

1. ÚVOD.....	3
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	4
2.1. DEFINICE DIABETU .....	4
2.2. HISTORIE .....	4
2.3. ROZDĚLENÍ DIABETU .....	5
2.3.1. DIABETES MELLITUS I. TYPU .....	5
2.3.1.1. Protilátky u DM I.typu .....	7
2.3.2. DIABETES MELLITUS II. TYPU .....	7
2.3.2.1. Inzulínová rezistence .....	8
2.3.3. SPECIFICKÉ FORMY DIABETU .....	9
2.3.4. DIABETES MELLITUS JAKO SOUČÁST JINÝCH ONEMOCNĚNÍ ČI STAVŮ (SEKUNDÁRNÍ DIABETES).....	9
2.3.4.1. Příčiny sekundárního diabetes mellitus .....	9
2.3.4.2. Gestační diabetes .....	11
2.3.5. PORUŠENÁ TOLERANCE GLUKÓZY (PGT).....	12
2.4. INCIDENCE DIABETU .....	12
2.5. KLINICKÝ OBRAZ .....	13
2.5.1. Symptomatologie DM I.typu .....	14
2.5.2. Symptomatologie DM II.typu .....	15
2.6. KOMPLIKACE DIABETU .....	15
2.6.1. AKUTNÍ KOMPLIKACE.....	16
2.6.1.1. Hyperglykemické koma.....	16
2.6.1.2. Hyperglykemické hyperosmolární neketoacidotické koma .....	16
2.6.2. CHRONICKÉ KOMPLIKACE.....	17
2.6.2.1. Mikrovaskulární komplikace diabetu .....	17
2.6.2.2. Diabetická makroangiopatie .....	19
2.6.2.3. Infekční komplikace .....	20
2.6.2.4. Další nespecifické komplikace diabetu .....	20
2.7. DIAGNOSTIKA DIABETU .....	20
2.7.1. LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ .....	22
2.7.1.1. Glykémie .....	23
2.7.1.2. Glykovaný hemoglobin .....	26
2.7.1.3. Glukoza v moči (glykosurie).....	29
2.7.1.4. Ketonurie .....	30
2.7.1.5. Stanovení mikroalbuminurie .....	31
2.7.1.6. Perorální glukózový toleranční test (OGTT).....	32
2.7.1.7. Intravenozní glukózový toleranční test.....	33
2.7.1.8. Stanovení inzulínu .....	34
2.7.1.9. Stanovení C-peptidu .....	36
2.7.1.10. Stanovení autoprotiáték .....	36
2.8. LÉČBA DIABETU .....	38
2.8.1. DIETA .....	38
2.8.2. FYZICKÁ AKTIVITA.....	39
2.8.3. INZULÍN .....	40

2.8.4. PERORÁLNÍ ANTIDIABETIKA (PAD).....	42
2.8.4.1. Sulfonylmočoviny .....	42
2.8.4.2. Glinidy .....	43
2.8.4.3. Biguanidy .....	43
2.8.4.4. Glitazony ( thiazolidindiony).....	44
2.8.4.5. Inhibitory alfa-glukosidáz.....	44
3. CÍL PRÁCE .....	45
4. PRAKTICKÁ ČÁST .....	46
4.1. MATERIÁL A METODA .....	46
4.1.1. Materiál.....	46
4.1.2. Přístroj .....	46
4.1.3. Pacienti .....	46
4.1.4. Metoda .....	47
4.1.4.1. Stabilita glykémie v séru a plazmě .....	47
4.1.4.2. Dotazník .....	47
4.1.5. Statistická analýza .....	49
4.2. VÝSLEDKY .....	49
4.2.1. Hladina glykémie v séru a plazmě.....	49
4.2.2. Zhodnocení dotazníku .....	51
4.3. DISKUSE .....	55
4.3.1. Sledování stability glykémie v séru a plasmě.....	55
4.3.2. Dotazník .....	56
5. ZÁVĚR.....	57
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	58
7. LITERÁRNÍ ODKAZY .....	59

# 1. ÚVOD

Diabetes mellitus neboli lidově cukrovka je nejčastějším onemocněním metabolismu cukrů, které se projevuje zvýšenou hladinou glukózy v krvi (hyperglykemií). Tato skutečnost vede nejen k akutním potížím ale i k pozdějším komplikacím. Chronické diabetické komplikace jsou příliš vysokou daní, kterou za léta trvání nemoci zaplatí především ti, jejichž metabolická kontrola je špatná. Na všech kontinentech roste počet lidí s diabetem. Je více než zřetelné, že znalosti o patofyziologii a racionální terapii diabetu pomohou zlepšit kvalitu života a pravděpodobně jej i prodlouží. Proto získávání nových informací o této nemoci, včetně zlepšené laboratorní analýzy, je výzvou pro všechny zdravotnické pracovníky, kteří o diabetiky pečují.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. DEFINICE DIABETU

Diabetes mellitus neboli lidově cukrovka je chronické onemocnění metabolismu glukózy, kdy organismus není schopen udržet hladinu glukózy v krvi (glykémii) ve fyziologických mezích. Projevuje se obecně hyperglykemií (zvýšená hladina glukózy v krvi) bez ohledu na typ diabetu. Diabetes vzniká v souvislosti s poruchou vylučování nebo účinku hormonu inzulínu produkovaný  $\beta$ -buňkami pankreatu. Právě typ této poruchy rozděluje diabetiky na dvě základní skupiny - diabetiky I. a II. typu.

(9)

### 2.2. HISTORIE

Stavy charakterizované polyurií, které připomínají dnešní pojetí diabetu, byly popsány již v roce 1550 před Kristem starověkými Egypťany v tzv. Ebersově papyru. Tehdy se na tuto chorobu umíralo. Sladká chuť diabetické moči byla již známa indickým lékařům v 5.- 6. století našeho letopočtu. V 17. století anglický lékař Thomas Willis oddělil „diabetes mellitus“ od ostatních stavů provázených polyurií. V polovině 18. století Mathew Dobson zjistil, že sérum diabetika stejně jako jeho moč obsahuje cukr. Domníval se, že příčina choroby je v ledvinách. V roce 1889 Oskar Minkovsky a Josef von Mehring pozorovali, že po totální pankreatektomii u psa došlo k diabetu. V roce 1893 pojmenoval Laguesse ostrůvky pankreatu podle jejich objevitele Paula Langerhans, který je popsal v roce 1869. V roce 1890 dokázal Sobolev, že látka snižující plazmatickou glukózu má endogenní charakter. V roce 1909 zatím stále ještě hypotetický hormon pojmenoval de Meyer „inzulín“, více než deset let před jeho skutečným objevením. V prvních dvou desetiletích tohoto století byla různými pracovníky izolována řada hypoglykemizujících extraktů pankreatu. Tyto však nebyly dostatečně čisté. Teprve v roce 1921 Frederick Banting a Charles Best spolu s J.J.R.

McLeodem isolovali inzulín ve fyziologickém ústavu University v Torontu. Práce vyžadovala spolupráci chemika, kterým byl James Colip. Základem objevu byla Bantingova hypotéza o tom, že legace pankreatického vývodu způsobí atrofii acinární tkáně pankreatu, což je základní předpoklad toho, aby při extrakci nedošlo k proteolýze inzulínu. Prvním diabetikem léčeným inzulínem byl v lednu 1922 čtrnáctiletý chlapec Leopard Thompson. Již v roce 1923 byl poprvé inzulín aplikován v Praze. Ve třicátých letech tohoto století byl popsán hypoglykemický účinek derivátů sulfonylmočoviny. V roce 1959 popsali Bersona a Yallowová radioimunoesej pro inzulín. Tím umožnili jednak jeho stanovení, jednak zahájili novou kapitolu při vyšetřování hladin hormonů a dalších látek o nízké koncentraci v tělesných tekutinách. Toto umožnilo mj. i oddělit jednotlivé typy diabetes mellitus.

