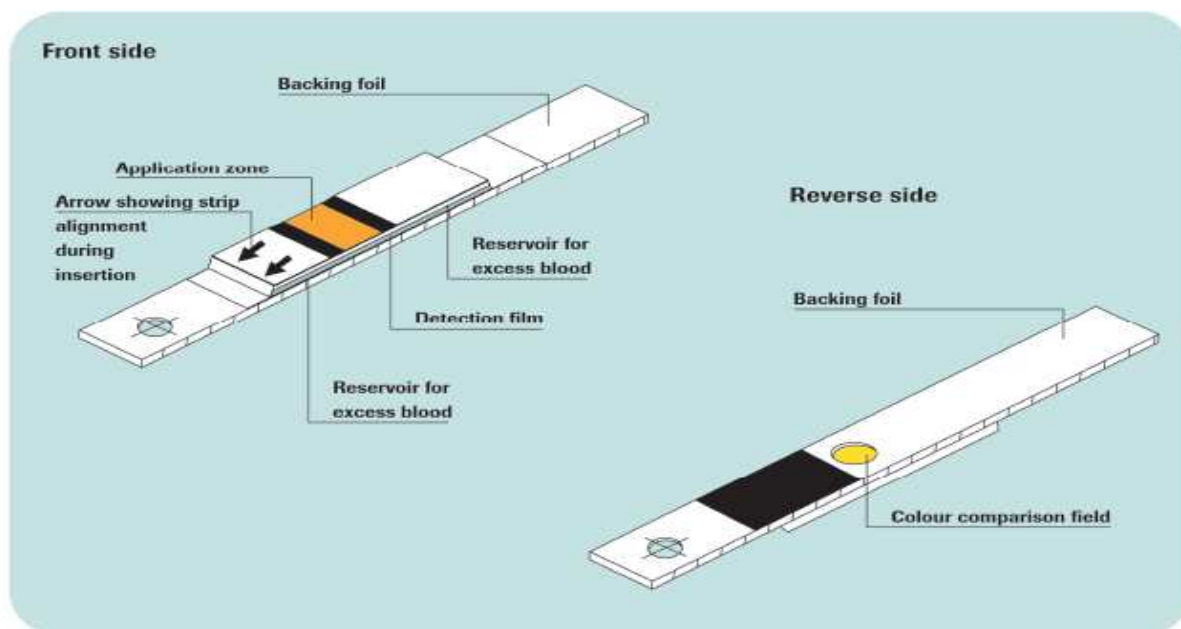
V praxi se používá absorbance A úměrná koncentraci (extinkční koeficient ε je konstantou úměrnosti). Vztah vyjadřuje Lambert-Beerův zákon:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c,$$

kde l je tloušťka proměřované vrstvy a c koncentrace stanovované látky. To vše je měřeno při dané vlnové délce λ .

Reflektivní techniky jsou založeny na odrazu světla od vhodného povrchu nebo od opticky hustšího média.²⁵

Fotometrické měření probíhá vždy po osvětlení světlem. Obvykle se používá tenký paprsek v úzkém rozmezí vlnových délek, například z diody emitující záření. Část rozptýleného odraženého záření dorazí k fotodetektoru a je přeměněna na elektrický proud odpovídající velikosti.¹⁷ Jako detektory pro měření intenzity světla jsou nejcitlivější fotonásobiče. O něco méně citlivým detektorem jsou fotodiody.²⁵ Produkt reakce není nijak ovlivněn měřením, protože to samotné probíhá na čistě fyzikálním principu.¹⁷

