Datum:	Jméno: Skupina:

CVIČENÍ 3: Vyšetření metabolismu sacharidů. Diabetes mellitus

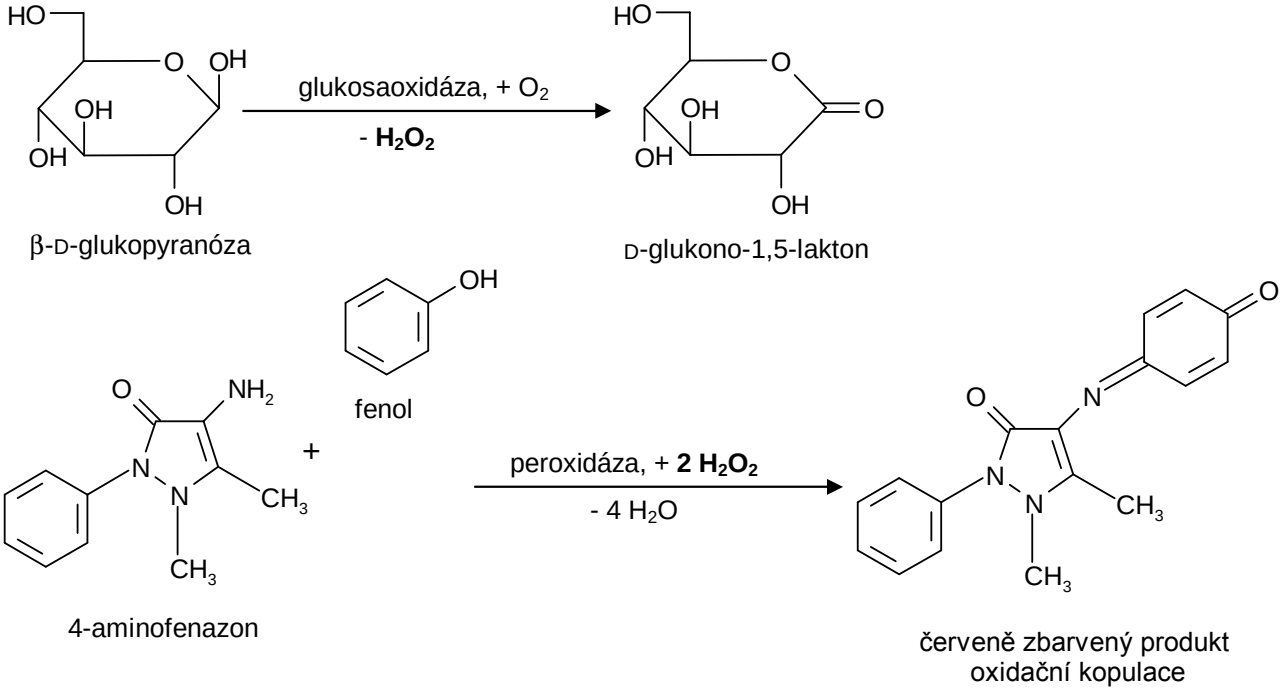
Úvod

Stanovuje se koncentrace glukózy v krvi, plazmě nebo séru (glykemie, glukosemie). Podezření na diabetes mellitus (DM) při glykemii v celé kapilární nebo žilní krvi vyšší než 5 mmol l^{-1} nebo v plazmě či séru vyšší než 6 mmol l^{-1}.

Diabetes mellitus (DM) je onemocnění charakterizované absolutním (**DM 1. typu**) nebo relativním (**DM 2. typu**) nedostatkem inzulinu. Známý je také **těhotenský (gestační) DM** u některých žen v průběhu gravidity (nutno léčit inzulinem, po porodu porucha mizí).

3.1 Enzymové stanovení glukózy v séru

Metoda end-point (do ustálení reakční rovnováhy).



