

5 VYŠETŘENÍ METABOLISMU GLUKÓZY. DIABETES MELLITUS

1 Úvod

Základní biochemickou hodnotou sacharidového metabolismu je stanovení koncentrace glukózy v krvi, plazmě nebo séru. Nejčastějším typem poruchy sacharidového metabolismu je *diabetes mellitus* (DM). O této poruše lze uvažovat, je-li hladina glukózy nalačno v plazmě vyšší než 7 mmol/l. Na potvrzení diagnózy, není-li určena přímo z hodnoty glykemie¹, je používán také glukózový toleranční test. Při sledování průběhu diabetu a kontrole terapie využíváme další biochemická vyšetření: kvantitativní stanovení glukózy 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 glukózy (snížený počet receptorů nebo snížená afinita; snížená aktivita pyruvátdehydrogenázového komplexu; abnormální převod signálu nebo abnormální fosforylační reakce pro nadměrnou tvorbu TNF_{α}).

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

Poruchy metabolismu při diabetu

Absence inzulínu snižuje vychytání a metabolismus glukózy ve tkáních. Současně nedostatek inzulínu vyvolává glukoneogenezi v játrech a lipolýzu v tukové tkáni. Je uvolňováno více mastných kyselin, než stačí být spotřebováno ve tkáních. Jsou odbourávány β -oxidací v játrech.

¹ Přesnějším a správnějším výrazem pro vyjádření hladiny glukózy v krvi je termín *glukosemie*.

Z nadbytečného acetylCoA jsou syntetizovány ketonové látky. To je potencováno tím, že oxalacetát potřebný pro zpracování acetylCoA v citrátovém cyklu je využíván pro glukoneogenezi. Část mastných kyselin může být také zabudována ve formě triacylglycerolů do VLDL a způsobovat hypertriacylglycerolemii. V důsledku acidózy dochází k přesunu draselných iontů z buněk do krve a objevuje se hyperkalemie. Dochází však ke značným ztrátám draslíku močí, jako důsledek osmotické diurézy. Při léčbě acidózy se ionty K^+ vrací do buňky a objevuje se hypokalemie. Osmotická diuréza vyvolává zpravidla také hyponatremii. Je-li plazmatická koncentrace sodíku vysoká při současně vysoké hladině glukózy, značí to již značné ztráty vody. Při překročení tzv. renálního prahu pro glukózu převyší nabídka glukózy kapacitu její resorpce buňkami proximálního tubulu ledvin, glukóza se dostane do definitivní moči (glukosurie) a způsobí osmotickou diurézu. Nemocný má tedy polyurii (zvýšený objem moči), následně polydipsii (nadměrně pije) a ubývá na váze, protože ztrácí energeticky bohaté látky (glukózu, mnohdy i ketolátky) močí.

1.1 Metody stanovení glukózy

Krev na stanovení glukózy se odebírá po nočním lačnění do zkumavek s antiglykolytickou směsí (AGR) kvůli stabilizaci koncentrace glukózy. AGR obsahuje kyselý citrátový pufr pH 5,7, EDTA a fluorid sodný (NaF). EDTA a citrát působí jako antikoagulanty, enzymy na začátku glykolýzy (hexokinasa a fosfofruktokinasa) jsou inhibovány nízkým pH směsi a NaF inhibuje enolasu. Jestliže se požadují další laboratorní vyšetření, koncentrace glukózy se někdy stanovuje v séru žilní krve. V tomto případě je nezbytné včasné oddělení séra od erytrocytů.

a) Enzymové stanovení glukózy v plazmě

Glukóza se oxiduje vzdušným kyslíkem za katalýzy glukosaoxidázou (GOD) na γ -laktón glukonové kyseliny a peroxid vodíku.

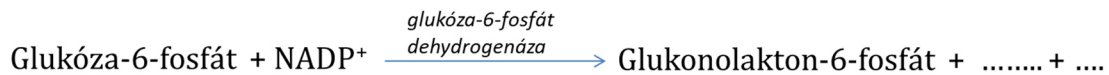
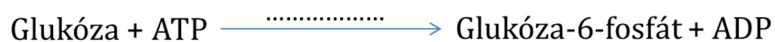
1. Vysvětlete princip stanovení. (Zapište rovnici)
2. Kterou látku budete stanovovat a proč?
3. Jakou instrumentální metodu použijete?