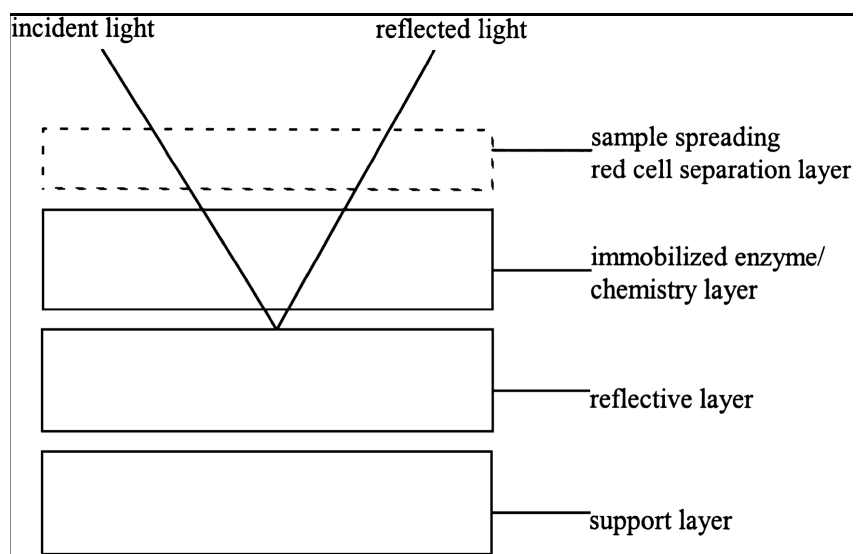


Obr. 10: Příklad fotometrického proužku, Accu-Chek Active. Měření probíhá pomocí okénka na spodní části proužku („colour comparison field“). Na vrchní straně proužku se nachází rezervoár na krevní vzorek, pod ním suchá vrstva chemikálií a dále potisk ve tvaru šipek, který ukazuje, jak má být proužek zasunut do glukometru.

Oblast potisku chemické vrstvy vymezuje objem vzorku potřebného k analýze. Vrstva chemikálií na proužku je ve srovnání s vrstvou vzorku zanedbatelná. Závislost intenzity zabarvení na tloušťce proměřované oblasti se chová podle tzv. křivky nasycenosti. To znamená, že nad určitou hranicí už je intenzita zabarvení nezávislá na tloušťce vrstvy vzorku.

Jedním z problémů testovacích proužků využívajících pro stanovení glykémie optické metody je zanesení měřicí komůrky vrstvou červených krvinek. Tomu se dá zabránit tím, že se nad vrstvou chemikálií upevní filtrační membrána. Toto řešení ale zároveň v případě měření absorbcí způsobuje, že se k proměření musí použít záření o dvou různých vlnových délkách, aby tak došlo ke korekci způsobené pozadím.¹⁷

Vedle měření absorbcí se u fotometrických glukometrů uplatňuje i měření odrazu a rozptylu záření. Takové glukometry měří odraz záření od reflektivní vrstvy natištěné na proužku. Změny v této vrstvě jsou opět způsobeny redox změnami způsobenými enzymovými reakcemi mezi glukózou obsaženou v krvi a enzymem GOx, který je imobilizován na proužku.



Obr. 11: Obecné schéma konstrukce testovacího proužku používajícího pro stanovení glykémie měření odrazu světelného paprsku.

Vztah mezi koncentrací analytu a odrazem světelného paprsku je dán Kubelka-Munkovým vztahem:

$$\frac{c \cdot \alpha \cdot K}{S} = \frac{(1 - R)^2}{2 \cdot R},$$

kde c je koncentrace stanovované látky, K je absorpční koeficient, S koeficient rozptylu a R je tzv. remisní stupeň naměřený na remisním spektrofotometru.²⁸

5. Měření a manipulace s osobními glukometry

Optimální kontrolou metabolismu diabetika je v současnosti pravidelné měření glykémie a udržování této hodnoty v optimálním rozmezí. Tento typ terapie vyžaduje informovaného pacienta, který je schopen přesné práce s osobním glukometrem i provizorního zásahu v případě zdravotních potíží. Tento „self-monitoring“, sestávající z měření koncentrace glukózy v krvi a následného užití inzulínových injekcí, by měl být podle doporučení American Diabetes Association (ADA) prováděn minimálně třikrát denně v závislosti na aktuálním zdravotním stavu pacienta.

Pro efektivní měření glukózy pomocí osobních glukometrů je nutno zajistit splnění tří základních podmínek:

- přesvědčit pacienta s cukrovkou o důležitosti pravidelného měření glykémie,
- vzdělat pacienta v práci s glukometrem a v souvislosti s výsledkem měření nasadit vhodnou léčbu,
- zajistit adekvátní kvalitu analytického měření při práci s glukometrem.