(2)

## **2.3. ROZDĚLENÍ DIABETU**

Jedná se o heterogenní skupinu stavů, které mají různou patogenezu a průběh, a proto je zapotřebí zvolit podle toho i správnou léčbu. Rozlišujeme diabetes mellitus

- a) 1. typu
- b) 2. typu
- c) jako součást jiných onemocnění či stavů

(9)

### **2.3.1. DIABETES MELLITUS I. TYPU**

Diabetes mellitus I. typu vzniká nejčastěji v dětství jako důsledek destrukce beta-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu autoimunním procesem. Projeví se tedy úplným nebo částečným chyběním těchto buněk a následnou nedostatečností inzulínové sekrece. Proto je tento typ závislý na podávání inzulínu.

Genetická predispozice kombinovaná s určitými vnějšími faktory, jako jsou virová infekce, toxiny nebo stres může navodit prediabetickou fází onemocnění, která trvá i několik

let. V této době dochází k pomalé destrukci B-buněk Langerhansových ostrůvků zprostředkované aktivovanými T-lymfocyty a cytokiny, která se projevuje jako inzulitis (lymfocytová infiltrace ostrůvkových buněk, zánět). Inzulitis postupně snižuje počet funkčních B-buněk, a způsobuje tak poruchy syntézy a sekrece inzulínu, což vede k hyperglykemii. Klinicky se diabetes projeví až v době, kdy je autoimunitním zánětem zničeno přes 80 % pankreatických B-buněk. Akutně ohrožuje nejvíce pacienta s diabetem I. typu hyperglykémie, která může proběhnout dramaticky až formou diabetického komatu. (12)

Průběh vzniku diabetu I. typu lze nejlépe shrnout Eisenbarthovým schématem, který celou patogenezi diabetu I. typu rozdělil do 6 stadií.

**Stadium 1 – genetická susceptibilita.** Jde zejména o osoby přítomností HLA genů DR3 a DR4, snad také B8 a B15

**Stadium 2 – spouštěcí mechanismus,** pravděpodobně virového původu. Spouštěcí mechanismus předchází zřejmě léta manifestaci diabetu.

**Stadium 3 – počínající inzulitida**

**Stadium 4 – plně vyvinutá inzulitida** s ještě dostatečnou a postupně klesající sekrecí inzulínu. Teprve tehdy, je-li zničeno 80% všech B-buněk, resp. klesne-li sekrece inzulínu o 80% projeví se.

**Stadium 5 – manifestace diabetu.** K manifestaci zpravidla dojde při větší fyzické nebo eventuelně psychické zátěži. Odezní-li zátěž, může zbytková sekrece být pro nemocného dostatečná ještě několik měsíců, případně i let. Jedná se o tzv. „honeymoon period“ („období líbánek“). Postupující autoimunní inzulitis však vede postupně k úplné destrukci všech B-buněk a k naprostému vyhasnutí sekrece inzulínu.

**Stadium 6 – stadium naprosto nulové sekrece vlastního inzulínu.** Období, od kterého je pacient zcela závislý na substituční terapii inzulínem.

(2)

WHO a ADA navrhly rozdělit diabetes typu 1 na autoimunní/ imunitou zprostředkovaný diabetes (typ 1A) a idiopatický diabetes s obstrukcí  $\beta$ -buněk (typ 1B).

### 2.3.1.1. Protilátky u DM I. typu

U většiny nově diagnostikovaných diabetiků I. typu se v plazmě nacházejí protilátky proti  $\beta$ -Langherhansovým ostrůvkům (B-buňkám) - ICA. Patří do skupiny IgG a jsou směřovány proti neznámým cytoplazmatickým antigenům pocházejícím z těchto B-buněk. U části nově diagnostikovaných diabetiků I. typu se vyskytují spontánní autoprotilátky proti inzulínu (IAA). Dále byly prokázány protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutámové, která je obsažena v pankreatických B-buňkách (GAD).

ICA a IAA jsou v plazmě přítomny již v prediabetickém období, které může trvat i několik let před klinickou manifestací choroby. Přitom glykémie a sekrece inzulínu zůstávají dlouho nedotčeny. Při manifestaci diabetu a po ní dochází k prudkému poklesu titrů ICA a IAA. ICA se vyskytují i u sourozenců diabetiků, zejména u těch, kteří mají identické HLA antigeny. U 75% z nich vznikne diabetes I. typu do několika let. (2)

### 2.3.2. DIABETES MELLITUS II. TYPU

Patogeneze vzniku diabetiků II. typu je zcela odlišná od I. typu. U diabetiků II. typu hraje hlavní roli nedostatečná odpověď tkání na insulin. U tohoto typu se často setkáváme s tzv. **metabolickým syndromem X (Raevenův syndrom)**- jedná se o soubor stavů, který je spojován s diabetem druhého typu a je zároveň považován za významný rizikový faktor aterogeneze. Syndrom X je vyjádřen inzulínovou rezistencí, hyperinzulinismem, porušenou glukózovou tolerancí, které bývají doprovázené obezitou, sníženou koncentrací HDL-cholesterolu, hyperurikémií a hypertenzí. Může přímo či nepřímo tvořit základ ischemické choroby srdeční. (2)

Diabetes II. typu se objeví obvykle až po čtyřicátém roce věku, vzácně se objeví i dříve (typ MODY, z angl. maturity-onset diabetes of young, tj. diabetes dospělého typu u mladých). Pro diabetes mellitus druhého typu je typický familiární výskyt a je mnohem častější než diabetes prvního typu. Do této skupiny totiž patří zhruba 92 % diabetiků. (9)

Na vzniku se podílí genetické vlivy a řada dalších faktorů, zejména obezita (androidní typ), stres, malá fyzická aktivita, kouření. Rozhodujícím způsobem se zde uplatní působení vnějších faktorů a vztah jedince k sobě samému. Jedná se zejména o nesprávnou životosprávu vedoucí k obezitě. Slinivka břišní totiž v tomto případě vyrábí dostatek inzulínu ke správnému hospodaření s cukrem, avšak obezita (tuk v tělesných tkáních) účinky inzulínu zpomaluje a oslabuje. (12)

### **2.3.2.1. Inzulínová rezistence**

U DM II. typu je na povrchu buněk snížený počet receptorů a buňky tak neumí na inzulín správně reagovat. Špatnou vnímavost buněk k inzulínu označujeme jako inzulínovou rezistenci.

Tělo se snaží inzulínovou rezistenci překonat a slinivka vyplavuje do krve stále více a více inzulínu. Zvýšenou koncentraci inzulínu v krvi označujeme jako hyperinzulinismus. Zvýšená koncentrace zpočátku stačí k udržení normálních hladin krevního cukru. Hyperglykémie se objeví až tehdy, když buňky v pankreatu nestačí vyhovět nepřiměřeným nárokům. Nedostatek inzulínu je tedy relativní.

Stupeň inzulínové nedostatečnosti je obrazem postupné ztráty schopnosti B-buněk reagovat na glukózu, zůstává však schopnost reagovat na sulfonylmočovinu či jiné stimulanty. To je základem léčby tohoto typu diabetu.

Biologická odpověď na inzulín je nižší u více než poloviny všech diabetiků II. typu. Ke zvýšené rezistenci na inzulín vede již sama hyperglykémie. Mluvíme o tzv. glukozové toxicitě. K rezistenci na inzulín dále přispívá obezita, nedostatek tělesného pohybu, dietní a genetické faktory.

Naprostá většina nemocných s diabetem II. typu má tělesnou nadváhu nebo obezitu. Vzestup BMI koreluje pozitivně s výskytem diabetu II. typu. Zvláštním přídatným rizikem je vzestup poměru obvodu pasu/boky (W/H poměr), který je větší než 1. Jedná se o tzv. androidní typ obezity. Tento vzestup signalizuje tzv. centrální depozici tuku, tedy ukládání tuku do tkání peritoneální dutiny, zejména do omenta a dále do podkoží břicha.

(2)



### 2.3.3. SPECIFICKÉ FORMY DIABETU

a) **MODY** - Diabetes se u nich manifestuje obvykle před 25. rokem věku a zprvu nevyžaduje léčbu inzulínem.

b) **LADA** - latent autoimmune diabetes of the adults.

