

VYŠETŘENÍ METABOLISMU SACHARIDŮ. DIABETES MELLITUS

Témata k zopakování

Metabolismus glukosy. Glykemie a její regulace, glukosový toleranční test (glykemická křivka). Poruchy metabolismu sacharidů, glukosurie a jiné redukující cukry v moči. Neenzymová glykace proteinů.

Úvod

Základní biochemickou hodnotou sacharidového metabolismu je stanovení koncentrace glukosy v krvi, plazmě nebo séru. Nejčastějším typem poruchy sacharidového metabolismu je diabetes mellitus (DM). O této poruše lze uvažovat, je-li hladina glukosy nalačno v celé kapilární nebo žilní krvi vyšší než 5 mmol/l a nebo v plazmě či séru vyšší než 6 mmol/l. Na potvrzení diagnózy, není-li určena přímo z hodnoty glykemie*, je používán glukosový toleranční test. Při sledování průběhu diabetu a kontrole terapie využíváme další biochemická vyšetření: kvantitativní stanovení glukosy v moči, ukazatele dlouhodobé glykemie (fruktosamin nebo glykovaný hemoglobin), průkaz mikroalbuminurie a ketolátek v moči.

Diabetes mellitus je onemocnění charakterizované absolutním nebo relativním nedostatkem inzulínu a má několik forem i několik stádií, které je třeba rozlišit jak z důvodů prognostických, tak terapeutických. Podle etiologie se rozlišuje diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu, těhotenský diabetes a další specifické typy diabetu.

Diabetes mellitus 1. typu je polygenní autoimunitní choroba. Je méně častou formou diabetu. Genetická predispozice kombinovaná s určitými vnějšími faktory, jako je virová infekce, toxiny, stres, může navodit prediabetickou fázi onemocnění, která trvá i několik let. V této době dochází k pomalé destrukci β -buněk Langerhansových ostrůvků zprostředkovanou aktivovanými T-lymfocyty a cytokiny, která se projevuje jako *insulitis* (lymfocytová infiltrace ostrůvkových buněk, zánět). Inzulitida postupně snižuje počet funkčních β -buněk, což způsobuje poruchy syntézy a sekrece inzulínu. Diabetes se klinicky manifestuje v době, kdy je autoimunitním zánětem zničeno až 60–70 % pankreatických β -buněk.

Diabetes mellitus 2. typu je způsoben rezistencí na inzulín a/nebo relativním nedostatkem inzulínu (abnormální inzulín, protilátky proti inzulínu). Je převažující formou diabetu. Rezistence na působení inzulínu může být výsledkem sníženého počtu plazmatických membránových receptorů na cílových buňkách nebo následkem postreceptorové blokády nitrobuněčného metabolismu glukosy (snížený počet receptorů nebo snížená afinita; snížená aktivita pyruvátdehydrogenázového komplexu; abnormální převod signálu nebo abnormální fosforylační reakce pro nadměrnou tvorbu TNF_{α}). Stupeň inzulínové nedostatečnosti je odrazem postupné ztráty schopnosti β -buněk reagovat na glukosu.

Těhotenský (gestační) diabetes je porucha, která se objevuje během gravidity. Další typy diabetu mohou provázet některá zánětlivá, endokrinní, genetická a jiná onemocnění.

* Přesnějším a správnějším výrazem pro vyjádření hladiny glukosy v krvi je termín *glukosemie*. Protože však v české odborné literatuře je všeobecně více užíván termín glykemie, použili jsme ho i v tomto skriptu.