Kvalita stanovení glykémie má důležitý dopad na efektivitu diabetické kontroly. Špatné provedení analýzy osobním glukometrem může vést k nesprávnému nadávkování inzulínu nebo až k hypoglykemickému záchvatu.²⁹

V dnešní době se lze na trhu setkat s mnoha typy osobních glukometrů. Pacient si může vybrat přístroj, který mu nejvíce vyhovuje a může se při koupi řídit mnoha kritérii. Nejdůležitějším kritériem je pravděpodobně objem potřebného vzorku pro měření.³⁰ Dále jsou to kritéria týkající se velikosti přístroje, jeho doba měření, jak je softwarově vybavený (možnost propojení s PC) a nezanedbatelné jsou i finanční aspekty. Některé typy jsou z větší části hrazené pojišťovnou, některé nikoliv. To platí i pro balení testacích proužků.²⁰

5.1 Odebrání a proměření vzorku krve

Většina glukometrů umožňuje měření v rozmezí od 0,6 do 33 mmol/l (při extrémně vysokých nebo nízkých hodnotách je namísto měření zopakovat pomocí kalibračních proužků, které jsou součástí glukometru, a je vhodné informovat lékaře). Nejrychlejší přístroje změří glykémii za pouhých 5 - 15 sekund, délka měření nepřesahuje 1 minutu. Moderní glukometry

jsou vybaveny pamětí v různém rozmezí, jsou napojitelné na počítač a mají nejrůznější vyhodnocovací PC programy. Dále se glukometry liší doplňkovou výbavou (odběrové pero, baterie, pouzdro, prostředky pro údržbu a kontrolu přístroje).³⁰

Pro měření stačí pouze kapka krve. Ta je obvykle získána ze zevního okraje špičky prstu ruky (alternativně i z jiného místa na těle). Doporučuje se provádět odběr ze třetího nebo čtvrtého prstu té ruky, kterou pacient nepíše.²⁰ Hodnota glykémie v krvi v konečku prstu se blíží hodnotě glykémie v krvi arteriální. Vzhledem k vysoké hustotě nervových zakončení v těchto oblastech není však odběr pro pacienta nijak příjemný a to bývá často překážkou častějších měření. U malých dětí je kapka odebírána z paty.

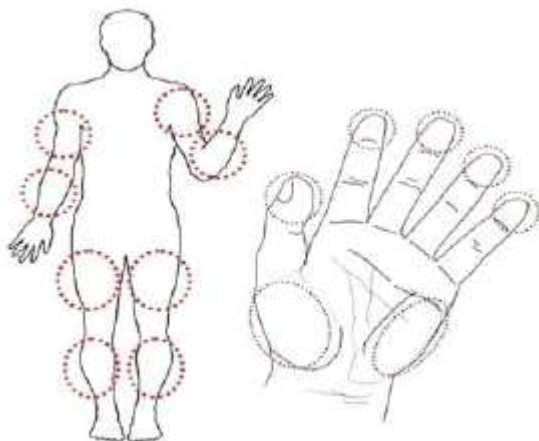
Limitujícím faktorem pro odběr z jiných míst těla, kde je méně nepříjemný, bylo množství krve potřebné pro vyhodnocení vzorku. Vzhledem k malému objemu takto získané krve ($\leq 0,3 \mu\text{l}$) bylo využití alternativních míst odběru donedávna nepraktické, někdy přímo nemožné. Zlom přinesl až vývoj glukometrů schopných měřit glykémii ve vzorku o objemu $0,3 - 2,6 \mu\text{l}$, které umožnily odběr z předloktí, paží, břicha, stehů a lýtek. Přibližná velikost kapky krve o tak malém objemu je znázorněna na níže uvedeném obrázku.¹⁶

Místo odběru krve se nedezinfikuje. Ideální je pouze toto místo omýt mýdlem a teplou vodou, která zlepšuje prokrvení. Mýdlo částečně dezinfikuje a částečně odmašťuje, kapka se tak nebude roztékat. Před vpichem se musí dbát na to, aby místo odběru řádně oschlo a nedošlo tak ke smísení krve s vodou, což by vedlo ke zředění vzorku a ke zkreslení výsledků.