U některých jedinců se rozvíjí závislost na inzulínu a dokonce u nich byly prokázány autoprotilátky jako u diabetiků I. typu. Destrukce pankreatických beta-buněk však bývá v poslední době rozpoznávána i ve zralém věku (po čtyřiceti letech života). Zbytková sekrece inzulínu totiž několik let brání rozvoji ketoacidózy. Klinicky se nemocní jeví jako diabetici typu 2 a zpočátku jsou léčeni dietou. Rozvojem choroby však přechází na léčbu inzulínem.

(2)

### 2.3.4. DIABETES MELLITUS JAKO SOUČÁST JINÝCH ONEMOCNĚNÍ ČI STAVŮ (SEKUNDÁRNÍ DIABETES)

Do této skupiny se řadí diabetes doprovázející definovaná onemocnění genetická, endokrinní, zánětlivá, diabetes vyvolaný podáváním léků apod.

K sekundárnímu diabetu dochází buď z důvodů snížené sekrece inzulínu při postižení pankreatu event. při toxickém zničení B-buněk ostrůvků, nebo při působení kontraregulačních hormonů či diabetogenních léků. Při onemocnění exokrinního pankreatu bývá současně postižena i endokrinní část. Např. právě chronická pankreatitida bývá provázena diabetem vyžadujícím léčbu inzulínem, který je způsoben destrukcí Langerhansových ostrůvků.

Příčiny sekundárního diabetu jsou shrnuty v následující kapitole.

#### 2.3.4.1. Příčiny sekundárního diabetes mellitus

- A) snížení sekrece inzulínu z důvodů postižení pankreatu
- stavy po úplné nekroze pankreatu
  - stavy po totální pankreatektomii pro tumor
  - karcinom pankreatu

- chronická pankreatitis, zejména její kalcifikující forma
  - cystická fibroza pankreatu
  - malnutriční diabetes v tropech
- B) toxické zničení B-buněk ostrůvků
- v experimentu je dobře známý alloxanový a streptozotocinový diabetes
  - zničení B-buněk bylo popsáno u lidí po rodenticidní látce Vacor
- C) kontraregulační působící hormony
- sekundární diabetes byl nalezen u následujících endokrinních chorob
- akromegalie
  - hypertyreóza
  - hyperkortikalismus
  - glukagonom
  - feochromocytom
- D) diabetogenně působící léky
- mezi léky, které mohou urychlit manifestaci diabetu počítáme:
- glukokortikoidy
  - thiazidová diuretika
  - diazoxid
  - betaadrenolytika
- E) diabetes při jaterní cirhóze
- F) diabetes při chronickém selhání ledvin

(2)

### 2.3.4.2. Gestační diabetes

Jde o diabetes, který se manifestuje v průběhu těhotenství. Má specifika, a proto je zde uvedena zvlášť.

Gestační diabetes se nejčastěji manifestuje mezi 24. až 28. týdnem těhotenství, což souvisí s antiinzulárním působením některých hormonů produkovaných placentou, zejména humánního placentárního laktogenu (HPL). Roli při vzniku diabetu hraje i kortizol, jehož plazmatické hladiny jsou u těhotných zvýšené. Hodnoty inzulínu jsou normální, nebo mírně zvýšené, gestační diabetes je porucha, která se vyznačuje inzulínorezistencí, je tedy podobný DM II. typu.

V naprosté většině případů gestační diabetes po porodu mizí, u třetiny až poloviny žen, které v těhotenství měly gestační diabetes se objeví do 20-30 let typický diabetes II. Typu.

#### Vyšší riziko pro vznik gestačního diabetu mají:

- ženy s pozitivní rodinnou anamnézou diabetu II. typu
- ženy obézní
- ženy s velkým přírůstkem hmotnosti v těhotenství
- ženy nad 30 let věku
- ženy, které v minulosti porodily plod těžší než 3000g nebo plod mrtvý
- ženy s glykosurií na začátku těhotenství

Hlavním rizikem gestačního diabetu je riziko pro plod. Vyskytují-li se u matky v prvním trimestru těžké hypoglykémie nebo hyperglykémie, mohou způsobit závažné vrozené poruchy, zahrnované pod pojmem diabetické embryopatie. V dalším období je plod ohrožen spíše souborem příznaků nazývaných diabetická fetopatie (makrosomie orgánů, hypoglykémie po porodu, hyperbilirubinémie, hypokalcémie, polycytemie, porodní váha nad 4000g).

Pozdní riziko pro dítě je vznik diabetu II. typu nebo obezity.

Léčba gestačního diabetu směřuje k normalizaci glykémie nalačno do 5,3 mmol/l a za hodinu po jídle do 8,0 mmol/l. Základním přístupem je dieta, nepomůže-li, podává se inzulín ve více dávkách.

(2)

### **2.3.5. PORUŠENÁ TOLERANCE GLUKÓZY (PGT)**

Tvoří přechod mezi normální tolerancí glukózy a diabetem.

Hlavním signálem jsou hraniční hodnoty glykémie nalačno -5,6-6,9 mmol/l. Při těchto hodnotách se doporučuje vyšetření perorálním glukózovým tolerančním testem (OGTT).

O výsledky OGTT se opírá diagnóza PGT, kde nejdůležitější je hodnota glykémie za 2 hodiny (mezi 7,8 – 11,0 mmol/l), kdežto glykémie nalačno je normální nebo hraniční.

Tento stav vyžaduje soustavnou péči s pravidelnými kontrolami, protože se může u části osob vyvinout diabetes (asi třetina), u části zůstává porušená glukózová tolerance i nadále a u některých se stav normalizuje (9).

I nemocní s PTG mají akceleraci aterosklerózy a jejích orgánových komplikací jako např. infarktu myokardu, ischemická choroby dolních končetin a mozkové cévní příhody.

Základní terapií je redukce tělesné hmotnosti tam, kde pacient má vyšší BMI či trpí obezitou. Pro riziko skryté manifestace DM je nutno vyšetřit glykémii alespoň jednou ročně.

(2)

## **2.4. INCIDENCE DIABETU**

Diabetes mellitus je skupinou nemocí, jejíž prevalence i incidence narůstá nejen v České republice, ale celosvětově. V roce 2003 bylo na světě 189 milionů osob s diabetem. V roce 2005 se prevalence odhaduje na 9 % světové populace (1).

Také v české republice se za posledních 30 let prevalence zdvojnásobila a diabetes nyní postihuje 6,5 – 7 % naší populace. V České republice žije v současnosti více než 686 000

diabetiků (16,19,20). Celkový počet diabetiků je tvořen více než z 99% diabetiky 1. a 2.typu, kdežto ostatní formy jsou vzácné. Diabetiků 1.typu je v ČR asi 7.5%, kdežto téměř 92% tvoří diabetici s cukrovkou 2.typu. Při analýze dat u obou hlavních typů diabetu bylo nalezeno trvalé zvyšování incidence choroby. Statistika diabetu v dětské populaci svědčí o trvalém nárůstu incidence v nejnižších věkových kategoriích! To ovšem svědčí pro zvyšující se podíl genetické účasti na rozvoji diabetu v této kategorii obyvatelstva (24). V souvislosti s 1. typem diabetu je studován vliv jednotlivých složek výživy, virových infekcí (hlavně enterovirů), vliv očkování či vliv prodělaných infekcí v raném věku (23,18 ).

Naproti tomu je zřejmé, že "západní způsob" života podmíněný nesprávnými dietními návyky (především hyperkalorická strava), snižující se fyzická aktivita a narůstající stresové vlivy se promítají do trendu vývoje diabetu 2.typu (24). U diabetu typu 2 se celosvětově hovoří o „epidemii“. Nejvyšší nárůst nemocných je v poslední době zaznamenán v rozvojových zemích, jako je Indie, Čína nebo Afrika. V Evropě jsou nejpostiženější Itálie, Řecko, Španělsko a Portugalsko.