Diabetes mellitus (DM, diabetický syndrom)

Příčina	- nedostatečný účinek inzulínu (absolutní deficit při poruše sekrece nebo relativní deficit při poruše jeho působení v periferních tkáních – inzulínová rezistence)
Metabolický důsledek	- porucha metabolismu glukosy, ale též proteinů a lipidů
Klinický nález pro DM	- chronická hyperglukosemie
Mechanismus hyperglukosemie	- snížený transport glukosy závislý na inzulínu (GLUT 4) - pokles utilizace glukosy v játrech (glykolýza) - zvýšená glukoneogeneze - zvýšená jaterní glykogenolýza

Základní klasifikace*	DM 1. typu	DM 2. typu
Prevalence	15–20 % diabetiků	~ 80–85 % všech diabetiků
Dřívější označení	inzulín-dependentní (IDDM)	noninzulín-dependentní (NIDDM)
Příčina	autoimunitní destrukce β buněk	inzulínová rezistence a/nebo porucha sekrece inzulínu
Nedostatek inzulínu	absolutní	relativní
Koncentrace inzulínu	nízká nebo nepřítomen	normální, často i zvýšená
Věk manifestace	dětství, mládí	obvykle po 40. roce
Nástup choroby	akutní	postupný
Tělesná stavba	astenický typ	často obézní
Sklon ke ketóze	značný	obvykle ne
Dědičnost	genetická predispozice	genetická predispozice
Typické klinické příznaky	únava, polyurie, polydipsie (pocit žízně), polyfagie (pocit hladu)	únava, prodloužené hojení ran, bakteriální infekce kůže, neuropatie

*Další základní typy DM: Gestační DM a porucha glukosové tolerance (prevalence u 2 % těhotných žen; komplikace pro plod; riziko vzniku DM 2. typu u ženy v pozdějším věku). Ostatní specifické typy DM (příčiny: genetické defekty β -buněk nebo inzulínového receptoru, infekce, indukce léky, chemikáliemi, endokrinopatie, imunitně podmíněný, ...).

Enzymové stanovení glukosy v séru

a) Oxidační kopulací s enzymy glukosaoxidasou a peroxidasou

Glukosa se oxiduje vzdušným kyslíkem za katalýzy glukosaoxidázou (GOD) na δ -lakton glukonové kyseliny a peroxid vodíku:

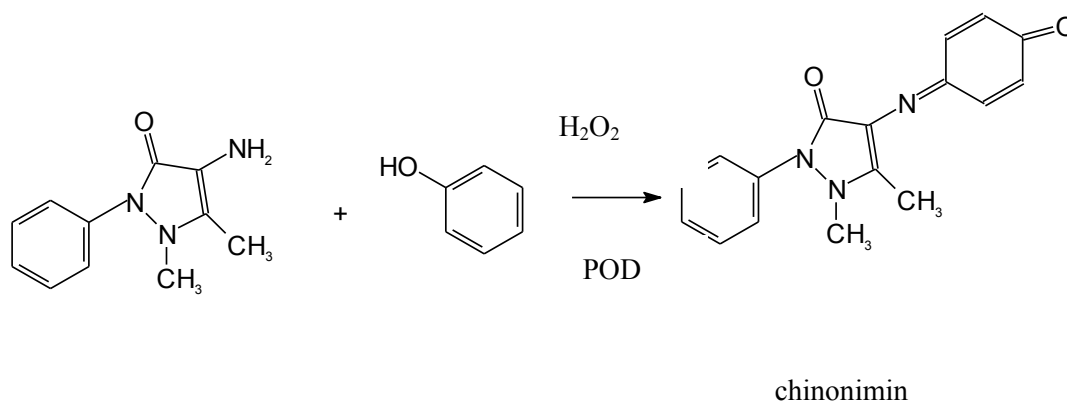


Doplňte vzorce reaktantů a produktů:

Vzniklý peroxid vodíku za katalýzy peroxidázou (POD) oxiduje chromogenní substrát na červeně zbarvený produkt:



Stanovení je příkladem reakcí, které využívají tvorbu peroxidu vodíku v průběhu reakce. Jedná se o tzv. oxidační kopulaci. Jedná se o zvláštní případ kopulace, resp. kondenzace, kdy aromatický amin (nejčastěji 4-aminofenazon /4-aminoantipyrin/) reaguje s oxidovanými aromatickými fenoly nebo aminy za vzniku barevných produktů.



