

DETERMINAZIONE DELLA GLICEMIA

Gli zuccheri

I monosi sono composti non idrolizzabili che contengono da 3 a 7 atomi di carbonio (triosi, tetrosi, pentosi, esosi, eptosi) e sono derivati aldeidici (aldosi) o chetonici (chetosi), di alcoli polivalenti. Un aldoso contiene nella sua molecola una funzione aldeidica -CHO, e più funzioni alcoliche; un chetoso contiene una funzione chetonica C=O e più funzioni alcoliche.

La presenza del gruppo aldeidico o chetonico nella molecola di un monoso è responsabile della proprietà chimica più spiccata di tali composti ossia del loro potere riducente. Il gruppo carbonilico infatti, come quello delle aldeidi e dei chetoni, cede facilmente elettroni ad un opportuno accettore, ossidandosi a gruppo carbossilico. Le reazioni di ossidazione dei monosi non possono definirsi reazioni "caratteristiche" di tali composti: queste reazioni infatti sono comuni anche ad alcuni disaccaridi che pertanto si dicono riducenti.

Per quanto riguarda i metodi per determinare la glicemia sono da ritenersi del tutto abbandonati quelli chimici che utilizzano il glucosio come agente riducente.

I metodi largamente diffusi attualmente sono più specifici e fanno ricorso a reazioni enzimatiche. Il metodo utilizzato in questa esercitazione utilizza la glucosio-ossidasi e perossidasi.

La glicemia

Negli animali risulta di estrema importanza il mantenimento dei livelli ematici di glucosio entro limiti piuttosto ristretti, condizione particolarmente importante per il corretto funzionamento del sistema nervoso. Naturalmente i livelli di glucosio nel sangue variano a seconda dello stato nutrizionale. Si considerano normali valori di glucosio compresi tra 75 e 120 mg/dl. Subito dopo il pasto il livello può raggiungere 120 mg/dl. In risposta entrano in gioco meccanismi di omeostasi per promuovere l'ingresso del glucosio nelle cellule e il suo utilizzo da parte dei tessuti. Analogamente quando parecchie ore dopo il pasto i livelli di glucosio diminuiscono il mantenimento del livello normale viene garantito dai meccanismi che promuovono il rilascio di glucosio dalle scorte intracellulari di glicogeno e dalla gluconeogenesi.

Il meccanismo omeostatico che regola la concentrazione del glucosio nel sangue è mediato da diversi ormoni che sono in grado di agire sul metabolismo del glucosio, fra questi l'insulina che tende ad abbassare la concentrazione del glucosio ematico mentre altri ormoni tendono ad aumentare la sua concentrazione sia in condizioni normali che patologiche come nel digiuno protratto e nello stress (ormone della crescita, glucagone, glicocorticoidi e adrenalina).

Metodo enzimatico per la determinazione della glicemia

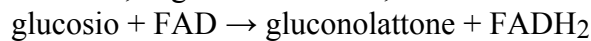
La determinazione, con metodi semplici e specifici, del glucosio nei liquidi biologici è stata a lungo oggetto di ricerca.

Dopo i primi metodi utilizzando il sistema GOD-POD (Glucosio Ossidasi- Perossidasi) le ricerche sono continuate con lo scopo di evitare l'uso di sostanze tossiche. Il metodo utilizzato in queste prove si basa sull'utilizzo di un sistema cromogeno con alte caratteristiche di stabilità e specificità.

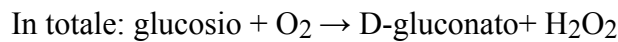
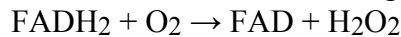
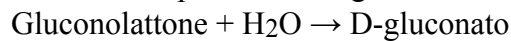
Principio

Il campione di siero contenente glucosio è trattato con il reattivo glucosio ossidasi-perossidasi contenente idrossibenzoato 4-aminoantipirina.

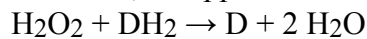
Il metodo è basato sull'ossidazione del glucosio a gluconolattone ad opera di un enzima flavinico, la glucosio-ossidasi, il cui coenzima FAD si riduce:



Il gluconolattone si idrolizza spontaneamente a D-gluconato mentre il coenzima ridotto viene riossidato a spese dell'ossigeno atmosferico con formazione di H_2O_2



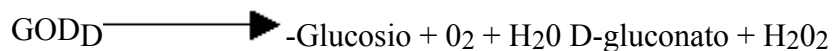
Se al sistema si aggiunge la perossidasi, è possibile ossidare, a spese dell'acqua ossigenata formata, un opportuno riducente secondo la reazione:



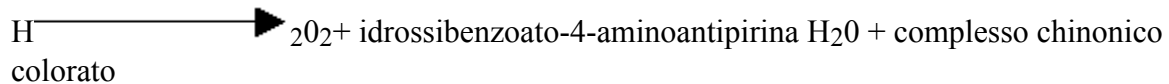
Scegliendo il riducente in modo che la sua forma ossidata abbia un colore diverso da quello della forma ridotta, le due precedenti ossidoriduzioni enzimatiche determineranno un cambiamento di colore nella soluzione analizzata. Poiché la glucosio-ossidasi ossida solo il glucosio, non ci sono interferenze di altri zuccheri riducenti eventualmente presenti nel campione e quindi l'intensità del colore sviluppato è direttamente proporzionale alla quantità di glucosio presente nel campione.

Reazione

La glucosio ossidasi (GOD) ossida il glucosio secondo la seguente reazione:



PEROSSIDASI



Reagenti

Tampone fosfato pH 7,5

Glucosio ossidasi (*Aspergillus niger*)

Perossidasi (rafano)

4-Aminoantipirina-Idrossibenzoato-Na

Procedimento

Condizioni di reazione

In diverse provette distribuire:

	Campioni- standard	Reattivo	Abs 510mm
Provetta 1	0.02ml H ₂ O	2.5ml	
Provetta 2	0.02ml St1 (0.25mg/ml)	2.5ml	
Provetta 3	0.02ml St2 (0.5mg/ml)	2.5ml	
Provetta 4	0.02ml St3 (1mg/ml)	2.5ml	
Provetta 5	0.02ml St4 (2mg/ml)	2.5ml	
Provetta 6	0.02ml soluzione incognita glucosio	2.5ml	
Provetta 7	0.02ml soluzione incognita galattosio	2.5ml	

Miscelare ed incubare per 30 minuti a 25°C o 15 minuti a 37°C. successivamente leggere l'assorbanza a 510nm.

Risultati

Costruire una curva di calibrazione riportando in grafico sulle ordinate i valori di assorbanza (Abs) e sulle ascisse le concentrazioni degli standard.

Ricavare quindi i valori delle incognite dal grafico e convertire il valore ottenuto in mg/ml.