## **2.5. KLINICKÝ OBRAZ**

Prvními projevy diabetiků bývají

- ❖ žízeň + polydipsie (patologicky nadměrná žíznivost)- je vyvolána potřebou hradit zvýšené ztráty vody při polyurii
- ❖ polyurie ( časté močení - má osmotický charakter a je tím výraznější, čím jsou ztráty cukru močí větší
- ❖ únava, malátnost
- ❖ zvýšená četnost infekcí, včetně pomalého hojení až hnisavé kožní afekce,

Dále se může projevit:

- ❖ svědění v okolí genitálů
- ❖ svalovou bolestí dolních končetin

- ❖ přechodnými poruchami zrakové ostrosti
- ❖ poruchami vědomí až komatem
- ❖ dechem páchnoucím po acetonu
- ❖ udibetiků I. typu se setkáváme i se snížením tělesné hmotnosti

Vysvětlení většiny těchto příznaků tkví v hyperglykémii. Hyperglykémie vede ke glykosurii. Ztráty vody jsou podmíněny zvýšenou osmotickou náloží při glykosurii, což vede k dehydrataci organismu a k rozvoji slabosti. Zvýšená osmolalita plazmy a její výkyvy podmiňují neostré vidění. Mohou se objevit i parestzie. Je přítomna snížená chuť k jídlu, postižený hubne, může být nausea a zvracení (zj. u diabetu I. typu). Někdy stav provázejí bolesti břicha, které vedou k podezření na náhlou břišní příhodu, jedná se však o tzv. diabetickou pseudoperitonitidu. Vzestup osmolality plazmy vede až k zastření vědomí od somnolence až po koma.

Zatímco DM I. typu mívá příznaky obvykle zřetelně vyjádřené a neměly by tedy ujít pozornosti, DM II. typu má častěji počátek plíživý a nezřídka maskovaný jinou symptomatologií (uroinfekcí, kožní infekcí, vulvovaginitidou či balanitidou). Někdy bývá diabetes II. typu odhalen náhodou náhodně při preventivních prohlídkách nebo při vyšetřování jiného onemocnění. Stanovení glykémie proto patří k základnímu biochemickému vyšetření u každého hospitalizovaného pacienta.

(9)

### **2.5.1. Symptomatologie DM I. typu**

U části nemocných dochází k postupnému tělesnému chátrání, úbytku na váze, únavě. Tyto příznaky jsou projevem nedostatku inzulínu s ohledem na metabolismus proteinů. Dochází k zvýšené proteolýze a také k lipolýze. Důsledkem toho je pokles tělesné hmotnosti, na kterém se podílí jak pokles svalové hmoty, tak také pokles tukových zásob. Prohloubené dýchání (Kussmaulovo) je výrazem rozvíjející se ketoacidózy.

Onemocnění se tedy může prezentovat jednak akutně, dramaticky až s hyperglykemickým komatem s ketoacidózou, nebo chronickými komplikacemi. (2)

## 2.5.2. Symptomatologie DM II.typu

Projevy nemoci jsou trochu jiné než u DM I.typu a proto nemoc může dlouho zůstat nepoznána. Nemocný nehubne, naopak přibývá na váze, pocit žízně zdaleka nemusí být tak intenzivní. Ani se neobjevuje acetonový zápach dechu. Často nemocného přivedou k vyšetření zcela jiné potíže. Např. svědění, zhoršené hojení poranění, zhoršení zraku, zhoršení onemocnění srdce nebo ledvin.

Mohou nastat stejné příznaky jako u DM I.typu, ale většinou jsou méně výrazné. Nástup probíhá postupně, a proto se špatně rozpoznává. (2)

## 2.6. KOMPLIKACE DIABETU

### Dělení komplikací

- A) akutní
  - hyperglykemické koma
  - hyperglykemické hyperosmolární neketoacidotické koma
  
- B) chronické
  - specifické - mikrovaskulární komplikace diabetu (diabetická neuropatie, retinopatie a neuropatie)
  - diabetická makroangiopatie
  - nespecifické - infekční komplikace
  - další nespecifické komplikace

## **2.6.1. AKUTNÍ KOMPLIKACE**

### **2.6.1.1. Hyperglykemické koma**

Je komplikací především I. typu diabetu, při vyvrcholení metabolického rozvratu. Nemocného značně ohrožuje na životě a je nutný lékařský zásah. Příčinou kómatu jsou hlavně přidružená onemocnění (akutní infekce, infarkt srdečního svalu, náhlá mozková příhoda cévního původu), které vedou k náhlému zhoršení cukrovky. Rozvoj je velmi pomalý - několik hodin, vzácněji i dnů. Tento stav se projevuje silnou žízní, nadměrným močením, zvracením, stupňující se tělesná slabost, bolesti v břiše, ztrátou vědomí. Kussmaulovo acidotické dýchání (v dechu je cítit aceton), jsou známky těžké dehydratace, srdeční akce je zrychlená, klesá krevní tlak. V krvi je vysoká hladina glukózy, v moči aceton (pH krve klesá někdy až pod 7,0).

Častost výskytu tohoto typu kómatu od počátku osmdesátých let klesá s rozvojem intenzifikované terapie diabetu I. typu inzulinem. Toto koma je nejčastěji důsledkem interkurentní infekce a dále situace kdy diabetik díky svému životnímu stylu nebo psychickým problémům si nevstříkne příslušnou dávku inzulínu. Zvláštní situaci tvoří stavy, kdy dojde k poruše funkce inzulínové pumpy a následné, často těžké ketoacidoze.

Terapie hyperglykemického ketoacidotického kómatu má tři základní pilíře: přívod inzulínu, hydratace, korekce metabolické acidózy.

(2)

### **2.6.1.2. Hyperglykemické hyperosmolární neketoacidotické koma**

Je typickou komplikací diabetes mellitus II. typu. Vyskytuje se především ve vyšším věku a ve stáří.

Ke kómatu dochází při hyperglykemii, která vede díky osmotické diuréze k extrémní dehydrataci s vysokými hladinami plazmatického natria a tedy s vysokou plazmatickou



osmolalitou. Acidoza však není vyjádřena. Důvodem pro to je fakt, že malá sekrece či účinnost inzulínu u těchto nemocných dokáže zřejmě acidoze zabránit, je však nedostatečná pro navrácení fyziologických hladin glukózy v krvi. Vyvolávajícím momentem tohoto typu komatu je především infekce, zejména bronchopneumonie, často také urosepse.

Klinický obraz je dán zejména extrémní dehydratací. Pacient je často v komatu, jindy soporózní, či somnolentní. Má snížený turgor kůže a očních bulbů. Sliznice úst a jazyka je suchá. V důsledku masivního snížení množství extracelulární tekutiny dochází k tachykardii a často arteriální hypotenzi nezřídka vedoucí až k cirkulačnímu šoku. Je výrazně snížena diuréza jako výraz hypoperfuze ledvin. Mohou se vyskytnout křeče.

Laboratorně je hyperglykémie často nad 55 mmol/l, hypernatremie často přes 165 mmol/l, celkově je osmolalita výrazně zvýšena.

Terapie spočívá v intenzivní rehydrataci a v terapii inzulínem.

(2)

## **2.6.2. CHRONICKÉ KOMPLIKACE**

### **2.6.2.1. Mikrovaskulární komplikace diabetu**

Pojem mikrovaskulární komplikace (nebo též mikroangiopatie) zahrnuje diabetickou retinopatii, diabetickou nefropatii a diabetickou polyneuropatii.

Mikrovaskulární komplikace jsou specifické pro diabetes a nemůže k nim dojít bez dlouhodobé hyperglykémie. Vyuvíjejí se jak u nemocných s DM I. typu tak II. typu.

Základními determinantami vývoje těchto komplikací je kvalita metabolické kompenzace diabetu, hodnota krevního tlaku a doba trvání choroby. (2)

Důsledkem mikrovaskulárního postižení jsou jednak strukturální, jednak funkční změny.