Při dodržení předepsaných podmínek je množství produktu úměrné koncentraci glukosy v analyzovaném vzorku. Reakce je citlivá a rychlá. Výsledné zbarvení se měří buď po ustálení reakční rovnováhy (metoda *end-point*) nebo kineticky.

Vzorky séra nebo plazmy oddělené ihned po odběru se ke stanovení nijak neupravují. Pokud se krev hned nezpracuje, musí se stabilizovat přidávkem NaF.

Proč se ke vzorkům zpracovaným později přidává NaF?

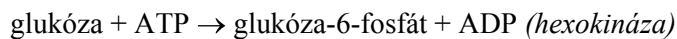
Příklad činidla: fenol 11 mol/l; 4-aminofenazon 0,77 mol/l; glukosaoxidáza 300 μ kat/l; 18,3 μ kat/l),

Vysvětlíte význam všech látek v činidle, která látka chybí (.....).

Jaký bude rozdíl v provedení při použití kinetické a end-point metody?

b) Stanovení s hexokinásou a glukóza-6-fosfátdehydrogenasou

Glukosa je nejprve fosforylována na glukosa-6-P a ten je oxidován glukóza-6-fosfátdehydrogenasou na glukonolakton-6-fosfát:



Uveďte, jak budete sledovat průběh reakce.

c) **Stanovení speciálními analyzátory** určenými jen pro analýzu glukózy (také některé glukometry). Principem je enzymatické stanovení s GOD kotvené na síťce nebo v reakční zóně nasákavého proužku. Vznikající peroxid vodíku se stanovuje ampérometricky. Měří se elektrodová oxidace peroxidu na platinové elektrodě (Clarkova elektroda):



Hodnocení

Pro správné hodnocení glykemie je třeba si uvědomit, že referenční hodnoty se liší podle typu zpracovaného materiálu.

Referenční interval koncentrace glukosy (mmol/l) nalačno u zdravých dospělých

	Venózní	Kapilární
Krev	3,1–5,0	3,3–5,6
Sérum, plazma	3,3–5,6	3,9–6,1

V kapilární krvi jsou hodnoty vyšší než ve venózní krvi, rovněž v odděleném séru nebo plazmě stanovíme koncentrace vyšší než v celé krvi.

Nižší hodnoty ve srovnání s referenčním intervalem se označují jako *hypoglykemie*. Je to patologický stav, při němž organismus nedokáže udržet homeostázu glukosy.

Klinické příznaky hypoglykemie se objevují, když hladina glukosy u dospělých klesá pod 2,8 mmol/l. Hlavním nebezpečím hypoglykemie je nedostatečné energetické zásobení mozku s příznaky jako je pocit

hladu, bolesti hlavy, usínání, mentální zmatenost, halucinace a konečně křeče a kóma. Druhá skupina příznaků pramení z aktivace adrenergního systému a zvýšení sekrece katecholaminů (palpitace, úzkost, chvění, pocení). Z klinického hlediska se rozlišují hypoglykemie vznikající po lačnění a hypoglykemie postprandiální (vzniká po jídle).

Hypoglykemií může vyvolávat řada patologických stavů, např. tumory pankreatu, poruchy v produkci antiinzulinových hormonů, jaterní cirhóza, defekty enzymů metabolizujících glukosu. Příčinou hypoglykemie může být také nepřiměřená dávka inzulínu nebo perorálních antidiabetik.

Vyšší hodnoty v porovnání s referenčními se označují *hyperglykemie*. Nejčastější a současně nejzávažnější příčinou hyperglykemie je DM.

Nižší hodnoty glykemie nacházíme u novorozenců (po narození glykemie klesá, minimum nastává 2 až 4 hodiny po porodu, stejné hodnoty jako těsně po porodu dosahuje za 3 až 5 dní), v těhotenství (hypoglykemie nalačno, po jídle naopak sklony k hyperglykémii - zvýšená rezistence na inzulín), při laktaci, při vagotonii ve spánku a při značné svalové námaze.