Pro odběr krve existují speciální pomůcky (lacenty), které jsou založeny na principu jehly na pružině. Jejich použití je jednoduché a dodávají se většinou v sadě spolu s glukometrem a testovacími proužky. U těch modernějších lze nastavit i hloubku vpichu. Jehla většinou není vidět (je schovaná pod koncovou špičkou ve tvaru kužele), což zabraňuje nechtěnému poranění. Vpich je pouze povrchní, nevytvoří se modřina.²⁰

Frekvence měření glykémie je vysoce proměnlivou veličinou. Potřeba měřit hodnotu glukózy v krvi bude jiná u diabetiků I. i II. typu. Zvláštní režim pak musejí mít například těhotné diabetičky.³⁰



Obr. 12a



Obr. 12b

Obr. 12a: Zobrazení míst na ruce a alternativních míst na zbytku těla vhodných k odběru vzorku krve pro změření hodnoty glykémie.

Obr. 12b: Sada glukometru OneTouch Ultra (Johnson&Johnson) obsahující glukometr, lacentu, sadu testovacích proužků, baterie a kalibrační roztok.

5.2 Přesnost a správnost při měření s osobními glukometry

Přesnost výsledků měření závisí jak na analytickém provedení glukometru, tak na zkušenosti osoby, která s ním manipuluje.²⁹ Kvalitní testovací proužek glukometru by měl být kvalitně nakalibrován už samotným výrobcem. Kalibrace by měla stabilně vydržet po celou dobu použitelnosti proužku. Při sebemenší pochybnosti o nepřesnosti výsledků by měl mít uživatel možnost přesvědčit se o přesnosti měření pomocí kalibračního roztoku, který je výrobcem dodáván společně s glukometrem.²⁷ Kalibrace spočívá ve vystavení glukometru různým standardním roztokům o známé koncentraci glukózy. Kalibrační body by měly uzavírat pracovní oblast senzoru a vymezovat tak limit detekce glukózy.²⁵

Každý analytický přístroj pracuje s nějakou chybou, větší či menší. Osobní glukometry nejsou výjimkou. Tyto chyby jsou dány vnějšími podmínkami, podmínkami uvnitř roztoků, použitou analytickou metodou i samotným uživatelem měřicího zařízení. Chyba glukometru je počítána jako rozdíl mezi koncentrací glukózy měřené daným glukometrem a koncentrací, která je obdržena analýzou stejného vzorku pomocí kontrolního laboratorního přístroje. Tato chyba je vyjádřena v procentech proti naměřené laboratorní hodnotě:

$$\text{Chyba přístroje} = \frac{([\text{Gluk}]_{\text{metr}} - [\text{Gluk}]_{\text{lab}})}{[\text{Gluk}]_{\text{lab}}} \cdot 100 \%$$

Velikost přípustné chyby je stále objektem mnoha diskuzí. ADA doporučuje, aby byla chyba glukometrů nižší než 5 %. Doporučení jiných organizací jsou o něco méně přísná. Podle National Committee a Laboratory Standards Institute by měla být přípustná chyba $\pm 20\%$ pro koncentraci glukózy vyšší než 100 mg/dl a $\pm 10\%$ pro koncentraci nižší než 100 mg/dl.

ISO (International Organization for Standardization) v roce 2003 uvedla, že pro koncentraci glukózy větší než 76 mg/dl, by mělo být 95 % výsledků v rozmezí $\pm 20\%$ této hodnoty, zatímco v případě koncentrace nižší než 76 mg/dl by měly výsledky spadat do rozmezí $\pm 15\%$ mg/dl.

Podle provedených testů několika vědeckých týmů bylo zjištěno, že všechny nejpoužívanější glukometry se svojí chybou vejdou do 10 % podle výše zmíněného vzorce.