Provedení (viz skripta)

Výpočet koncentrace glukózy v krevním séru: $c_x = \frac{A_x}{A_{STD}} * c_{STD}$

A_x.....absorbance vzorku při 495 nm (bezrozměrné číslo)
A_{STD}..... absorbance standardu při 495 nm (bezrozměrné číslo)
c_x..... koncentrace glukózy ve vzorku (mmol dm^{-3} nebo-li mmol l^{-1})
c_{STD}.....koncentrace glukózy v kalibračním roztoku (mmol dm^{-3} nebo-li mmol l^{-1})

Výsledek:

Hodnocení vypočteného výsledku (viz pravidla níže):

Hodnocení

Porovnání výsledku s referenčním intervalem koncentrace glukózy nalačno u zdravých dospělých. Referenční hodnoty uvedené v tabulce v mmol l^{-1} se liší podle typu zpracovávaného materiálu.

	Venózní	**Kapilární**
Krev	3,1 - 5,0	3,3 - 5,6
sérum, plazma	3,3 - 5,6	3,9 - 6,3

⇒
Hypoglykemie (pod 2,8 mmol l^{-1} klinické příznaky [↓ Glc pro mozek, aktivace sympatiku])
Normoglykemie
Hyperglykemie

Stanovení diagnózy diabetu z hodnoty glykemie
Rozhodovací analýza - porovnání zjištěné koncentrace s hraniční hodnotou koncentrace glukózy uvedené v tabulce v mmol l^{-1}.
Potvrzení diagnózy DM:

- 1 × překročení hraniční hodnoty + současná přítomnost klinických příznaků (polyurie, polydipsie, úbytek hmotnosti, ketonurie),
- nebo u bezpříznakového nemocného - nejméně 2 × překročení hraniční hodnoty.

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

3.2 Stanovení glykemie osobním glukometrem

Obdobný princip stanovení jako v 3.1. Všechny reakce probíhají v reakčním (diagnostickém, testovacím) proužku. Hodnoty během dne nepřekračující 7 mmol l^{-1} jsou uspokojivé.

Provedení (viz skripta)

Výsledek:

3.3 Orální glukózový toleranční test (oGTT)

Funkční zkouška (oGTT) se provádí při zjištění koncentrace glukózy v séru nebo plazmě nalačno v rozpětí 6 - 8 mmol l^{-1} nebo v žilní či kapilární krvi 5 - 7 mmol l^{-1}. Při vyšších koncentracích glukózy a při charakteristických příznacích cukrovky se oGTT neprovádí.

Provedení (viz skripta)

V následující tabulce jsou zadány hodnoty glykemie dvou pacientů. Doplň hodnoty spolužačky nebo spolužáka. Porovnej všechny hodnoty s hraničními hodnotami nebo referenčním intervalem (označ N, ↑, ↑↑). U všech třech osob zhodnoť glukózovou toleranci. (Když všechny 3 hodnoty nezapadají do jednoho typu hodnocení rozhodují hodnoty pro 0 h a 2 h.)

		Glykemie v kapilární krvi (venózní plazmě) v mmol l^{-1}			
	Glukózová tolerance	**0 h (nalačno)**	**0,5 h po zátěži**	**1 h po zátěži**	2 h po **zátěži**
	Normální	< 6		< 11	< 8
	Porušená	> 6		> 11	8 - 11
	Diabetes mellitus	> 7		> 11	> 11
Pacient 1		5,3	9,4	11,0	9,7
Pacient 2		4,2	7,2	6,6	4,8
Spolužák					

pozn. u lidí nad 50 let jsou horní hranice referenčních hodnot posunuty o 0,55 mmol l^{-1} na každou dekádu

3.4 Důkaz a stanovení glukózy v moči

Glukosurie – koncentrace glukózy v moči > 0,8 mmol l^{-1} (nižší hodnoty běžnými zkouškami neprokazatelné), nastane při překročení *renálního glukózového prahu* 10 mmol l^{-1} (u různých lidí kolísá v rozmezí 2,8 -18 mmol l^{-1})

Renální glukosurie – při normoglykemii a porušené tubulární resorpci glukózy

Využívá se specifického důkazu glukózy. Důkaz redukujících sacharidů Benedictovým činidlem (nespecifické pro glukózu) se někdy používá jako doplňkové vyšetření.