Intraindividuální variabilita je u glukózy větší než u většiny ostatních látek stanovených v plazmě, neboť její koncentrace závisí na:

- svalové aktivitě
- časovém odstupu od přijetí potravy (nejvyšší glykémii nacházíme 45 až 60 minut po najedení)
- rovnováze regulačních mechanismů (inzulín versus antagonisté inzulínu)
- druhu vzorku použitým pro analýzu (kapilární nebo venózní krev, plná krev nebo sérum)

Stanovení diagnózy diabetu z hodnoty glykemie

Diabetes je potvrzen, jestliže glykemie přesáhne:

- jednou níže uvedenou kritickou hodnotu a jsou současně přítomny klinické známky diabetu (polyurie, polydipsie, úbytek hmotnosti, ketonurie)
- nejméně dvakrát tuto hodnotu, je-li nemocný bez těchto příznaků

Kritické hodnoty glykemie pro diagnostiku diabetu:

	Plná krev		Plazma	
	venózní	kapilární	venózní	kapilární
Nalačno	7		8	
Kdykoli po jídle	10	11	12	

Orální glukosový toleranční test (oGTT)

Pokud byla zjištěna zvýšená koncentrace glukózy v krevním séru nebo plazmě nalačno v rozpětí 6-8 mmol/l nebo v žilní či kapilární krvi 5-7 mmol/l, je nutné ověřit účinnost regulace přeměny glycidů

funkční zkouškou. Při glukosovém tolerančním testu se hodnotí změny glykemie po zátěžovém podání standardní dávky glukosy perorálně, méně často intravenózně. Při vyšších koncentracích glukosy, zvláště má-li nemocný současně charakteristické příznaky cukrovky, se oGTT neprovádí.

Standardní postup oGTT u dospělých. Tři dny před testem se neomezuje množství glycidů ve stravě. Po nočním lačnění trvajícím 10–14 h se ráno odebere vyšetřovanému vzorek krve. Pak se podá 75 g glukosy v 300 ml čaje a odebere se krev za 1 a 2 h po vypití čaje. Během testu se zachovává tělesný klid, je zakázáno kouřit, jíst a pít.

Hodnocení

Glykemie v kapilární plné krvi* (v mmol/l)

Glukosová tolerance	0 h (nalačno)	1 h po zátěži	2 h po zátěži
Normální	< 6	< 11	< 8
Porušená	> 6	> 11	8–11
Diabetes mellitus	> 7	> 11	> 11

*stejně hodnoty platí i pro venózní plazmu

Nezapadají-li získané tři hodnoty glykemie do jednoho z typů hodnocení, rozhoduje hodnota glykemie nalačno a za 2 hodiny po zátěži.

Získají-li se hodnoty glykemie, které neumožňují jednoznačně hodnotit výsledek oGTT, je vhodné test s několikadenním (až několikátýdenním) odstupem opakovat.

U vyšetřovaných nad 50 let jsou horní hranice referenčních hodnot posunuty o 0,55 mmol/l na každou dekádu. Tolerance na zátěž glukosou je porušena i u jiných onemocnění, zejména jaterních.

- Vyhodnoťte hodnoty oGTT naměřené v praktiku glukometrem a rovněž teoretické údaje zadané asistentem.

Důkaz a stanovení glukosy v moči

Za normálních okolností se v moči vyskytuje v závislosti na složení a příjmu potravy jen nepatrné množství glukosy (případně jiných cukrů: galaktosa, fruktosa, laktosa, maltosa a některé pentosy), které nejsme schopni běžně používanými zkouškami prokázat. O *glukosurii* hovoříme při hodnotách glukosy v moči > 0,8 mmol/l. Glukosurie vzniká při hyperglykemii takového stupně, kdy je překročena maximální schopnost buněk proximálního tubulu resorbovat glukosu z glomerulárního filtrátu. Tato hodnota se obvykle udává kolem 10 mmol/l (tzv. *renální glukosový práh*), může však kolísat v poměrně značném rozmezí (2,8–18 mmol/l). Vzácněji se objevuje *renální glukosurie*, vznikající při nezvýšené glukosemii důsledkem porušené zpětné tubulární resorpce.