Mezi strukturální změny, které jsou důsledkem biochemických pochodů, patří zejména ztluštění bazální membrány kapiláry. Mezi funkční změny počítáme zvýšení kapilární permeability a zvýšení viskozity krve.

### DIABETICKÁ NEFROPATIE

V důsledku výše popsaných změn dochází v glomerulech ledvin diabetiků nejprve k hyperfiltraci, po letech naopak filtrace klesá, objevuje se mikroalbuminurie (sekrece albuminu do moči do 300 mg/den), posléze manifestní proteinemie. Masivní pokles glomerulární filtrace může vyústit až k renálnímu selhání. U části nemocných může dojít k selhání ledvin již po 20 letech trvání diabetu. S rozvojem neuropatie souvisí i rozvoj hypertenze. Nemocného můžou při silné hypertenzi obtěžovat nepříjemné bolesti hlavy. Proteinurie, edémy končetin v důsledku hypoproteinemie a také hypercholesterolemie jsou typickými příznaky nefrotického syndromu, ke kterému ve většině případů dochází.

### DIABETICKÁ RETINOPATIE

Postižení cév sítnice je analogické postižení glomerulů ledvin a většinou probíhá paralelně. Rizikové faktory jsou opět hyperglykémie a hypertenze. Dle nálezu na očním pozadí můžeme rozdělit na diabetickou retinopatii na preproliferativní a proliferativní.

Klinicky si pacient stěžuje na poruchy vizu, v pokročilých stádiích dochází ke slepotě.

### DIABETICKÁ NEUROPATIE

Diabetická neuropatie postihuje jak nemocné I., tak II. typu diabetu. U některých nemocných II. typu může být prvním příznakem jinak skrytě probíhající choroby. U diabetiků I. typu se vyskytuje již po 10 letech trvání nemoci.

Diabetická neuropatie může postihnout jak senzitivní, tak motorické neurony. Velmi často postihuje i vegetativní nervový systém.

Klinický obraz záleží na typu postižení.

Při senzitivní neuropatii se vyskytují neuropatické bolesti - přicházejí častěji v noci, nemají vyvolávající moment, pacient je nedovede přesně lokalizovat, nezabírají na běžná analgetika. Tyto poruchy senzitivity vedou vzácně až k analgezii. Proto je pro nemocné diabetem typický bezbolestný infarkt myokardu.

Při motorickém postižení se vyskytují poruchy inervace kosterních svalů a jejich důsledky.

Diabetická neuropatie se podílí na rozvoji diabetické nohy.

Diabetická noha je souhrnný pojem, který zahrnuje neuropatické, mikro- a makrovaskulární změny vedoucí k diabetickým otlakům, vředům, flegmóně a gangréně. V důsledku těchto změn může dojít i k nutnosti amputovat končetinu.

Základem přístupu k diabetické noze je prevence. Spočívá v důsledné každodenní hygieně nohou, sanaci mykotických infekcí mezi prsty, opatrné pravidelné péči o nehty.

(2)

### **2.6.2.2. Diabetická makroangiopatie**

Jako makroangiopatie se označuje postižení větších a velkých cév aterosklerozou.

Diabetes výrazně akceleruje progresi aterosklerotického procesu, speciálně u diabetiků II. typu se na tomto procesu podílí i častá hypercholesterolemie, hypertriacylglycerolemie, vyšší hladiny kyseliny močové, hypertenze. Významný podíl na progresi aterosklerozy má i chronicky vysoká glykémie. Vysoké dávky inzulínu v terapii diabetu mohou být faktorem, který vede k progresi aterosklerotického procesu.

Ateroskleróza samozřejmě není postižení, které se vyskytuje specificky u diabetiků, má však u nich několik specifických rysů:

- postižení mladších osob (u diabetiků I. typu)
- postižení periferních arterií
- rozsáhlé difuzní postižení jak končetinových arterií, tak na tepnách koronárních

Tyto nálezy pochopitelně limitují možnosti perkutánní angioplastiky i bypassových výkonů jak na koronárních, tak na končetinových tepnách.

Prevenčí aterosklerózy je normalizace hladin cholesterolu, triacylglycerolů, kyseliny močové a krevního tlaku. Důležité je udržování glykémie v normálních mezích.

(2)

### **2.6.2.3. Infekční komplikace**

Častou poruchou je snížení jak buněčné, tak humorální imunity, což vede k náchylnosti k nejrůznějším typům infekcí: pyodermie, kožní mykózy, vaginální mykózy, balanitis.

Diabetici mají těžší průběhy bronchopneumonie a infekce močových cest, ke kterým přispívá snížení tonusu močových cest a zhoršení vyprazdňování močového měchýře.

Postižení periferních tepen v myokardu a mikrovaskulární postižení myokardu charakterizuje diabetickou kardiomyopatii.

(2)

### **2.6.2.4. Další nespecifické komplikace diabetu**

Častěji se vyskytuje katarakta, paradentóza a díky obezitě i artrozy dolních končetin. Běžná onemocnění probíhají u diabetiků často dramaticky, jindy jejich symptomy nejsou díky neuropatii příliš nápadné.

(2)

## **2.7. DIAGNOSTIKA DIABETU**

Po podezření na diabetes mellitus je nejprve nutné potvrdit, že se o diabetes jedná a poté rozhodnout, o jaký typ diabetu jde.

WHO stanovila tato diagnostická kritéria:

- 1) jsou-li přítomny klinické známky diabetu, provede se nejprve stanovení glykémie (nalačno nebo kdykoliv).

Diagnózu diabetu potvrzuje u dospělých hodnota glukózy v plazmě venózní krve 11,0 mmol/l a více nebo hodnota nalačno 8,0 mmol/l a více. Naopak při hodnotě glykémie nezávisle na době a jídle pod 8 mmol/l a nalačno pod 6 mmol/l je diagnóza diabetu nepravděpodobná.

2) Když jsou výsledky nejisté, provede se zátěž glukózou (75g u dospělých nebo 1,75g/kg u dětí) a stanoví se glykémie za 2 hodiny (viz OGTT)

3) Nejsou-li přítomny klinické příznaky diabetu, je třeba provést pro potvrzení diagnózy ještě alespoň jedno další stanovení glykémie (např. 1 hodinu po podání).

(12)

Vzhledem k novým poznatkům a výraznému zvyšování počtu nemocných s diabetem, byla přijata přísnější kritéria pro hodnocení nemoci.

Vyloučení diabetu	pod 5,6 mmol/l
Zvýšená glukóza v plazmě nalačno	5,6 – 7,0 mmol/l
Diabetes mellitus	nad 7,0 mmol/l (opakovaně)

Přijato Českou společností klinické biochemie (ČSKB) a Českou diabetologickou společností (ČDS), převzato od Americké asociace pro diabetes (ADA).

### DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA

Polyurie se může vyskytovat u nemocných v polyurické fázi chronické renální insuficience a při diabetes insipidus. Žádná z těchto chorob není provázena glykosurií.

Glykosurie může přicházet také při diabetes renalis. U této vzácné jednotky jsou však glykémie i OGTT normální.

Ketonurie a sklon ke ketoacidoze se vyskytují při těžším hladovění nejrůznějších příčin. Nejsou však nikdy tak vyjádřeny jako u diabetu I. typu.

	<b>DM 1</b>	<b>DM2</b>	<b>M ODY</b>
AUTOPROTILÁTKY GAD, ICA, IAA	95%	-	-
Obezita	- / +	++++	-
Familiární výskyt	5%	méně než 50%	10 0%

Tab.1 Diferenciální diagnostika typu DM

### 2.7.1. LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ

Základním biochemickým testem je stanovení hladiny glukózy v krvi, vyšetření glykosurie, a to jednak za stavu lačnění, jednak po podání glukózy. Značný význam mají zátěžové testy. Jako marker přetrvávající hyperglykémie se užívá stanovení glykovaného hemoglobinu.

