

Pentru intrebari legate de tematica abordata in cadrul lucrarii practice va adresati cadrelor didactice de predare la lucrari, la urmatoarele adrese de mail:

- 1) SL Dr. Grecu Daniela – mail: grecu.daniela@umft.ro**
- 2) As. Univ. Dr. Bujor Cristiana – mail: bujor.cristiana@umft.ro**
- 3) As. Univ. Chis Aimee – mail: chis.aimee@umft.ro**
- 4) As. Univ. Moatar Alexandra – mail: moatar.alexandra@umft.ro**

LUCRARE PRACTICA 5 BIOCHIMIE AMG

EXPLORAREA METABOLISMULUI GLUCIDIC

1. Determinarea glicemiei

Glicemia este cea mai frecventă investigație de laborator solicitată în practica medicală. Termenul de glicemie se referă la concentrația glucozei în sânge. Oferă informații despre statusul actual al metabolismului glucidic, în momentul recoltării probei biologice. Pentru ca informațiile oferite să fie corecte trebuie ca recoltarea probei de sânge să fie făcută corect. Cel mai frecvent, pentru determinarea glicemiei se recoltează sânge venos în recipient cu dop roșu dar se poate recolta sângele și în recipientul cu dop verde (conține heparină). Dacă recoltarea se realizează în aceste recipiente trebuie ca proba să fie transportată la laborator cât mai repede (în maxim 3 ore de la recoltare), astfel încât determinarea propriu-zisă să fie făcută într-un interval optim de timp de maxim 4 ore de la recoltare. În caz contrar, valoarea glicemiei va fi fals scăzută deoarece glucoza este consumată de eritrocite pentru asigurarea nevoilor energetice proprii. Dacă nu este posibilă efectuarea glicemiei în intervalul optim de timp, sângele se recoltează în recipient cu dop gri care conține inhibitor glicolitic (fluorura de sodiu). În recipientul cu dop gri, glicemia este stabilă până la 48 de ore. Pentru determinarea glicemiei se poate utiliza și sângele obținut prin puncția pielii. Acest produs biologic este frecvent folosit de pacienții diabetici care își monitorizează singuri nivelul glicemiei cu ajutorul testelor rapide și a glucometrului. Determinarea glicemiei cu glucometrul nu este folosită doar de pacienții diabetici, ci devine utilă și în situațiile de urgență, atunci când este nevoie rapid de rezultatul investigației sau la pacienții pediatrici datorită ușurinței cu care se obține produsul biologic.

Momentul recoltării probei biologice are o importanță deosebită. Se recomandă ca recoltarea sângelui pentru determinarea glicemiei să fie făcută după un repaus alimentar de 10 – 12 ore, adică dimineața, pe nemâncate. În cazul în care se determină glicemia din sânge recoltat după aport alimentar, valoarea sa va fi crescută datorită glucozei absorbite la nivel intestinal din alimentele ingerate. În cazurile de urgență, la recoltarea sângelui pentru determinarea glicemiei nu se mai ține cont de aportul alimentar, valorile fiind interpretate în raport cu timpul scurs de la aport.

În prezent, cele mai utilizate metode de determinare a glicemiei sunt cele enzimatică, printre care se numără și metoda cu glucozoxidază.

Determinarea glucozei prin tehnica enzimatică cu glucozoxidază

Principiu

Sub acțiunea glucozoxidazei, glucoza se transformă în D-gluconolactonă, cu formarea unei cantități stoechiometrice de apă oxigenată. Această se transformă în prezența fenolului și a 4-aminoantipirinei, sub acțiunea peroxidazei, într-un compus colorat în roșu (chinonimină), a cărui absorbție de lumină se măsoară la o lungime de undă cuprinsă între 470 și 550 nm.

Reactivi

1. Reactiv de lucru: conține tampon fosfat 0,5 mol/l, pH 7,50; fenol 7,5 mmol/l; glucozoxidază 12000 U/l; peroxidază 660 U/l; 4-aminoantipirină 0,4 mmol/l.

Reactivul este stabil timp de 3 luni la 2-8°C sau 3 săptămâni la 20-25°C.