Zjištění glukosurie často vede k odhalení diabetu, avšak negativní nález glukosy v moči toto onemocnění nevylučuje. Kvantitativnímu stanovení glukosurie se v poslední době přikládá menší význam, používá se jako doplňkové vyšetření. Má význam pro určení denních ztrát glukosy moči.

Ke zjištění glukosurie lze využít *nespecifickou* zkoušku s Benedictovým činidlem Tyto zkoušky se však používají již jen výjimečně. *Specifický* důkaz glukosy v moči lze provést diagnostickými proužky, např. glukoPHAN.

Ke kvantitativnímu stanovení glukosy v moči se používají stejné metody jako pro stanovení glukosy v séru.

Specifický důkaz glukosy diagnostickými proužky glukoPHAN

Princip důkazu je stejný jako u kvantitativního enzymového stanovení glukosy. Indikační zóna diagnostického proužku obsahuje enzymy (glukosaoxidázu a peroxidázu) a vhodný substrát, který se v přítomnosti vzniklého peroxidu oxiduje na barevný produkt.

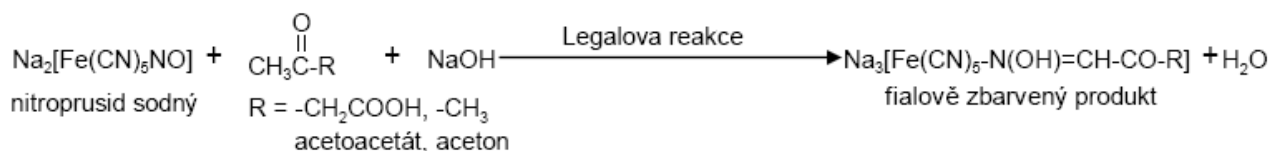
Reakci bude ovlivňovat znečištění zkumavky peroxidem vodíku (Persteril) nebo vysoké koncentrace redukujících látek v moči (kys. askorbová). Jak se ovlivnění projeví?

Využití redukční zkoušky s Benedictovým činidlem: Při podezření na některou z dědičných metabolických poruch sacharidů (např. galaktosemii) požadují novorozenecká oddělení orientační zjištění přítomnosti jiného cukru v moči než glukosy. V laboratoři se provede porovnání glykosurie vyšetřené enzymovou a redukční zkouškou. Při zjištěném rozdílu je třeba provést specifické stanovení na přítomnost jiných monosacharidů.

1.1 Důkaz ketolátek v moči

Průkaz ketolátek v moči má význam především u diabetiků 1. typu. U správně léčeného diabetika ketolátky v moči nenacházíme. Jejich přítomnost společně s nálezem výrazné hyperglykemie a glukosurie svědčí pro diabetickou ketoacidózu.

Ketolátky reagují s nitroprusidem sodným v alkalickém prostředí za vzniku fialového zbarvení. Tentýž princip je využit u diagnostických proužků. Používáme některý z proužků se zónou na důkaz ketolátek např. diaPHAN. Zkouška dokazuje v čerstvé moči zvláště acetoacetát, který při delším stání spontánně dekarboxyluje na aceton (na něj je zkouška méně citlivá).