3.4.1 Specifický důkaz glukózy diagnostickými proužky glukoPHAN

Obdobný princip stanovení jako v 3.1. Všechny reakce probíhají v diagnostickém proužku. Rozdíl je v chromogenním substrátu, který reaguje s peroxidem vodíku - je jím tetramethylbenzidin.

Provedení (viz skripta)

Hodnocení

Citlivá (od 2 mmol l^{-1}), specifická pro glukózu zkouška. Lze hodnotit semikvantitativně.

Výsledek:

Ověření:

Falešně negativního výsledku:
(vysvětli příčinu falešné negativity)

Falešně pozitivního výsledku:
(vysvětli příčinu falešné pozitivity)

3.5 Důkaz ketolátek v moči

U správně léčeného diabetika je v moči nenalézáme.
Ketolátky v moči + hyperglykemie + glukosurie = diabetická ketoacidóza.

$$\underset{\text{nitroprusid sodný}}{Na_2[Fe(CN)_5NO]} + \underset{\substack{R = -CH_2COOH,\ -CH_3 \\ \text{acetoacetát, aceton}}}{CH_3\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}R} + NaOH \xrightarrow{\text{Legalova reakce}} \underset{\text{fialově zbarvený produkt}}{Na_3[Fe(CN)_5\text{-}N(OH)=CH\text{-}CO\text{-}R]} + H_2O$$

Provedení (viz skripta)

Hodnocení

Normální okolnosti – vylučování ketolátek do 0,5 mmol den^{-1}. Při fyzické námaze bez dodávky sacharidů, několikadenním hladovění, redukční dietě s převahou proteinů, diabetes mellitus – ketonemie nad 200 $\mu mol\ l^{-1}$, vylučování ketolátek močí 100 mmol den^{-1} i více.

Výsledek:

3.6 Stanovení glykovaného hemoglobinu HbA_1

Glykovaný hemoglobin HbA_1 vzniká neenzymovou ireverzibilní reakcí hemoglobinu HbA_0 s glukózou. Nejčastěji se stanovuje forma (frakce) HbA_{1c} – posouzení úspěšnosti kompenzace diabetu v průběhu 2 měsíců. (Vyplývá z průměrné doby života erytrocytu 4 měsíce).

Princip (vlastní provedení viz skripta)

1. Hemolýza krve azidem sodným ⇒ hemolyzát s uvolněným hemoglobinem.
2. Neglykovaný hemoglobin má více volných NH_3^+ skupin ⇒ kladnější náboj než glykovaný hemoglobin ⇒ zachycení HbA_0 na katexu při pH = 6,9, HbA_1 zůstane v roztoku.

3. Změření absorbance roztoku frakce HbA_1 a roztoku obsahujícího celkový hemoglobin HbA (HbA_0 + HbA_1).
4. Výpočet procentuálního zastoupení glykovaného hemoglobinu dle vztahu:

$$\%\ \text{zastoupení glykovaného hemoglobinu} = \frac{A(HbA_1)}{A(HbA) * 10} * 100\,\%$$

$A(HbA_1)$..... absorbance roztoku HbA_1 při 415 nm (bezrozměrné číslo)
A(HbA)..... absorbance roztoku HbA při 415 nm (bezrozměrné číslo)
Konstanta 10 ve jmenovateli je kvůli 10 × většímu ředění roztoku HbA k analýze než bylo ředění roztoku HbA_1.