2. Standard glucoză: conține glucoză 100 mg/100 ml (5,55 mmol/l).
3. Ser, urină.

Mod de lucru

În eprubete potrivite se pipetează conform tabelului:

Reactivi (μl)	Probă ser	Standard	Martor
Reactiv de lucru	1000	1000	1000
Ser	100	-	-
Standard	-	100	-

Apă distilată	-	-	100
---------------	---	---	-----

Se incubează eprubetele 15 minute la 37°C sau 30 minute la 25°C. Se măsoară absorbțiile de radiație ale probei și standardului față de martor la 546 nm.

Calcul: glucoză (mg /100 ml) = $E_p/E_s \times 100$

Valori normale: ser, plasmă: 75 - 115 mg/100 ml (4,16 - 6,38 mmol/l)

Semnificație clinică

Hiperglicemie: diabet zaharat, sindrom Cushing (exces de glucocorticoizi), acromegalie (exces de hormon de creștere), feocromocitom (exces de catecolamine), hipertiroidism sever, stress

Hipoglicemie: supradozaj de insulină, tumori pancreatice insulino-secretoare (insulinoame).

2. Testul de toleranță la glucoza administrată pe cale orală

Are rolul de a aduce informații suplimentare asupra echilibrului metabolismului glucidic. Este indicat atunci când glicemia are o valoare cuprinsă între 115 și 126 mg/dL, caz în care se suspicionează o scădere a toleranței la glucoză, situație asociată frecvent cu obezitatea. Este necesar ca, timp de 3 zile înainte de efectuarea testului, dieta pacientului să fie normală (conținut glucidic > 150 g zilnic) iar în ultimele 10 – 12 ore să nu consume alimente. Se interzice fumatul.

În ziua efectuării testului, se execută un test de evidențiere a corpurilor cetonice în urină și unul de evidențiere a glucozei în urină. Prezența corpurilor cetonice în urină semnifică lipsa încărcării glucidice corecte, în timp ce prezența glucozei în urină indică, cel mai frecvent, prezența unei hiperglicemii peste 180 mg/dL. În ambele situații se renunță la efectuarea testului de toleranță.

Dacă cele două teste de evidențiere sunt negative, se trece la efectuarea testului propriu-zis. Se recoltează sânge venos a jeune într-un recipient cu dop roșu sau cu dop gri, apoi i se administrează pacientului, per os, 75 g glucoză dizolvată în 400 ml apă. Se repetă recoltarea sângelui venos după o oră și după două ore de la administrarea glucozei. Ingestia

soluției de glucoză trebuie realizată într-un timp scurt (maxim 5 minute). În timpul dintre recoltări, se recomandă ca pacientul să evite efortul și fumatul.

Se determină glicemia din sângele recoltat în cele trei recipiente (a jeune, la o oră și la două ore de la ingestia glucozei).

3. Evidențierea glicozuriei

În urina normală se găsesc cantități mici de glucoză (350 – 500 mg/24 ore) care nu pot fi evidențiate cu ajutorul metodelor calitative de evidențiere (stripuri urinare). Eliminarea unor cantități crescute de glucoză prin urină poartă denumirea de **glicozurie** și apare atunci când glicemia depășește pragul renal de eliminare a glucozei (170 – 180 mg/dL). Glicozuria nu are întotdeauna semnificație patologică. Ea poate surveni în cazul ingestiei unei cantități mari de glucide sau în situații de stres.

4. Determinarea hemoglobinei glicozilate (HbA1c)

În monitorizarea echilibrului metabolismului glucidic un rol important revine hemoglobinei glicozilate. Valoarea hemoglobinei glicozilate este corelată cu nivelul glicemiei în urmă cu 2 – 3 luni anterioare testului. Deoarece determinarea HbA1c se efectuează din sânge integral, sângele venos se recoltează în recipientul cu dop mov (conține anticoagulant), același ca pentru hemoleucogramă. Imediat ce volumul optim de sânge a fost introdus în recipient, acesta va fi omogenizat cu anticoagulantul, astfel încât să se prevină coagularea sângelui. Omogenizarea se realizează prin câteva (8-10) inversiuni repetate. La pacienții nediabetici, valoarea hemoglobinei glicozilate reprezintă 4 – 6% din valoarea hemoglobinei totale.