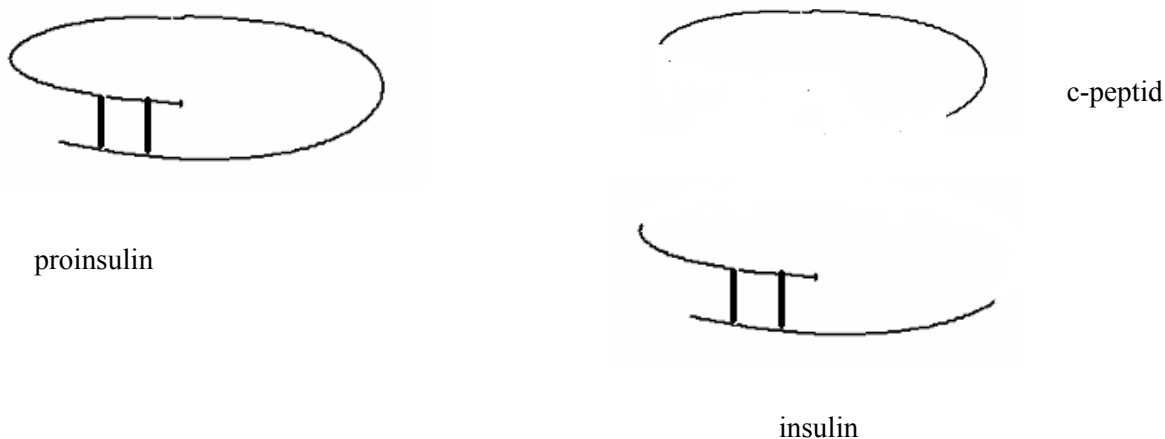
Hodnocení

Za normálních okolností je vylučování ketolátek nepatrné, nedosahuje hodnoty 0,5 mmol/den. Ke zvýšené produkci ketolátek dochází v důsledku zvýšené utilizace tuků a při současné poruše nedostatečnosti utilizace glukosy (např. při vyčerpávající fyzické námaze bez dodávky glycidů, několikadenním hladovění, redukční dietě s převahou proteinů, u diabetes mellitus). V těchto případech se zvyšuje koncentrace ketolátek v krvi nad 200 μmol/l a moči se jich vylučuje i více než 100 mmol/den. Aceton je poměrně těkavý a je poměrně rychle vylučován expirací. Ketonurie se současnou glukosurií je

odrazem metabolické dekompenzace diabetiků. Proto je nezbytné provádět zkoušky na ketonurii zvláště při každém zjištění glukosurie.

1.5. Stanovení C- peptidu

Insulin se tvoří v β -buňkách pankreatu. Jeho syntéza má tři fáze. Nejprve se tvoří pre-proinsulin, který se odštěpením N-koncového polypeptidu (tzv. signálního peptidu) přeměňuje na proinsulin. Proinsulin je tvořen polypeptidovým řetězcem, který je stočen a stabilizován dvěma disulfidickými můstky. Před sekrecí je proinsulin proteolyticky štěpen na insulin a C-peptid.



Insulin je při prvním průchodu játry z 50-60% vychytán a metabolizován, C-peptid není vychytáván. Hladina C-peptidu je tak mírou endogenní sekrece insulinu, protože v injekčně podaném insulinu C-peptid není obsažen.

Stanovuje se imunochemicky.

1.6. Pozdní komplikace diabetu - mikroalbuminurie

Kvantitativní stanovení výdeje albuminu močí je zařazeno u diabetiků jako základní metoda informující o rozvíjející se diabetické nefropatii. U zdravých jedinců nepřekročí obvykle vylučování albuminu močí hodnotu 30 mg/den. Při malém zvýšení permeability bazální membrány glomerulů dochází ke zvýšené exkreci proteinů se střední molekulovou hmotností, nejvíce albuminu (M_r 68 000). Toto malé množství albuminu (*mikroalbuminurie*) ještě není prokazatelné běžnými testy na proteinurii (citlivost nad 100 mg/l). Včasné zjištění mikroalbuminurie je však velmi důležité, poněvadž odhalí počáteční fázi

nefropatie, která je ještě reverzibilní. Intenzifikací terapie lze snížit vylučování albuminu močí a oddálit vznik diabetické mikroangiopatie, včetně glomerulosklerózy.

Stanovení se provádí v čerstvé ranní moči, po vyloučení manifestní proteinurie. Perzistentní mikroalbuminurie je potvrzena opakovaným pozitivním nálezem ve dvou ze tří vyšetření prováděných během jednoho týdne.

Uveďte, jakou metodou se stanovuje mikroalbuminurie ve vaší laboratoři. Uveďte základní princip této metody.

