# Vyšetření metabolismu glukosy. Diabetes mellitus

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 plazmě vyšší než 7 mmol/l. Na potvrzení diagnózy, není-li určena přímo z hodnoty glykemie[[1]](#footnote-1), je používán také 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 inzulinu 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 inzulinu. 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 inzulin a/nebo relativním nedostatkem inzulinu (abnormální inzulin, protilátky proti inzulinu). Je převažující formou diabetu. Rezistence na působení inzulinu 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 TNFα).

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

## Metody stanovení glukosy

## a) Enzymové stanovení glukosy v plazmě

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

Vysvětlete princip stanovení. Kterou látku budete stanovovat? Jakou instrumentální metodu použijete?Které enzymy jsou obsaženy v činidle?

**b) Stanovení s hexokinasou a glukóza-6-fosfátdehydrogenasou**

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

glukóza + ATP → glukóza-6-fosfát + ADP *(hexokináza)*

glukóza-6-fosfát + NADP+ → glukonolakton-6-fosfát + NADPH + H+ *(glukóza-6-fosfátdehydrogenáza)*

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):

H2O2 → 2 H+ + O2 + 2 e-



Hodnocení

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

Pro správné hodnocení glykemieje třeba si uvědomit, že referenční hodnoty se liší podle typu zpracovaného materiálu. Koncentrace glukosy 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 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). Hypoglykemii 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 inzulinu nebo perorálních antidiabetik.

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

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

Stanovení diagnózy diabetu z hodnoty glykemie

Diabetes je potvrzen, jestliže glykemie přesáhne:

* kombinace klinických symptonů s náhodným stanovením glukosy v plazmě ≥ 11,1 mmol/l
* koncentrace glukosy na lačno v plazmě ≥ 7 mmol/l
* koncentrace glukosy při orálním glukosovém tolerančním testu ≥ 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 glukosy 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 glukosy v plazmě nalačno

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

## Orální glukosový toleranční test (oGTT)

Pokud byla zjištěna zvýšená koncentrace glukosy v krevním séru/plazmě na lačno v rozpětí 5,6–7 mmol/l, která je označovaná jako prediabetes, je nutné ověřit účinnost regulace přeměny glycidů funkční zkouškou. Orální glukosový 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 glukosy z předchozích měřeních.

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 2 h po vypití čaje. Během testu se zachovává tělesný klid, je zakázáno kouřit, jíst a pít.

**Materiál**: 75 g glukosy rozpuštěné v 300 ml slabého čaje. Osobní glukometr s diagnostickými proužky, odběrová souprava na krev.

Hodnocení

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

|  |  |
| --- | --- |
| **Glukosová tolerance** | **2 h po zátěži** |
| Normální (vyloučení diabetu mellitu) | < 7,8 |
| Porušená glukosová tolerance | 7,8–11 |
| Diabetes mellitus | ≥11,1 |

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

## Důkaz 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 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 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.

Princip důkazu glukosy pomocí diagnostických proužků je stejný jako u kvantitativního enzymového stanovení glukosy (viz úloha 1). Indikační zóna proužku obsahuje enzymy (glukosaoxidázu a peroxidázu) a vhodný substrát, který se v přítomnosti vzniklého peroxidu oxiduje na barevný produkt.

**Materiál:** Diagnostické proužky glukoPHAN.

Provedení

* Proužek ponořte asi na 1 s do moči, potom jej položte na nádobu s močí.
* Po 1 minutě srovnejte 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 glukosu), 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-glukosa 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 glukosy. V laboratoři se provede porovnání glykosurie vyšetřené enzymovou a redukční zkouškou. Při zjištěném rozdílu je třeba provést specifické stanovení na přítomnost jiných monosacharidů.

## 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).

**Materiál:** Diagnostické proužky ketoPHAN či DiaPHAN.

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 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 močí se jich vylučuje i více než 100 mmol/den. Aceton je poměrně těkavý a je poměrně rychle vylučován exspirací.

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

## Stanovení glykovaného hemoglobinu A1c

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 glukosy jsou schopny navazovat se na aminoskupiny proteinů za vniku glykovaného proteinu. Množství glykovaného proteinu je závislé na množství glukosy, s nimž 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 HbA1c, HbA1a1/a2, HbA1b1/b2/b3, HbA1d1/d2/d3 a HbA1e.

*HbA1c* ***–*** glukosový adukt valinu na *N*-terminálním konci β-globinu; odpovídá tzv. stabilnímu ketoaminu(*N*‑[1‑deoxyfruktosyl]hemoglobinu).

Nejčastěji se stanovuje forma stabilní frakce HbA1c. Jeho tvorba je ireverzibilní. Množství HbA1c odráží koncentraci glukosy 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 HbA1c na celkovém hemoglobinu krve je v současné době pokládán za rutinní a nejvíce efektivní nástroj sledování průběhu DM. Představuje nejlepší způsob kontroly koncentrace glukosy u diabetika, neboť je považován za její vážený průměr.

Ve shodě s celosvětovou standardizací stanovení HbA1c doporučuje Česká společnost klinické biochemie a Česká diabetologická společnost udávat množství glykovaného hemoglobinu v jednotkách mmol HbA1c / mol celkového Hb a stanovila následující rozhodující meze pro HbA1c:

Referenční meze zdravých dospělých (95% interval):  **20–42 mmol/mol**

Kompenzovaný diabetes: 43–53 mmol/mol

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.

1. 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?

1. 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?

1. Přesnějším a správnějším výrazem pro vyjádření hladiny glukosy v krvi je termín *glukosemie.* [↑](#footnote-ref-1)