Pokud je pacient trpící cukrovkou v kontaktu s některou vybranou diabetickou klinikou nebo lékařem, měl by po zakoupení glukometru v případě pochybností o jeho správné funkci požádat o srovnání s analyzérem používaným na klinice.²⁹

5.2.1 Vliv teploty na měření

Teplotní závislost při měření s biosenzory působí jednak na difúzní jevy, jednak na probíhající chemické reakce.²⁵ Difúzí se v našem případě myslí pohyb částic směrem k měrné elektrodě. Při změně teploty tak dochází ke změně difúzní rychlosti částic i ke změně elektrického proudu. Glukometr obvykle obsahuje teplotní senzor a měl by být schopen přepočítávat hodnotu glukózy v závislosti na vnější teplotě. Tento korekční mechanismus ovšem nemůže správně pracovat, pokud bude rozdílná vnější a vnitřní teplota přístroje. To znamená, že každý glukometr by se měl před měřením ponechat minimálně 30 minut temperovat v místě, kde bude měření probíhat. Nicméně přesná doporučení pro používání konkrétních glukometrů a pro závislost jejich měření na teplotě by měla být vždy uvedena v příbalovém letáku nebo návodech k použití.¹⁷

5.2.2 Interferující látky

Odezva senzoru by měla být vyvolána pouze přítomností stanovované látky, tedy glukózy, ostatní látky přítomné ve vzorku by se neměly projevit. V laboratorních podmínkách jsou tyto rušivé látky často eliminovány zředěním roztoku nebo konverzí na nerušící sloučeniny, to u testačních proužků na jedno použití není konstrukčně dost dobře možné, proto se zde využívá spíše metod oddělení těchto látek selektivní bariérou, volí se vhodný měřicí potenciál nebo se jejich příspěvek k měřenému signálu určuje paralelně jiným

senzorem. Jak už bylo zmíněno výše (3.2), lze to provést s dvojicí měřicích elektrod, přičemž pouze jedna z nich je pokryta selektivním enzymem (GOx) a druhá slouží jako referenční prvek.²⁵

Nejvíce interferující látkou při stanovení glukózy je kyselina askorbová, méně pak kyselina močová. Dále to pak mohou být látky z řad sacharidů jako je například maltóza, xylóza nebo galaktóza, které se sice v krvi zdravého člověka nevyskytují, ale mohou být přítomny v některých medikamentech. Je proto důležité, aby si uživatel glukometru pozorně přečetl příbalový leták příslušné sady testovacích proužků a zamezil tak špatnému vyhodnocení glykémie.¹⁷

Kyselina askorbová ruší při veškerých stanoveních, kde je konečnou fází amperometrická detekce peroxidu vodíku. Tomu se dá zabránit předřazením membrány s askorbát oxidázou nebo nahrazení hexakyanoferritanového mediátoru nějakou jinou látkou, která by nereagovala s přítomným askorbátem.²⁵ Tím je například ferrocen, kterému přítomnost interferujících látek nijak nevádí.²⁷

Interference *kyseliny močové* se může projevit po intenzivní tělesné zátěži, kdy dochází ke zvýšení její koncentrace v krvi. Dalším faktorem, který zvyšuje její hladinu, je přijímání stravy bohaté na bílkoviny.

Obecně lze tedy říci, že výsledky glykémie jsou nejpřesnější jen v tom případě, když je krev proměřována u lačného pacienta.³¹

6. Budoucnost osobních glukometrů

Lék na diabetes, který by eliminoval veškerou potřebu monitorování glykémie, je zatím v nedohlednu (největší úspěchy prozatím skýtá výzkum transplantace pankreatických buněk) a proto bude nutno vyvíjet spolehlivé glukometrické senzory ještě velmi dlouho.¹⁷

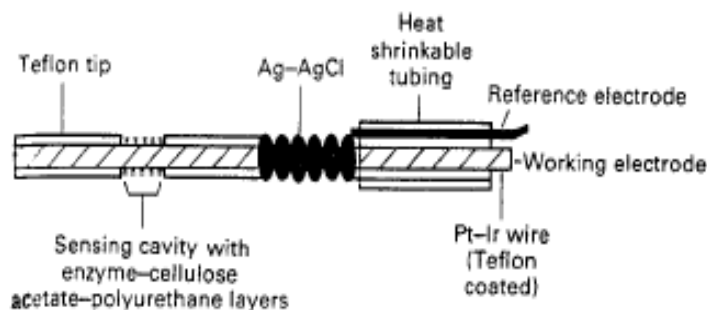
Konec 20. století znamenal obrovský pokrok pro monitorování glykémie pomocí osobních glukometrů. „Self-monitoring“ umožnil mnoha lidem trpícím cukrovkou přiblížit se co nejvíce normálnímu životu. Avšak ani tento systém měření hladiny glukózy v krvi není dokonalý. Během 24 hodin je počet provedených kontrol omezený časovým rozvrhem pacienta. Navíc toto testování opomíjí noční kolísání koncentrace krevního cukru. Pro lepší glykemickou kontrolu, tzn. větší frekvenci měření, je ideální měření pomocí kontinuálních *in vivo* biosenzorů. První aplikace tohoto zařízení byla demostrována už v roce 1982. Dnes jsou zkoumány hlavně přístroje kombinující kontinuální monitorování spojené s automatickým dávkováním inzulínu.²²

