

LP NR. 4 METABOLISMUL GLUCIDIC

DETERMINAREA GLUCOZEI ÎN MATERIALELE BIOLOGICE

Determinarea glicemiei este proba cea mai solicitată laboratorului clinic. Legat de această realitate şi în legătură cu îmbunătăţirea permanentă a parametrilor de determinare, în decursul timpului au fost elaborate o mare varietate de metode.

Enzimele acţionează specific asupra substratului, astfel că nu există fenomene de interferenţă. De asemenea reacţiile decurg rapid şi fără obţinerea de produşi secundari.

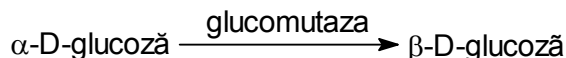
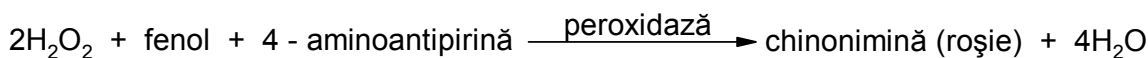
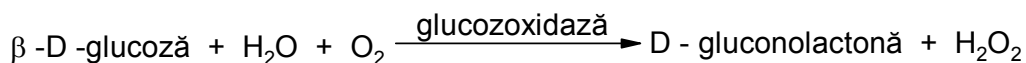
Aplicaţie practică

Tehnica enzimatică cu glucozoxidază

Principiu

Sub acţiunea glucozoxidazei, glucoza se transformă în D-gluconolactonă, cu formarea unei cantităţi stoechiometrice de apă oxigenată. Această se transformă în prezenţa fenolului şi a 4-aminoantipirinei, sub acţiunea peroxidazei, într-un compus colorat în roşu (chinonimină), a cărui absorbţie de lumină se măsoară la o lungime de undă cuprinsă între 470 şi 550 nm.

În plasmă raportul dintre β -D-glucoză şi α -D-glucoză este de 2 la 1. Pe măsură ce se consumă β -D-glucoza în reacţie, α -D-glucoza se transformă în forma β , astfel că întreaga cantitate de glucoză prezentă în sânge va fi determinată prin această metodă.



Glucozoxidaza mai acţionează şi asupra 2-dezoxiglucozei, a manozei, ca şi asupra derivaţilor metilaţi sau fluoruraţi ai glucozei, dar aceştia nu apar în sânge, metoda putând fi considerată foarte specifică.

Reactivi

1. Reactiv de lucru: conţine 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: conţine glucoză 100 mg/100 ml (5,55 mmol/l).

Mod de lucru

În eprubete potrivite se pipetează conform tabelului:

Reactivi (µl)	Probă	Standard	Martor
Reactiv de lucru	1000	1000	1000
Ser (diluat 1/10)	100	-	-
Standard (diluat 1/10)	-	100	-
Apă distilată	-	-	100

Se incubează eprubetele 15 minute la 37°C sau 30 minute la 25°C. Se măsoară absorbţiile de radiaţie ale probei şi standardului faţă de martor la 546 nm. Culoarea este stabilă timp de 60

minute iar răspunsul este liniar până la o concentrație a glucozei în sânge de 400 mg/100 ml (22,2 mmol/l). La valori mai mari, se diluează proba 1:2 și se înmulțește rezultatul cu 2. Există și o variantă cinetică a metodei.

Calcul

$$\text{mg glucoză/100 ml} = \text{Ep/Es} \times 100$$

Valori normale

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

LCR: 50 - 70 mg/100 ml (2,78 - 3,89 mmol/l)

Surse de eroare

- Metoda este interferată de concentrații ale hemoglobinei de peste 4 g/l, bilirubină 200 mg/l, creatină (100 mg/l), galactoză 1 g/l și EDTA 2 g/l.
- Prin deproteinizarea sângelui cu acid tricloroacetic sau percloric se poate produce liza eritrocitelor, cu eliberare consecutivă de glutatation. Acesta va reacționa cu o parte din apa oxigenată formată în reacție, astfel că există riscul apariției unor rezultate false (mai mici decât în realitate). Se recomandă deproteinizarea cu o soluție izotonă de acetat de uranil, care păstrează integritatea hematiilor.
- Rezultate mai mici se obțin și în cazul unor concentrații crescute de peste 5 mg% de vitamină C, care consumă de asemenea apa oxigenată. Astfel de concentrații apar numai după injectarea intravenoasă a vitaminei C (după administrarea orală a acestora nu s-au observat asemenea erori).

