

Cadre de predare: Anghel Andrei: biachim@umft.ro Grecu Daniela: grecu.daniela@umft.ro
Sfrijan Felicia: sfrijan.felicia@umft.ro Samoila Corina: corisamoila@umft.ro
Gurban Camelia: gurban.camelia@umft.ro Buzatu Ramona: buzatu.ramona@umft.ro
Bonte Diana: bonte.diana@umft.ro Tamas Liviu: tamas.liviu@umft.ro
Mihala Adrian: mihala.adrian@umft.ro Bujor Geta: bujor.cristiana@umft.ro
Alexa Anda: alexa.anda@umft.ro Marcu Anca: marcu.anca@umft.ro
Moatar Alexandra: moatar.alexandra@umft.ro Chis Aimee: chis.aimee@umft.ro

Toate întrebările vor fi adresate cadrului de predare corespunzător fiecărei grupe la adresa de email furnizată.

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.

În funcție de aportul alimentar reglarea glicemiei comportă *două etape*:

- **Postprandial precoce**: glicemia este crescută, iar readucerea ei la nivel fiziologic se face prin:
 - utilizarea glucozei ca substrat energetic;
 - glicogenogeneză;
 - lipidogeneză (sinteză de triacilgliceroli).

- **Postprandial tardiv** (starea de foame): apare o tendință de scădere a glicemiei cu activarea mecanismelor de menținere a acesteia în limite normale. Acest lucru se face pe mai multe căi:
 - activarea glicogenolizei și gluconeogenezei hepatice și musculare; spre deosebire de ficat, mușchiul nu are glucoză-6-fosfat fosfatază, deci nu poate elibera glucoza în sânge, utilizând-o pentru nevoile proprii;
 - producerea de energie alternativă prin lipoliză, cu cetogeneză consecutivă.

Cea mai frecventă dereglare ce apare în metabolismul glucidic este **diabetul zaharat** (prin deficitul relativ sau absolut de insulină). Acesta se caracterizează prin:

- hiperglicemie (prin insuficienta metabolizare a glucozei) și glicozurie (când glicemia depășește pragul renal de 180 mg/100 ml);
- intensificarea gluconeogenezei, lipolizei și proteolizei în țesuturile insulino-dependente;
- cetoacidoză (lipoliza generează acetil-CoA în exces, care este orientată spre sinteza de corpi cetonici).

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.

Testul de toleranță la glucoză

Este util deoarece poate aduce informații suplimentare asupra echilibrului metabolismului glucidic. ***Se realizează 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 corpiilor cetonici 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 hipertonică, 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	140-200 mg/100 ml	126-200 mg/100 ml
Diabet zaharat	>126 mg/100 ml	>200 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 de lucru prezentată la cap. XIV.1, metoda 3 cu glucozoxidază, pentru 3 seruri, unul obținut din sânge recoltat a 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.

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

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

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.

Aplicație practică

Determinarea hemoglobinei glicozilate (HbA_{1c}) prin metoda cu schimbători de Ioni (Micro Coloane)

Principiul

După pregătirea preparatului hemolizat, de unde fracția labilă a fost eliminată, hemoglobinele sunt reținute prin rășina schimbătoare de ioni, hemoglobina A1c este eluată specific după înlăturarea prin spălare a celorlalte fracții HbA1a+b, și este cuantificată prin citire fotometrică directă la 415nm.

Reactivi

1. Reactiv 1 (R1): conține Ftalat de potasiu (50 mmol/l), Azida de sodiu (0.95 g/l), Detergent (5 g/l);
2. Reactiv 2 (R2): conține Tampon fosfat pH 6.5 (30 mmol/l), Azida de sodiu (0.95 g/l);
3. Reactiv 3 (R3): conține Tampon fosfat pH 6.5 (72 mmol/l), Azida de sodiu 0.95 g/l;

Atenție!!!: Reactivii conțin azidă de sodiu. Evitați contactul cu pielea și mucoasele!

4. Material biologic: sânge recoltat pe EDTA, stabil o săptămână la frigider.

Mod de lucru:

A. Pregătirea hemolizatului și eliminarea fracției labile:

1. Aduceți reactivii și coloanele la temperatura camerei (21-26°C).
 2. Pipetați 50 μl sânge și 200 μl reactiv 1 (**R1**) într-un tub pentru testare și agitați bine. Lăsați apoi pentru 10-15 minute. Acest preparat hemolizat se va utiliza în pașii 5 și 10.
- !!! (Acest hemolizat de probă sânge este gata preparat în sala de lucrări).*

B. Pregătirea coloanelor:

3. Înlăturați capacul coloanei, apoi rupeți vârful de la capătul inferior al coloanei.
4. Cu ajutorul unei pipete cu terminație plată, împingeți discul până la suprafața rășinei, având grijă să nu o compresați. Lăsați coloana să se scurgă complet.

C. Separarea HbA_{1c}:

5. Pipetați 50 μl de hemolizat în filtrul superior și lăsați coloana să se scurgă în totalitate, pentru a se scurge orice reziduu de probă rămas deasupra discului.
6. Adăugați 200 μl reactiv 2 (**R2**) și lăsați coloana să se scurgă complet.
7. Pipetați apoi 2 ml reactiv 2 (**R2**) și lăsați coloana să se scurgă în totalitate.
8. Plasați coloana deasupra unui nou tub de testare (eprubetă), adăugați 4 ml de reactiv 3 (R3) și colectați eluatul (*fracția HbA_{1c}*).
9. Agitați bine și citiți absorbanta (A) fracției HbA_{1c} la 415 nm față de apa distilată (AHbA_{1c}). Absorbanta este stabilă pentru cel puțin 1 oră.

D. Citirea Hb Total:

10. Pipetați 12 ml reactiv 3 (**R3**) și 50 μl hemolizat într-o eprubetă.

11. Agitați bine și citiți absorbanta (*A_{total}*) față de apa distilată. Absorbanta este stabilă pentru cel puțin 1 oră.

CALCUL:

$$\% \text{ HbA1c} = (\Delta A \text{ HbA1c} / \Delta A \text{ Hb Total}) \times (V \text{ HbA1c} / V \text{ Hb Total}) \times 100$$

Volumul HbA1c (V_{HbA1c}) este de 4 ml, volumul Hb total (V_{HbTotal}) este de 12 ml.

Următoarea formula este redusă pentru calcularea concentrației:

$$\frac{\Delta A \text{ HbA1c}}{\Delta A \text{ Hb Total}} \times \frac{100}{3} = \% \text{ HbA1c}$$

Rezultatele obținute prin metoda prezentă pot fi echivalate cu cele obținute printr-o metoda standardizată certificată (NGSP) sau echivalată cu metoda standardizată a 'International Federation of Clinical Chemistry' (IFCC), utilizând formulele de mai jos:

$$\% \text{HbA1c-NGSP} = 0.86 \times \% \text{HbA1c-Fortress} + 0.24$$

$$\% \text{HbA1c-IFCC} = 0.94 \times \% \text{HbA1c-Fortress} - 2.09$$

Valori normale

Nediabetici: 4-6% din valoarea hemoglobinei totale

Diabet zaharat controlat: 6,5-7% din valoarea hemoglobinei totale.