4. Které enzymy jsou obsaženy v činidle a co naopak v činidle bude chybět?

5. Jak vypočítáte koncentraci glukózy ve vzorku?

b) Stanovení s hexokinázovou reakcí

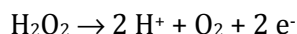
Glukóza je nejprve fosforylována na glukóza-6-fosfát, který je následně oxidován glukóza-6-fosfátdehydrogenázou na glukonolakton-6-fosfát:



1. Doplňte rovnice a zakreslete vzorce.
2. Uveďte, jakou metodou budete sledovat průběh reakce.
3. Jakou vlnovou délku zvolíte pro stanovení a proč?
4. Je tato metoda specifická pro stanovení koncentrace glukózy?

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

Referenční interval koncentrace glukózy nalačno v plazmě (FPG – fasting plasma glucose) u zdravých dospělých je: **3,9–5,5 mmol/l**.

Pro správné hodnocení glykemie je třeba si uvědomit, že referenční hodnoty se liší podle typu zpracovaného materiálu. Koncentrace glukózy v plazmě jsou přibližně o 10–15 % vyšší než v plné krvi. Dále jsou rozdíly mezi kapilární krví a žilní krví, v kapilární krvi jsou hodnoty vyšší než v žilní krvi – nalačno o 5 %, postprandiálně až o 10–15 %.

Nižší hodnoty ve srovnání s referenčním intervalem se označují jako **hypoglykemie**. Je to patologický stav, při němž organismus nedokáže udržet homeostázu glukózy. Klinické příznaky hypoglykemie se objevují, když hladina glukózy 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). Hypoglykemie 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.

Hodnota koncentrace glukózy v plazmě na lačno (FPG) je vhodným parametrem pro určení diagnózy DM a také pro vyhledávání osob se zvýšeným rizikem DM.

Stanovení diagnózy diabetu z hodnoty glykemie

Diabetes je potvrzen, jestliže glykemie přesáhne:

- kombinace klinických symptomů s náhodným stanovením glukózy v plazmě $\geq 11,1$ mmol/l
- koncentrace glukózy na lačno v plazmě ≥ 7 mmol/l
- koncentrace glukózy při orálním glukózovém tolerančním testu $\geq 11,1$ mmol/l

Pro vyslovení diagnózy diabetu je nezbytné potvrdit výsledek opakovaným měřením z dalšího odběru v následujících dnech.

Vyhledávání osob se zvýšeným rizikem diabetu mellitu

Zvýšené riziko diabetu je charakterizováno hodnotou koncentrace glukózy v plazmě nalačno v rozmezí **5,6–6,9 mmol/l**. Tento stav (IFP – impaired fasting glucose) se označuje také jako **prediabetes**.

Rozhodovací meze pro koncentraci glukózy v plazmě nalačno

FPG (mmol/l)	Interpretace
< 5,6	Vyloučení diabetu mellitu
5,6–6,9	Prediabetes (zvýšená FPG, IFG)
≥ 7,0	Diabetes mellitus

1.2 Orální glukózový toleranční test (oGTT)

Pokud byla zjištěna zvýšená koncentrace glukózy v krevním séru/plazmě na lačno v rozpětí 5,6–6,9 mmol/l, která je označovaná jako prediabetes, je nutné ověřit účinnost regulace přeměny glycidů funkční zkouškou. Orální glukózový test se provádí avšak i tehdy, kdy je glykemie v plazmě na lačno menší než 5,6 mmol/l, a sice v těch případech kdy se jedná o jedince se zvýšeným rizikem diabetu či je-li podezření na poruchu tolerance glukózy z předchozích měření.

Při glukózovém tolerančním testu se hodnotí změny glykemie po zátěžovém podání standardní dávky glukózy perorálně, méně často intravenózně. Při vyšších koncentracích glukózy, 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 glukózy v 300 ml čaje a odebere se krev za 2 h po vypití čaje. Během testu se zachovává tělesný klid, je zakázáno kouřit, jíst a pít.

Hodnocení

Glykemie v plazmě venózní krve po 2 hodinách zátěže po podání 75 g glukózy (mmol/l)

Glukozová tolerance	2 h po zátěži
Normální (vyloučení diabetu mellitu)	< 7,8
Porušená glukozová tolerance	7,8–11
Diabetes mellitus	≥11,1

Pro vyslovení diagnózy musí být výsledek testu potvrzen opakovaným měřením. Při nálezů porušené glukozové tolerance se oGTT opakuje ve dvouletých intervalech.