Observații

Hiperglicemiile: diabet zaharat, sindrom Cushing (exces de glucocorticoizi), acromegalie (exces de hormon de creștere), feocromocitom (exces de catecolamine), hipertiroidism sever, stress, stări de șoc, pancreatite, carcinom pancreatic, pancreatectomie.

Hipoglicemiile: supradozaj de insulină, ingestia unor mari cantități de alcool, rezecție gastrică, tumori pancreatice insulino-secretoare (insulinoame).

Determinarea glucozei în urină

În urina normală se găsesc cantități foarte mici de glucoză, eliminarea urinară nedepășind 350-500 mg/24 de ore.

Glicozuriile în general apar numai în cazuri de hiperglicemii cu valori ce depășesc pragul de eliminare renală a glucozei (concentrația glucozei din sânge depășește 170-180 mg/100 ml).

Trebuie menționat că *glicozuria nu este întotdeauna anormală*, ea putând surveni:

- după ingerarea unei cantități mari de glucoză;
- după un stress emoțional.

În principiu, pentru determinarea glucozei în urină se procedează asemănător cu determinarea din ser (vezi mai sus), cu specificarea că atunci când urina conține glucoză se fac diluții aferente, rezultatul obținut se înmulțește cu factorul de diluție și se raportează la litrul de urină sau eventual la cantitatea totală de urină exprimată în litri eliminată în decurs de 24 de ore.

INVESTIGAREA REGLĂRII METABOLISMULUI GLUCIDIC

Introducere

Glucidele reprezintă principala sursă de energie a celulelor organismului. În sistemul nervos central și hematii ele reprezintă unica resursă energetică.

Organismul își acoperă necesarul de aproximativ **250 grame de glucoză pe zi** prin:

- preluarea glucozei din alimentație (majoritar);
- liza glicogenului hepatic și muscular (în perioadele mai îndelungate de lipsă de aport alimentar);

- gluconeogeneză din: piruvat, lactat, oxalacetat, malat, aminoacizi glucoplastici, glicerol.

Pătrunderea glucozei în țesutul muscular, adipos și miocard se realizează numai în prezența insulinei (țesuturi insulino-dependente). Ficatul, rinichiul, creierul, eritrocitele, insulele Langerhans și mucoasa intestinală nu necesită prezența insulinei (țesuturi insulino-independente).

Menținerea glicemiei (nivelul plasmatic al glucozei) în limite normale se realizează prin mecanisme complexe de natură fiziologică și biochimică.

Rolul hormonilor în reglarea glicemiei

La menținerea unui nivel fiziologic al glicemiei participă:

- **insulina**, cu efect **hipoglicemiant**;
- **glucagonul, adrenalina, glucocorticoizii, tiroxina, hormonul de creștere**, cu efect **hiperglicemiant**.

Insulina favorizează pătrunderea glucozei în celulele țesuturilor insulino-dependente și induce sinteza de enzime implicate în utilizarea glucozei (glucokinaza, fosfofructokinaza, piruvatkinaza, piruvat dehidrogenaza, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza) sau în formarea de glicogen (glicogen sintetaza). În același timp, insulina reprimă sinteza enzimelor cu rol în gluconeogeneză (piruvat carboxilaza, fosfoenolpiruvat carboxikinaza, fructozo-1,6-bisfosfat fosfataza) sau cu rol în eliberarea glucozei din țesuturi (glucozo-6-fosfat fosfataza).

Glucagonul determină hiperglicemie prin stimularea glicogenolizei și a gluconeogenezei; inhibă sinteza glicogenului și determină creșterea lipolizei în țesutul adipos.

Adrenalina stimulează glicogenoliza și lipoliza. Glucocorticoizii acționează prin stimularea gluconeogenezei.

Investigarea echilibrului metabolismului glucidic în diabetul zaharat cuprinde: evidențierea glicozuriei (se discută la examenul sumar de urină), determinarea glicemiei *à jeun*, determinarea hemoglobinei glicozilate și a proteinelor serice glicozilate, determinarea nivelului seric al insulinei și eventual a peptidului C.