Další možná vyšetření jsou stanovení hladiny inzulínu, C-peptidu, stanovení protilátek (ICA, IAA, anti-GAD) a antigeny HLA. Doplnujícím vyšetřením může být také stanovení tuků, chloridů, osmolality, urey, kreatininu, amylázy, hořčiku, vápníku, fosforu, či C-reaktivního proteinu.

Na jednotkách intenzivní péče pro těžce dekompenzované diabetiky se používá monitorování glykémie spojené s trvalou infuzí inzulínu pomocí mikroprocesorového zařízení (umělý inzulární pankreas).

(12)

### 2.7.1.1. Glykémie

Glukóza je klíčovým energetickým metabolitem, který potřebují všechny buňky .

Za normálních okolností je glukóza jediným energetickým zdrojem pro mozek a červené krvinky. Přestup glukózy do mozku a červených krvinek není závislý na inzulínu (na rozdíl od buněk kosterního svalu, tukové tkáně a jater).

Na výsledné glykémii se podílí mnoho faktorů: příjem cukrů v potravě, rychlost vstupu glukózy do buněk orgánů a tkání, syntéza glukózy v játrech, hormony.

Udržování správné hladiny glukózy v cirkulující krvi je výsledkem správné funkce řady regulačních mechanismů – pankreatického inzulínu na straně jedné ( snižuje hladinu glukózy v krvi) a antiinsulárního účinku dalších hormonů (glukagon, katecholaminy, glukokortikoidy, růstový hormon a tyroxin) na straně druhé. Dále schopnosti jater vychytávat, metabolizovat a uvolňovat glukózu a schopnosti periferních tkání glukózu utilizovat.

Porucha se může projevit ve smyslu trvalého zvýšení hladiny glukózy – hyperglykémie, nebo snížení – hypoglykémie. Zároveň může jít o neschopnost omezit kolísání hladiny po podání glukózy (snížená tolerance na zátěž glukózou) nebo v době jejího nedostatku (hypoglykemické stavy).

(12)

#### FAKTORY, KTERÉ OVLIVŇUJÍ HLADINU GLYKÉMIE:

a) Fyzická aktivita – glykémie zprvu stoupá, později při vyčerpání glykogenových zásob klesá a dochází ke ketonemii (nadbytek ketolátek v krvi) a ketonurii. Důležitá je délka, intenzita zátěže a trénovanost pacienta

b) Psychický stres – projevuje se vyplavením hormonů dřeně nadledvin a jejich metabolickými účinky (hyperglykemií)

c) Vliv potravy – po požití stravy stoupá logicky hladina glukózy v krvi. U zdravého člověka se hladina normalizuje do 2 hodin, u diabetiků přetrvává zvýšení déle

d) Léky – např. kys. askorbová maskuje přítomnost glukózy v moči při vyšetření diagnostickými proužky. Dalším příkladem je nepřiměřená rychlost infúze (koncentrace glukózy v izotonickém 5% roztoku je 278 mmol/l)

e) Desinfekční prostředky s oxidačními účinky (chloramin, chlornan) zvyšují glukózu v séru

### ODBĚR MATERIÁLU A UCHOVÁNÍ VZORKU:

Odebírá se kapilární nebo venózní krev a glukóza se stanovuje v celé krvi, plazmě nebo séru. Přitom hodnoty se různí !!!

- v arteriální krvi jsou o 10% vyšší než ve venózní.

- hodnoty v kapilární krvi jsou nalačno o 7% vyšší než v krvi venózní; po podání glukózy je tento rozdíl asi 8%.

- v celé krvi oproti plazmě nebo séru jsou hodnoty asi o 15% nižší (pro snížený obsah v erythrocytech způsobený objemem hemoglobinu).

Rozdíl sledujeme také ve stabilitě hodnot mezi sérem a plazmou.

- jako odběrový materiál se doporučuje zkumavka s antikoagulačním prostředkem K<sub>2</sub>EDTA a stabilizátorem NaF. Přídavek NaF inhibuje glykolýzu a po mírném počátečním poklesu udrží nezměněnou koncentraci glukózy až po dobu 24 hodin. Koncentrace zůstává stabilní i v krvi, která je zchlazená (krátkodobě na +4°C), či v plazmě nebo séru po oddělení erythrocytů.

Pro dlouhodobé skladování je vhodným materiálem zmrazené sérum.

Vyšetření se provádí :

- nalačno (po noční pauze bez jídla a slazených nápojů, nejlépe mezi 7-8 hodinou ranní)

- po jídle (= postprandiální glykémie, 1 hodinu po jídle obsahující sacharidy)

- jako denní glykemický profil

- a) kompletní – 9 (7) odběrů

- b) zkrácený – 4 odběry

(14)



Jednorázové vyšetření má jen orientační cenu, neboť v průběhu dne se mohou glykémie značně měnit. Provádí se v akutních stavech, kdy očekáváme hyperglykémii nebo hypoglykémii.

Velký význam mají glykemické profily, při nichž se stanovuje glykémie několikrát v průběhu dne a noci. Výsledky pak umožňují patřičně upravit dávky inzulínu. Zavedení glukometrů umožnilo, aby si diabetik vyhodnocoval glykémie sám (self-monitoring). Více výsledků z běžného dne poskytuje věrohodnější informaci a může i posilovat motivaci diabetika k dodržování léčby.

### LABORATORNÍ METODY STANOVENÍ

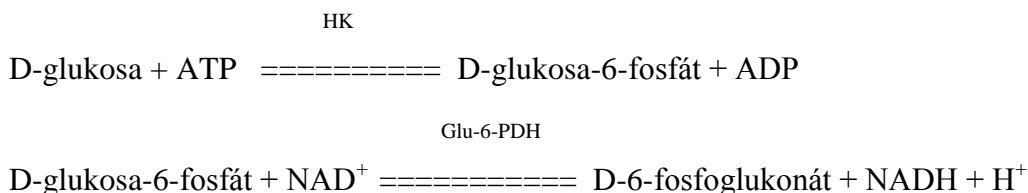
Z chemických metod má význam pro svou specifitu jedině stanovení glukózy o-toluidinem. Podobně sice reagují s o-toluidinem i cukry galaktosa a manosa, ale protože nejsou obsaženy v biologických tekutinách, je stanovení pro glukózu v séru, plasmě, moči a likvoru specifické.

Chemické metody byly plně nahrazeny rychlými enzymatickými metodami, a to zejména s hexokinázou (HK) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázou (G6PD), nejčastěji ale glukosaoxidázou (GOD) a peroxidázou (POD).

(8)

#### Principy metod

Stanovení s hexokinázou (HK) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázou (Glu-6-PDH):



HK katalyzuje fosforylaci glukósy pomocí ATP na Glukóza-6-fosfát a ADP. Glukóza-6-fosfátdehydrogenasa katalyzuje oxidaci glukóza-6-fosfátu pomocí  $\text{NAD}^+$  na NADH.

Koncentrace NADH je přímo úměrná koncentraci glukosy. Měříme nárůst absorbance při 340 nm.

Stanovení oxidační kopulací s glukosaoxidázou (GOD) a peroxidázou (POD):

Nové modifikace (optimalizace složení činidel, náhrada fenolu jeho deriváty apod.) vycházejí z původní Trinderovy metody. Stanovení je založeno na oxidaci glukózy katalyzované GOD na D-glukonolakton a peroxid vodíku. Reakce je specifická pro  $\beta$ -D-annomer glukózy. V další fázi se peroxid vodíku rozkládá za přítomnosti peroxidázy na  $O_2$  a vodu. Uvolněný kyslík vydává reakci 4 – aminoantipyrinu s 4-chlor-3-kresolem (oxidační kopulace). Vzniká červené zbarvení které je měřeno fotometricky. Jinou možností je měřit spotřebu kyslíku pomocí kyslíkové elektrody, kdy rychlost spotřeby kyslíku je úměrná koncentraci glykózy ve vzorku.

(8)

Fyziologické rozmezí (glykémie nalačno)

sérum	3,9 – 6,1 mmol/l
plasma	3,3 -5,6 mmol/l

(8)

### 2.7.1.2. Glykovaný hemoglobin

#### GLYKACE

Při dlouhodobě zvýšené koncentraci glukózy v krvi dochází k vazbě glukózy na bílkoviny (glykace).