Výpočty a výsledky:

Hodnocení

Porovnání výsledků s referenčním intervalem procentuálního zastoupení glykovaného hemoglobinu. Referenční interval závisí na použité metodě.

		referenční interval zastoupení HbA_1 v %
	zdravý metabolismus, stabilizovaný diabetik	4,5 – 7,0
	nedostatečně kontrolovaný diabetes, metabolicky nevyrovnaný diabetik	≥ 8,5
výsledky a hodnocení z praktik	hodnocení	**zjištěné zastoupení HbA_1** v %

Správnější je stanovení elektroforetické frakce **HbA_{1c}** (iontoměničovou chromatrografií, afinitní chromatografií, imunochemicky, elektroforeticky).

	referenční interval zastoupení HbA_{1c} v %
zdravý dospělý	2,8 – 4,0
kompenzace diabetu výborná	< 4,5
kompenzace diabetu uspokojivá	4,5 – 6,0
kompenzace diabetu neuspokojivá	> 6,0

pozn. Glykovaný hemoglobin se vyšetřuje 1× za 3 měsíce u DM 1. typu, nejméně 2× za rok u stabilizovaných diabetiků 2. typu.

3.7 Pozdní komplikace diabetu - mikroalbuminurie

Zdravý člověk - vylučování albuminu močí do 30 mg den^{-1}.
Mikroalbuminurie - >20 - 100 mg l^{-1} albuminu (M_r=68000) v moči (citlivé imunochemické testy), objevuje se v počáteční reverzibilní fázi nefropatie, je způsobena malým zvýšením permeability bazální membrány glomerulů.
Proteinurie - nad 100 mg l^{-1} proteinů v moči (běžné méně citlivé testy).

Mikroalbuminurie se stanovuje imunochemicky, viz CVIČENÍ 9: Vyšetření funkce ledvin II, úloha 9.4.

Problémy související s tímto tématem

4 1. U Paní P. (56 let) byla při běžné preventivní prohlídce zjištěna hodnota glykemie nalačno 6,5 mmol l^{-1} (žilní krev). Zvažte, zda je u pacientky indikován oGTT. Pokud ano, popište jeho provedení.

•

•

4 2. Pan S. (58 let) během dvou měsíců ztratil na váze 7 kg, stěžuje si na časté močení a pocity žízně. Při vyšetření glukózy v kapilární krvi přímo v ordinaci (pacient uvádí, že lehce snídal před dvěma hodinami) byla zjištěna hladina 12 mmol l^{-1}. O jakou poruchu se s největší pravděpodobností jedná? Co je její příčinou?

•

•

4 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?

•

•

4 4. Pan P., diabetik píchající si každé ráno inzulin, během dne intenzivně fyzicky pracoval na zahradě a opomenul jídlo. Začala se u něho projevovat slabost, zmatenost, třes, bušení srdce a další příznaky. Glukometrem mu byla zjištěna hodnota glykemie 2,6 mmol l^{-1}. Pokuste se vysvětlit, čím byl tento stav způsoben a jak ho označíme. Zamyslete se nad rychlou, okamžitou pomocí.

•

•

4 5. U paní B. byla nalačno v plazmě zjištěna hodnota glykemie 6,2 mmol l^{-1}. Je tedy u ní zvýšené riziko DM, lékař proto požaduje vyšetření oGTT. Hodnoty oGTT testu pro paní B.: glykemie nalačno 6,2 mmol l^{-1}, 1 h po zátěži 11,0 mmol l^{-1} a 2 h po zátěži 10,5 mmol l^{-1}. Vyhodnoťte výsledky zátěžového testu a udělejte závěr.

•

•

4 6. Osmnáctiletý diabetik (typ 1) byl na kontrolním vyšetření; neudával od poslední kontroly žádné obtíže. Sám si nevyšetřoval glukosurii ani glykemii. Testy: glukóza v plazmě (2 h po snídani) : 15 mmol l^{-1}, glukóza v moči 95 mmol l^{-1}, hemoglobin A_{1c} 4,4 %. Pacient přiznal, že v noci byl na oslavě, kde jedl sladké moučníky. Posuďte naměřené hodnoty z hlediska této informace.

•

•