Metody kontinuálního měření glykémie se dělí do tří skupin podle stupně porušení kožního krytu:

- *Invazivní monitorování* kdy je senzor zaveden do podkoží nebo do krevního řečiště.
- *Semiinvazivní* (minimálně invazivní) *monitorování* kdy se měří koncentrace krevního cukru v intersticiální tekutině velmi tenkou jehlou nebo v tekutině vysávané přes mikrootvory v kůži získané např. laserem nebo ultrazvukem.
- *Neinvazivní monitorování* je měření bez porušení kožního krytu. Toto měření využívá metod amperometrie nebo měření impedanční spektroskopií rádiových vln. Metody neinvazivního měření mají však ještě mnoho chyb a jsou předmětem intenzivního výzkumu.³²

6.1 Kontinuální invazivní měření glykémie

Dnes se setkáváme hlavně s podkožním implantovatelným zařízením „jehlového“ typu. V principu jde opět o elektrodu a měření glukózy je prováděno elektrochemicky s využitím enzymu GOx. Tento biosenzor je navržen pro několikadenní činnost a jeho



Obr. 13: Znárodnění jehlové podkožní elektrody pro kontinuální monitorování glukózy v krvi.

následná výměna je poměrně jednoduchá, takže může být provedena samotným pacientem. Doba životnosti glukometru je řádově v rozsahu 3 dnů až jednoho týdne (záleží na typu přístroje) a nabízí měření glukózy v krvi každých 5 minut s možností ukládání dat do paměti přístroje pro pozdější potřeby konzultace s lékařem. Propojení s osobním počítačem a zobrazení hodnot pomocí grafu je zde už nutností.²²



Obr. 14a

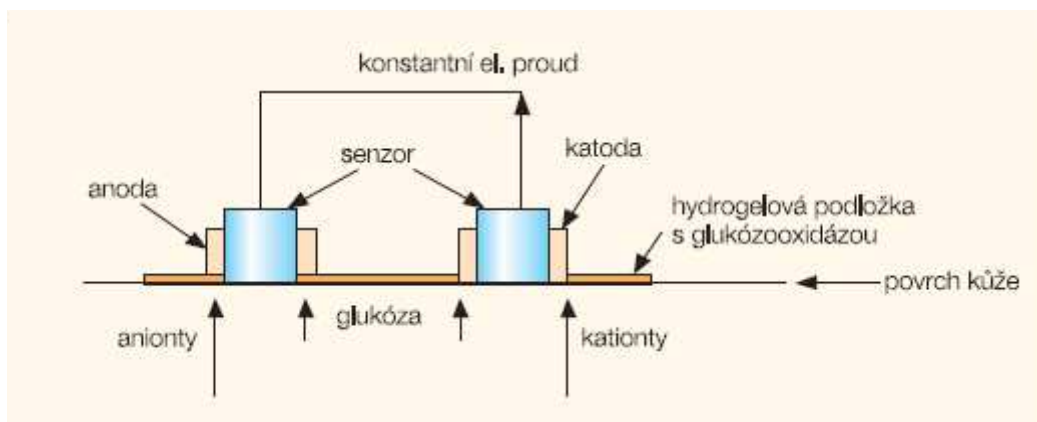


Obr. 14b

Obr. 14a: CGMS Gold, Medronic Minimed, senzor zavedený do podkoží břicha a připojený k monitoru kabelem.