1. Testul de toleranță la glucoză

Are menirea de a aduce precizări suplimentare asupra echilibrului metabolismului glucidic. *Se execută în cazul în care glicemia este situată în intervalul 110-126 mg/100 ml (suspiciune de scădere a toleranței la glucoză) și asociată cu obezitate, încărcare genetică sau alți factori de risc pentru diabet.*

Pregătirea pacientului

Reacția celulelor pancreatice producătoare de insulină la administrarea orală de glucoză depinde de concentrația în glucide a alimentației pacientului din zilele precedente efectuării testului. Pentru ca rezultatul obținut să fie reproductibil, i se administrează pacientului timp de trei zile înaintea efectuării testului o dietă cu minimum 250 g de glucide pe zi. Nerespectarea acestei diete duce la apariția unor rezultate fals crescute.

Se întrerupe fumatul precum și administrarea tuturor medicamentelor ce pot influența toleranța la glucoză, în special glucocorticoizii, diureticele, antihipertensivele, biguanidele, β -blocantele, etc.

Desfășurarea testului

Se determină prezența corpurilor cetonice din urină. Prezența acestora denotă lipsa de încărcare glucidică corectă ce precede testul astfel că testul de toleranță la glucoză nu va mai fi efectuat.

Se determină o eventuală prezență a glucozei în urină. Rezultatul pozitiv presupune hiperglicemie (cu excepția unor glicozurii renale) care de asemenea anulează necesitatea efectuării testului.

Se determină glicemia *à jeun*. O valoare crescută a acesteia (>126 mg/100 ml) determină de asemenea renunțarea la efectuarea testului. Dacă toate cele trei determinări arătate mai sus sunt normale se începe testul de toleranță orală la glucoză.

Pacientul primește 1 g/kgc glucoză dizolvată în 400 ml apă. Administrarea se face într-o perioadă de maxim 5 minute (această soluție este puternic hipertonă, ceea ce poate produce greață și vomă, se poate administra un amestec de glucoză și maltoză). Datorită faptului că golirea stomacului se face mai lent în clinostatism, este preferabilă efectuarea testului în poziție șezândă.

Se măsoară glicemia la 60 și la 120 de minute de la administrarea glucozei. La sfârșitul testului se recomandă determinarea glicozuriei.

Interpretarea testului de toleranță orală la glucoză (pentru subiecți sub 45 de ani și greutate corporală în limite normale) se face conform tabelului următor:

	Timpul 0 (à jeun)	60 de minute de la administrare	120 de minute de la administrare
Curba glicemică normală	75-115 mg/100 ml	<140 mg/100 ml	75-115 mg/100 ml
Scăderea toleranței la glucoză	115-126 mg/100 ml	126-200 mg/100 ml	140-200 mg/100 ml
Diabet zaharat	>126 mg/100 ml	>140 mg/100 ml	>200 mg/100 ml

În cazul determinării glicemiei la 240 de minute de la administrarea glucozei, o hipoglicemie poate să denote o stare de hiperinsulinism.

Contraindicații

- Diabet zaharat manifest;
- Cure de slăbire radicale;
- Afecțiuni gastrointestinale ce pot interveni în mecanismul de absorbție a glucozei;
- Boli febrile;
- Afecțiuni hepatice.

Aplicație practică

Determinarea glicemiei în cadrul testului de toleranță la glucoză

Se determină glicemia, utilizând, metoda cu glucozoxidază, pentru 3 seruri, unul obținut din sânge recoltat *à jeun*, al doilea din sânge recoltat la 60 minute, iar al treilea, din sânge recoltat la 120 minute de la administrarea glucozei. Se interpretează rezultatele obținute.

XIV.4.2 Determinarea hemoglobinei glicozilate (HbA_{1c})

Introducere

În încercările de monitorizare cât mai eficientă a echilibrului metabolismului glucidic, cu posibilitatea aprecierii cât mai corecte a scăderii toleranței la glucoză, un rol important revine determinării hemoglobinei glicozilate.

HbA_{1c} rezultă printr-o reacție de glicozilare lentă, neenzimatică între glucoza care pătrunde cu ușurință în eritrocit și aminoacidul valină de la capătul N-terminal al lanțurilor β ale hemoglobinei. Nivelul HbA_{1c} din sânge se corelează atât cu timpul de înjumătățire al hemoglobinei, cât și cu nivelul mediu al glucozei sangvine pe perioada duratei de viață a hemoglobinei. Astfel, creșterea HbA_{1c} este proporțională cu nivelul mediu al glucozei sangvine (glicemia medie) în cursul ultimelor 2-3 luni anterioare testării (corespunzătoare duratei medii de viață a eritrocitelor).

eAG = estimated average glucose = glicemia medie estimată

$$\text{eAG (mg/dL)} = 28.7 \times \text{HbA}_{1c} - 46,7$$

În evaluarea nivelului mediu al glicemiei pe o perioadă de 2-3 luni, se efectuează determinarea HbA_{1c} și pe baza relației de mai sus se calculează valoarea medie a glicemiei pe

perioada respectivă. În acest mod se stabilește gradul de compensare al hiperglicemiei în perioada urmărită.