Aldehydická skupina glukózy (event. jiných cukrů) je schopna vázat se na volné aminoskupiny bílkovin. Jde o neenzymový děj a jeho rychlost je dána součinem koncentrací reagujících složek. Protože koncentrace bílkovin v krvi je v podstatě konstantní, závisí rychlost glykace na koncentraci glukózy.

Nejprve vzniká kondenzační reakcí tzv. Schiffova baze. Tato reakce je reverzibilní a po odeznění přechodné hyperglykémie se glukóza z vazby uvolňuje. Trvá-li však hyperglykémie delší dobu, dochází k intramolekulárnímu přesmyku a vzniká tzv. Amadoriho produkt, který je derivátem fruktosaminu. Tato druhá reakce je již ireversibilní a molekula cukru zůstává na bílkovině vázána po celou dobu její existence.

(14)

Schopnost bílkovin samovolně vázat glukózu, byla objevena roku 1968. Teprve později se však zjistilo, že pokud tento děj probíhá nadměrně (jak je tomu u špatně kompenzované cukrovky), bílkoviny se poškozuji a mění se jejich vlastnosti. Čím větší je životnost bílkoviny, tím více je poškozena glykací.

AGE-látky jsou konečné produkty pokročilé glykace, které mají již zcela odlišné vlastnosti než původní bílkoviny a jsou na rozdíl od předcházejících produktů toxické.

Glykaci podléhají i bílkoviny ve tkáních a hemoglobin.

### **Glykace hemoglobinu**

Při glykaci hemoglobinu vznikají tři deriváty označované jako HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> a HbA<sub>1c</sub>. Dnes většinou stanovujeme frakci HbA<sub>1c</sub>, která představuje vlastní stabilní ketoamin.

Podle toho jak vysoká je glykémie, stoupá též hladina glykovaného hemoglobinu. I menší zvýšení glykémie, které nezpůsobí pacientovi žádné obtíže, může při delším trvání hladinu A<sub>1c</sub> zvyšovat a vést ke vzniku komplikací. Naopak krátkodobí výkyv glykémie, například při dietní chybě, hladinu A<sub>1c</sub> neovlivní, pokud je včas léčbou upraven.(14)

V případě hemoglobinu dochází k rozpadu molekuly po 3 měsících od jejího vzniku. Proto můžeme změřením glykovaného hemoglobinu získat zpětně informace o tom, jaké byly hodnoty glykémie za posledních šest týdnů. To je také doba, která odpovídá plazmatickému poločasů hemoglobinu.

Poškozené bílkoviny neplní svou funkci a zapříčiňují tak vznik některých pozdních komplikací cukrovky (právě mikro- a makroangiopatické komplikace diabetu). Glykovaný hemoglobin přitom slouží jako velice přesný ukazatel stavu všech ostatních bílkovin v těle.

(14)

## LABORATORNÍ METODA STANOVENÍ GLYKOVANÉHO HEMOGLOBINU

Krev na glykovaný hemoglobin se nemusí odebrat nalačno, protože obsahuje údaje o průměrných glykemiích za předchozí asi 2 měsíce a aktuální glykemií již nemůže být ovlivněn.

### Princip metody

Imunochemické stanovení je založeno na inhibiční latexové aglutinaci. Stanovení má několik kroků:

A) vzorek nesrážlivé krve (s EDTA nebo heparinem) se smíchá s denaturačním činidlem obsahujícím enzym proteasu. Erytrocyty jsou lyzovány a řetězec Hb je proteasou rozštěpen.

B) v alikvotu vzorku z kroku A se stanoví celkový hemoglobin přes alkalický hematin (= barevné formy všech druhů hemoglobinu vznikající v alkalickém prostředí).

C) v alikvotu vzorku z kroku A se stanoví HbA<sub>1c</sub> inhibiční latexovou aglutinací. Latexové částice jsou potaženy specifickou myší protilátkou proti lidskému HbA<sub>1c</sub>. K suspenzi latexových částic se přidá aglutinační činidlo a vzorek. Za přítomnosti HbA<sub>1c</sub> ve vzorku dochází ke kompetici o protilátku na latexových částicích s aglutinačním činidlem a tím ke zpomalení aglutinace. Rychlost aglutinace se sleduje měřením absorbance při 600 nm.

D) obsah HbA<sub>1c</sub> se vyjadřuje v procentech jako podíl k obsahu celkového Hb.

(8)

Fyziologické meze: HbA<sub>1c</sub> 2,90 – 4,20 % (25)

Hodnoty glykovaného hemoglobinu se vyjadřují v procentech celkového hemoglobinu.

Kompenzace diabetu při hodnotách HbA<sub>1c</sub> pod 4,5 % je dobrá, v rozmezí 4,5 – 6,0 % uspokojivá a nad 6,0 % neuspokojivá.

Uvedená kritéria jsou velmi přísná a někdy jen stěží dosažitelná. Vychází se z toho, že pouze hodnoty v rozsahu dobré a přijatelné kompenzace jsou účinnou prevencí vzniku pozdních komplikací.

*Falešná negativita:* u stavů se zkráceným přežíváním erytrocytů – např. hemolytické anémie, hemoglobinopatie, zvýšené hladiny celk. bilirubinu, časté hypoglykémie.

*Falešná pozitivita:* hypochromní anémie, urémie, zvýšená hladina sérových lipidů.

(14)

### **2.7.1.3. Glukoza v moči (glykosurie)**

U zdravého člověka se vyskytuje v moči malé množství glukózy (asi 0,2 g/l). To se ale běžnými testy neprokáže. Průkaz glukózy v moči svědčí o patologickém stavu. Příčinou je hyperglykémie nebo renální glykosurie ( je snížen renální práh pro glukózu).

Při hyperglykémii se tělo zbavuje nadbytku glukózy vylučováním močí. Nález glukózy v moči znamená, že glykémie stoupla nad mezní hodnotu – tzv. ledvinný práh pro glukózu. Ten se udává jako hladina glykémie 10 mmol/l po dobu 15 minut.

Glykosurie má význam pro určení denních ztrát glukózy močí. Mají být co nejmenší.

Nutno však zdůraznit, že vyšetření moče má význam pouze orientační, kdežto diagnóza diabetu se opírá o vyšetření glykemií.

Pro odhad glykémie nemají ztráty močí žádný význam, protože ke glykosurii může u některých jedinců dojít dokonce už při glykémii 2,8 mmol/l (renální glykosurie). Naopak u starších diabetiků s glomerulosklerózou může dojít ke glykosurii až při hodnotách glykémie okolo 19 mmol/l. Navíc existují nediabetické glykosurie (renální glykosurie, Fanconiho syndrom), případně jiné melliturie (laktosurie, galaktosurie, apod.), které by mohly vést k diagnóze diabetu. (12)

Glykosurii můžeme měřit ze středního proudu ranní moči, nebo častěji z moči sbírané. Sbírá se 24 hodin. Důležitý je záznam o množství této moči pro přepočítání ztrát glukózy.

Orientační vyšetření glukózy v moči se provádí specifickými testovacími proužky (např. HeptaPhan).

Indikační zóna obsahuje enzym glukooxidázu, glukóza se v její přítomnosti oxiduje vzdušným kyslíkem na glukonolakton. Zároveň vzniká peroxid vodíku, který oxiduje za přítomnosti enzymu peroxidázy chromogenní látku na barevný produkt.

Falešně negativní výsledky může způsobit přítomnost redukčních látek

Falešně pozitivní výsledky mohou způsobit látky s oxidačními účinky.

Pro kvantitativní zhodnocení je nutné použít příslušný analyzátor. Princip stanovení je stejný jako u stanovení glukózy v séru či plasmě.

Zkreslení výsledku může způsobit neúplný sběr (staří pacienti), nesprávné uchování vzorku (kvašení) apod.