Obr. 14b: Inzulínová pumpa Minimed 508 a monitor CGMS, Medronic Minimed.

Mezi semiinvasivní metodu pro kontinuální měření lze zařadit systém založený na principu reverzní iontoforézy. Elektrický proud probíhající mezi dvěma elektrodami přiloženými na kůži přivádí intersticiální tekutinu k povrchu a zde z ní glukóza přestupuje do hydrogelového polštářku obsahujícího GOx, kde probíhá obvyklá reakce. Poslední verze přístroje tohoto typu zobrazí aktuální stav glykémie každých 10 minut. Určitým nedostatkem zařízení je relativně dlouhá iniciační doba, časté podráždění kůže a výpadky měření při pocení a chladu.¹⁶



Obr. 15: Schéma principu reverzní iontoforézy.

6.2 Kontinuální neinvazivní měření glykémie

S přihlédnutím k moderním analytickým metodám existuje mnoho potenciálních způsobů pro neinvazivní monitorování glykémie. Mezi ty nejdiskutovanější patří:

- Přímé měření glukózy v intersticiální tekutině nebo potu. V tomto směru je možné využít současné konvenční měřicí techniky.
- Měření skrz kůži s využitím IČ spektroskopie. Ta už byla úspěšně použita např. pro měření mozkového oběhového systému – mozkovou hemodynamiku, kdy se sledovala oxidovaná forma hemoglobinu. Sledování glykémie by probíhalo na podobném principu.
- Fluorescenční nebo radiofrekvenční spektroskopie.
- Pulsní laserová fotoakustická spektroskopie.
- FIR spektroskopie (spektroskopie ve vzdálené infračervené oblasti). Tato technika monitoruje FIR záření emitované tělem.
- Analýza dechu prováděná pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí vydechovaných komponentů.

Firma Pendragon (Zurich, Švýcarsko) vyvíjí neinvazivní monitorovací systém, který využívá impedanční spektroskopii k měření změn na povrchu pokožky souvisejících s hladinou glukózy v těle. Zařízení Pendra zaznamenává, jak změny ve složení krve ovlivňují povrchový odpor pokožky a podkožní vrstvy. Zařízení má podobu klasických náramkových hodinek.²³



Obr. 16: Neinvazivní kontinuální glukometr Pendra

Slibnými se také zdají být fluorescenční metody, které využívají různých mediátorů měnících s koncentrací glukózy své fluorescenční vlastnosti. Některé přístroje již byly

testovány na zvířatech, fluorescenční změny podkožně zavedených senzorů jsou snímány speciálním zařízením transdermálně.

Významným krokem je objevení autofluorescenčních vlastností NADPH (narozdíl od nefluorescenčního NADP), které potenciálně umožňují neinvazivní transdermální monitorování glykémie. Studie *in vitro* prokázaly u některých buněk možnost detekce koncentrace glukózy na nitrobuněčné úrovni.¹⁶

Závěr

Už uplynulo více než 40 let od představení Clarkova a Lyonsova konceptu enzymové elektrody pro elektrochemické stanovení glukózy. Vynikající potenciál dalšího vývoje enzymových biosenzorů, a z něj plynoucí ekonomické vyhlídky, způsobily velký zájem mnoha výzkumných týmů. A tak jsme mohli být svědky toho, že v průběhu čtyř posledních desetiletí bylo na světový trh uvedeno mnoho přístrojů schopných stanovit koncentraci glukózy s využitím specifických enzymových reakcí.

Přesné, rychlé a hlavně spolehlivé reakce specifického enzymu s glukózou se záhy začalo využívat v medicíně, kde měření koncentrace krevní glukózy pomocí malých přenosných a snadno ovladatelných glukometrů znamenalo obrovské usnadnění při sledování glykémie u pacientů trpících cukrovkou. Ti si mohli nyní sami provádět pravidelné kontroly v pohodlí vlastního domova, tzv. „self-monitoring“, a tomu uzpůsobovat dávkování inzulínu.