HbA1c	eAG	
	mg/dL	mmol/L
6	126	7
6,5	140	7,8
7	154	8,6
7,5	169	9,4
8	183	10,1
8,5	197	10,9
9	212	11,8
9,5	226	12,6
10	240	13,4
11	269	14,9
12	298	16,5

Determinarea HbA1c constituie un test de evaluare și monitorizare pe termen lung a controlului glicemic la pacienții cu diabet zaharat. Are un rol predictiv în ceea ce privește riscul complicațiilor diabetului: cetoacidoza, nefropatia, retinopatia.

Frecvența testării HbA1c depinde de tipul de diabet și de stabilitatea controlului glicemic:

- la 3-4 luni, pentru pacienții cu diabet zaharat tip I sub tratament convențional;
- la 1-2 luni, pentru pacienții cu diabet zaharat tip I sub tratament intensiv;
- la 6 luni, pentru pacienții cu diabet zaharat de tip II cu un control glicemic stabil;
- la fiecare 1-2 luni pentru gravidele cu diabet zaharat;
- la fiecare 1-2 luni pentru pacientele cu diabet gestațional.

În stabilirea acestei decizii au fost luate în considerare **avantajele** pe care le prezintă determinarea HbA1c față de glicemie:

- Nu sunt necesare condițiile "a jeun";
- Stabilitate preanalitică mai mare;
- Variație biologică individuală ↓ în comparație cu glicemia;
- Variații ↓ în condiții de stres și afecțiuni intercurrente.

Pe de altă parte, există și unele **dezavantaje** ale HbA1c:

- Cost mai ridicat/analiză;
- Lipsa de disponibilitate a testului în unele laboratoare;
- Lipsa de corelație a HbA1c cu glicemia medie la unele persoane (cu obezitate, hipotiroidism, anemie hemolitică, neoplasme, etc);
- HbA1c nu este relevantă la pacienții cu *turn-over eritrocitar anormal* (anemii hemolitice, anemii feriprive); în aceste situații diagnosticul diabetului trebuie să se bazeze exclusiv pe valorile glicemiei.

Interpretarea rezultatelor

- creșterea HbA1c indică prezența unei hiperglicemii în ultimele 2-3 luni;
- valorile sunt crescute la persoanele cu diabet zaharat controlat deficitar sau nou diagnosticat;
- diabetul zaharat este controlat adecvat când se obțin valori sub 7%;
- nivelul Hb A1c poate crește până la 20% în cazul unui control glicemic deficitar;
- scăderea HbA1c are loc treptat, pe durata mai multor luni, pe măsură ce hematiile cu hemoglobină glicozilată normală le înlocuiesc pe cele cu niveluri crescute.

Există mai multe metode de determinare a concentrației hemoglobinei glicozilate: cromatografia pe coloană cu rășini schimbătoare de ioni, cromatografia de lichide de înaltă presiune (HPLC), cromatografia de afinitate, metode electroforetice, metode fotometrice bazate pe reacția de culoare cu acidul tiobarbituric și metode imunologice.

Mod de lucru cu glucometrul (ACCU-CHEK, Roche)

- Se introduce în aparat bandeleta de determinare a glicemiei, cu săgeata spre interiorul glucometrului.
- Se așteaptă câteva secunde să apară pe ecranul glucometrului scris: 888, apoi codul de bară 609 sau 963.
- Se verifică ca acest cod să corespundă cu același cod de pe cutia cu bandetele (tot 609 sau 963).
- Se înțeapă pulpa degetului cu un ac steril, de unică folosință.
- Când apare pe ecranul glucometrului desenată o picătură, se aplică o picătură de sânge în zona specială a bandetei (zona de culoare portocalie).
- Se așteaptă câteva secunde și pe ecran va apărea valoarea glicemiei.

**Glucometru Accu-Check.**

Valori normale: 55 - 90 glucoză mg/dl sânge