1.3 Důkaz glukózy v moči

Za normálních okolností se v moči vyskytuje v závislosti na složení a příjmu potravy jen nepatrné množství glukózy (případně jiných cukrů: galaktóza, fruktóza, laktóza, maltóza a některé pentózy), které nejsme schopni běžně používanými zkouškami prokázat. O **glukosurii** hovoříme při hodnotách glukózy v moči $> 0,8$ mmol/l. Glukosurie vzniká při hyperglykemii takového stupně, kdy je překročena maximální schopnost buněk proximálního tubulu resorbovat glukózu 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 glukózy v moči toto onemocnění nevyklučuje. Kvantitativnímu stanovení glukosurie se v poslední době přikládá menší význam, používá se jako doplňkové vyšetření. Má význam pro určení denních ztrát glukózy močí.

Ke zjištění glukosurie lze využít *nespecifickou* zkoušku s Benedictovým činidlem (průkaz redukujících látek; v moči kromě všech monosacharidů pozitivní reakci poskytuje např. askorbová kyselina). Tato zkouška se však používá již jen výjimečně. *Specifický* důkaz glukózy v moči lze provést diagnostickými proužky, např. glukoPHAN.

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

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

Provedení

- ☞ Proužek ponořte asi na 1 s do moči, potom jej položte na nádobu s močí.
- ☞ Po 1 minutě srovnajte zbarvení indikační zóny se stupnicí na pouzdře s proužky.
- ☞ Ověřte si možnost falešně pozitivního výsledku tak, že zopakujete zkoušku diagnostickým proužkem s močí (ve které jste neprokázali glukózu), kterou odpipetujete do zkumavky, kterou jste předtím vypláchli malým množstvím 3% peroxidu vodíku nebo 0,5% Persterilu.

Hodnocení

Zkouška je dosti citlivá, výsledek je zřetelně pozitivní přibližně od koncentrace 2 mmol/l. Zároveň je velmi specifická, jiné cukry než D-glukóza nereagují.

Falešně negativní výsledky vznikají při vysokých koncentracích redukujících látek (askorbová kyselina nebo některá spazmolytika zpomalují vývin zbarvení).

Falešně pozitivní výsledky může způsobit přítomnost substrátů peroxidázy v nádobách na moč (běžný dezinfekční prostředek Persteril /peroxooctová kyselina/ nebo peroxid vodíku). Nádoby se proto po dezinfekci musí důkladně vypláchnout čistou vodou.

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 glukózy. V laboratoři se provede porovnání glykosurie vyšetřené enzymovou a redukční zkouškou. Při zjištěném rozdílu je třeba provést specifické stanovení na přítomnost jiných monosacharidů.

1.4 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).

Provedení

- ☞ Proužek krátce namočte do analyzované moči a otřete přebytek moči o okraj nádoby.
- ☞ Po 1 minutě porovnejte zbarvení indikační zóny s barevnou stupnicí na pouzdru a odhadněte množství ketolátek v moči.

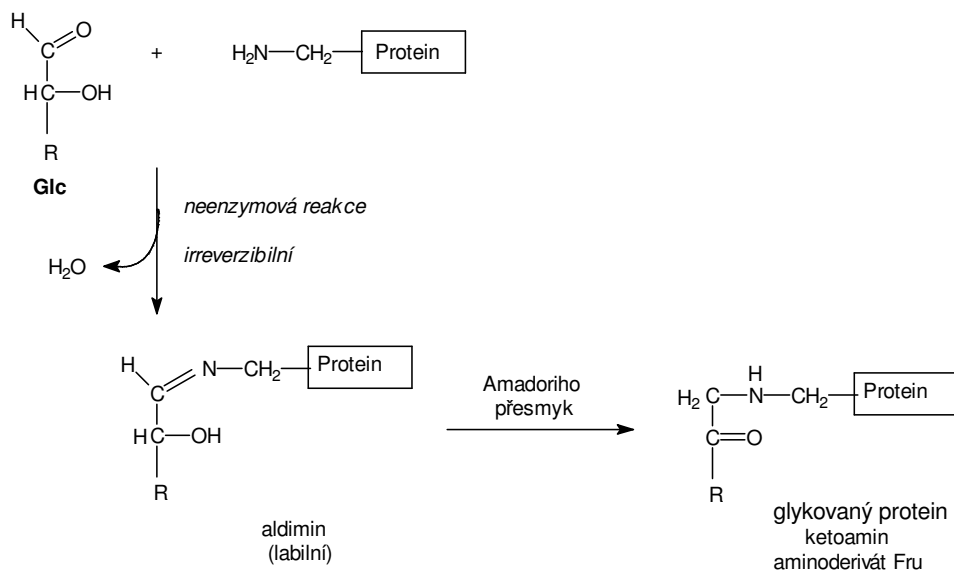
Hodnocení

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 glukózy (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 $\mu\text{mol/l}$ a močí 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 glykovaného hemoglobinu A_{1c}