Všechny současné glukometry vycházejí z konceptu nanesení kapičky krve na měřicí plošku reagenčního proužku, který je zasunutý do plastového glukometru. Ten odečte měřený signál a následně podle něj na displeji zobrazí hodnotu glykémie testované krve. Ovšem se stále se zvyšující poptávkou po kvalitním a hlavně permanentně pracujícím přístroji pro stanovení glukózy se dnes celosvětově rozšířené osobní glukometry brzy ztratí ve stínu nově vyvíjených kontinuálních „*in vivo*“ systémů pro měření glykémie zkombinovaných s automatickými dávkovači inzulínu.

Seznam použité literatury a internetových zdrojů:

- 1) <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glukóza> (14. 3. 2009)
- 2) <http://glukosa.navajo.cz/> (14. 3. 2009)
- 3) http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/glukosa.html (14. 3. 2009)
- 4) <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glykemie> (16. 3. 2009)
- 5) <http://www.labtestsonline.cz/tests/Glucose.html?lnk=2> (16. 3. 2009)
- 6) <http://www.diabetes.cz/> (16. 3. 2009)
- 7) http://cs.wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus (16. 3. 2009)
- 8) Kotzian, P.: *Elektrochemické biosenzory*, elektronický odkaz na <http://www.peta.unas.cz/biosenzory/index.htm> (19. 4. 2009)
- 9) Ferancová, A., Labuda J.: *Elektrochemické biosenzory*, 69-88, Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Bratislava (2006)
- 10) Uhrová, H.: *Biosenzory*, 1-10; Praha (2004)
- 11) <http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektroda> (19. 4. 2009)
- 12) Štefan, P.: *Potenciostat pro elektrochemické analýzy*; Praha (2001)
- 13) Doležalová, V. a kolektiv autorů: *Principy biochemických vyšetřovacích metod, I. část*; 15-16, 19, 74-78; Brno (1995)
- 14) Králová, B., Rauch, P.: *Bioanalytické metody*; 1995; 49-51, 64-65, 76, 80-82, 89; Praha (1995)
- 15) <http://www.medista.cz/menu.php?id=24> (21. 4. 2009)
- 16) Brož, J.: *Současné možnosti monitorování glykémie*; 178-185; Remedia, Praha (2006)
- 17) Hönes, J., Müller, P., Surridge, N.: *The technology behind glucose meters: Test strips*; *Diabetes Tech. & Therap. (10)* 2008; 10-26
- 18) <http://cs.wikipedia.org/wiki/NADH> (19. 4. 2009)
- 19) <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glukometr> (21. 4. 2009)
- 20) <http://www.gymfry.cz/zmp0304/nemec/pod/clanky/glykemie.htm> (21. 4. 2009)
- 21) <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/129809-glukometr> (21. 4. 2009)
- 22) Wang, J.: *Glucose biosensors: 40 Years of Advances and Challenges*; *Electroanalysis* 2001 (13); 983-988
- 23) Newmann, D. J., Turner, P.F.: *Home blood glucose biosensors: a commercial perspective*; *Biosensors and Bioelectronics* 2005 (20); 2435-2453
- 24) Skládal, P., Macholán, L.: *Biosenzory – současný stav a perspektivy*; *Chemické listy (91)* 1996; 105-113

- 25) Skládal, P.: *Biosenzory*; 3-10, 23-25, 34, 44-45; Brno (2002)
- 26) Bartoš, M., Páčová, E., Prchalová, I., Kovářová, K.: *Stanovení glukózy průtokovou analýzou s elektrochemickou detekcí*; Monitorování cizorodých látek v životním prostředí 2002 (V); 11-18
- 27) Magner, E.: *Trends in electrochemical biosensors*; Analyst 1998 (123); 1967-1970
- 28) D'Orazio, P.: *Biosensors in clinical chemistry*; CCA 2003 (334); 41-69
- 29) Solnica, B., Naskalski, J. W.: *Quality Control of Self-Monitoring of Blood Glucose: Why and How?*; Journal of Diabetes Science and Technology 2007 (1)
- 30) Rybka, J.: *Monitoring glykemického stavu – základní kámen kontroly kompenzace diabetu v ordinaci PL*, Medicína pro praxi 2008 (5); 362-366
- 31) <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text1.htm> (7. 5. 2009)
- 32) Kudlová, P., Chlup, R.: *Selfmonitoring u osob s diabetem*, Interní Medicína 2006 (12); 539-544