Ke sledování dlouhodobé kompenzace diabetu se využívá stanovení glykovaného hemoglobinu nebo glykovaného albuminu (fruktosaminový test). Principem stanovení je děj označovaný jako **neenzymová** glykace proteinů. Aldehydové skupiny glukózy jsou schopny navazovat se na aminoskupiny proteinů za vzniku glykovaného proteinu. Množství glykovaného proteinu je závislé na množství glukózy, s nímž je bílkovina v kontaktu. Stanovení glykovaného podílu hlavních krevních bílkovin tak umožňuje posoudit průměrnou glykemii za delší časové období.



Používá se následující terminologie:

Glykovaný hemoglobin – suma sacharidových aduktů na *N*-terminálním konci nebo ε-aminoskupinách lysinu v hemoglobinu.

HbA₁ – suma různých minoritních frakcí hemoglobinu (glykovaných), včetně HbA_{1c}, HbA_{1a1/a2}, HbA_{1b1/b2/b3}, HbA_{1d1/d2/d3} a HbA_{1e}.

HbA_{1c} – glukozový adukt valinu na *N*-terminálním konci β-globinu; odpovídá tzv. stabilnímu ketoaminu (*N*-[1-deoxyfruktosyl]hemoglobinu).

Nejčastěji se stanovuje forma stabilní frakce HbA_{1c}. Jeho tvorba je ireverzibilní. Množství HbA_{1c} odráží koncentraci glukózy v krvi po celou dobu existence erytrocytu, tj. asi 120 dní, a využívá se proto k posouzení úspěšnosti léčby/kompenzace diabetu v období 4–8 týdnů před vyšetřením.

Glykovaný a neglykovaný hemoglobin mají rozdílný náboj, čehož se často využívá pro jeho stanovení. Glykovaný hemoglobin je stanovován pomocí HPLC, případně se používají ELISA nebo elektroforetické techniky.

Podíl látkové koncentrace HbA_{1c} na celkovém hemoglobinu krve je v současné době pokládán za rutinní a nejvíce efektivní nástroj sledování průběhu DM. Představuje nejlepší způsob kontroly koncentrace glukózy u diabetika, neboť je považován za její vážený průměr.

Ve shodě s celosvětovou standardizací stanovení HbA_{1c} doporučuje Česká společnost klinické biochemie a Česká diabetologická společnost udávat množství glykovaného hemoglobinu v jednotkách mmol HbA_{1c} / mol celkového Hb a stanovila následující rozhodující meze pro HbA_{1c}:

Referenční meze zdravých dospělých (95% interval): **20–42 mmol/mol Hb**
Kompenzovaný diabetes: **43–53 mmol/mol Hb**

Tyto meze jsou platné pouze za předpokladu, že použité metody měření, přístroje a pracovní kalibrátory mají certifikovanou návaznost na příslušný referenční systém.

Glykovaný hemoglobin se vyšetřuje 1krát za 3 měsíce u diabetiků 1. typu a nejméně 2krát za rok u stabilních diabetiků 2. typu.

Problémy související s tímto tématem

- ☒ 1. U paní P. (56 let) byla při běžné preventivní prohlídce zjištěna hodnota glykemie nalačno 6,5 mmol/l (plazma).
Zvažte, zda je u pacientky indikován oGTT, popište jeho provedení.
- ☒ 2. Pan S. (58 let) během dvou měsíců ztratil na váze 7 kg, stěžuje si na časté močení a pocity žízně. Při vyšetření glukosy v kapilární krvi přímo v ordinaci (pacient uvádí, že lehce snídal před dvěma hodinami) byla zjištěna hladina 14 mmol/l.
O jakou poruchu se s největší pravděpodobností jedná? Co je její příčinou?
- ☒ 3. Pan R. (40 let) je od svých 33 let léčen na DM typu 1. Podle pokynů svého lékaře dochází pravidelně do diabetologické poradny. Zde je u něj sledována glykemie nalačno, glukosurie a ketonurie.
Které další ukazatele sacharidového metabolismu by měly být zjištěny?