Fyziologické hodnoty:

ranní moč	0.3-1.1 mmol/l
sbíraná moč za 24 hodin	0.11-0.50 mmol/l

(25)

#### **2.7.1.4. Ketonurie**

Zvýšené vylučování ketolátek (acetonová kyselina,  $\beta$ -hydroxymáselná kyselina, aceton) znamená zvýšenou lipolýzu, zvýšenou tvorbu neesterifikovaných mastných kyselin a zvýšenou produkci acetyl-koenzymu A, který není metabolizován normálně v cyklu kyseliny citronové pro nedostatečnou utilizaci glukózy. U diabetu to indikuje začínající dekompenzaci.

Průkaz se provádí testacním papírkem.

Indikační zóna obsahuje nitroprusid sodný v alkalickém pufru, který s kyselinou acetoctovou a acetonem poskytují fialové zbarvení.

Pozitivní reakci však dává pouze acetoacetát – (mnohem méně aceton), nikoli  $\beta$ -hydroxybutyrát. Posledně jmenovaný může tvořit hlavní část ketolátek při hypoxii.

Pozitivní reakce může být i při hypoglykemii jako výraz zvýšené glukoneogeneze diabetu z triacylglycerolů.

(12)

### **2.7.1.5. Stanovení mikroalbuminurie**

Mikroalbuminurie u diabetika je považována za první signál hrozícího poškození ledvin. Nalezne-li u diabetika I. typu mikroalbuminurii, lze intenzifikací terapie nejen snížit vylučování albuminu močí, ale i oddálit vznik diabetické mikroangiopatie včetně glomerulosklerózy. Nález mikroalbuminurie signalizuje hrozící poškození ledvin nejen u diabetiků, ale i u hypertoniků.

Název není specifický, protože se nejedná o nález mikroalbuminu v moči, ale o velmi nízkou koncentraci normálního albuminu v moči.

Močí se vylučuje albumin asi do koncentrace 30 mg/l. Běžné diagnostické proužky na stanovení proteinurie nebo reakce s kyselinou sulfosalicylovou však prokazují koncentraci albuminu až od 150 mg/l. Rozmezí koncentrace od 30 do 150 mg/l se tedy běžnými testy neprokáže, není však již fyziologické. Koncentrace albuminu v moči 30-300 mg/l nazýváme mikroalbuminurií. Dochází k ní obvykle asi po 4 a více letech od počátku diabetického onemocnění.

Mikroalbuminurie se často vyjadřuje v množství albuminu vyloučeném močí za časovou jednotku.

Doporučuje se sběr přes noc, kdy je nemocný v tělesném klidu. Délka sběrného období je alespoň 6 hodin, udává se s přesností na minuty.

Fyziologická albuminurie je méně než 20 µg/min.

Mikroalbuminurie je někdy také vyjadřována i jako poměr koncentrace albuminu ke kreatininu. Za fyziologické se považují hodnoty 2,8 až 22,8 mg/mmol. Stanovení se provádí z druhého vzorku ranní moči.

(14)

### **2.7.1.6. Perorální glukózový toleranční test (OGTT)**

Perorální glukózový toleranční test hodnotí schopnost organismus udržet glykémii ve fyziologických mezích. Nemocný dostane standardní dávku glukózy (75g) a sleduje se rychlost normalizace glykémie.

Správně prováděný test vyžaduje aby byly zachovány všechny podmínky nezbytné k získání náležitých výsledků (např. dostatečný přívod sacharidů v předchozích 3 dnech, nepřítomnost stresové reakce, neporušenost vstřebávání střevem či zákaz kouření během testu).

#### KDY SE TEST PROVÁDÍ ?

- při hraničních hodnotách glukózy (hodnoty glykémie nalačno 5,6 – 6,9 mmol/l.)
- při neúplně vyjádřených příznacích
- u dětí kdy trvá podezření na DM i při normálních hodnotách glykémie nalačno
- u těhotných ve 24.- 28. týdnu těhotenství

U těhotných se někdy provádí O'Sullivanův test, kdy se podává 50g glukózy. Po 60 min po požití glukózy musí být glykémie do 7.8 mmol/l. V případě vyšší glykémie se provede klasický OGTT.

Při hodnotách glykémie nalačno 8,3mmol/l u pacienta se nedoporučuje test provádět, protože by představoval příliš velké zatížení organismu. U těhotných je tato hraniční hodnota 7,8 mmol/l. Po těžké akutní příhodě (infarkt myokardu, iktus, apod.) se OGTT neprovádí dříve než za 6 týdnů.

#### VLASTNÍ PROVEDENÍ

Pacient jí před vyšetřením 3 dny stravu bohatou na sacharidy. Před odběrem lační (minimálně 8 hodin). Krev se odebere nalačno, pak se podá roztok glukózy.

U dětí se podává 1,75 g glukózy/kg hmotnosti – max 75g glukózy. Glukóza se rozpustí ve 300 ml hořkého čaje nebo vody.



Odběr se provádí 60. a 120. minutě po vypití roztoku. V těchto časech se také požaduje od pacienta moč.

Rozhodující pro lékaře jsou však hodnoty ve 120. minutě.

Pacient během vyšetření nesmí jíst, pít, kouřit a musí se vyvarovat fyzické námaze.

### Hodnocení

Plasmatická glukóza 2 hod po podání glukózy per os :

do 7,8 mmol/l	norma
7,8 – 11,0 mmol/l	porušená glukózová tolerance
11,1 a více mmol/l	diabetes mellitus

U těhotných je hodnocení přísnější. Za fyziologické se považují hodnoty nalačno pod 5,6 mmol/l a dvě hodiny po zátěži by hodnota glykémie neměla přesáhnout nad 7,8 mmol/l.

Je však nutné si uvědomit, že v těhotenství stoupá glomerulární filtrace o 50-100 % a tím se může dostat do tubulů více glukózy, než je jejich resorpční schopnost. Daleko snáze se tedy manifestuje glykosurie při snížení renálního prahu pro glukózu.

Snížená tolerance glukózy v těhotenství může být způsobena i placentárním laktogenem.

(14)

### **2.7.1.7. Intravenózní glukózový toleranční test**

Používá se tam, kde je porušená absorpce glukózy ze střeva. Na rozdíl od perorálního testu však u něho chybí stimulace sekrece inzulínu enterohormony.

Glukóza se podává intravenózně v dávce 0,33 nebo 0,5 g/kg. Krev se odebírá 6x po 10 minutách po aplikaci.

Počítá se tzv. asimilační koeficient pro glukózu (K), který je nepřímo úměrný době, za kterou klesne glykémie z nejvyšší hodnoty na polovinu (biologický poločas  $T_{1/2}$  v minutách). K udává procentuální pokles glykémie za jednu minutu.

$$K = \frac{\text{Ln } 2}{T_{1/2}} * 100 = \frac{69,3}{T_{1/2}}$$

### Hodnocení

asimilační koeficient pro glukózu je fyziologicky při hodnotě vyšší než 1,2  
pro diabetes svědčí hodnota méně než 1

(14)

### **2.7.1.8. Stanovení inzulínu**

Slinivka břišní je jak exokrinní žlázou vylučující pankreatickou šťávu do dvanáctníku, tak žláza endokrinní – beta-buňky produkují hormon **inzulín**.

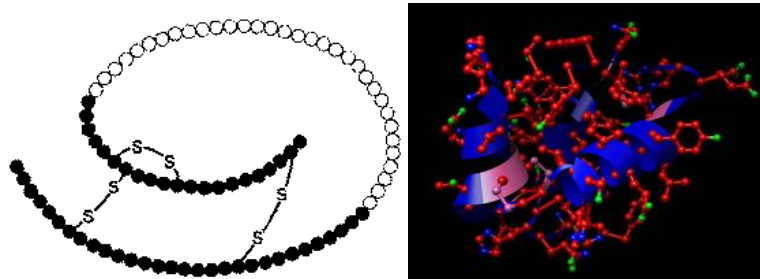
Inzulín má v těle dvě hlavní funkce. Dává pokyn k ukládání glukózy do zásob v játrech a umožňuje tělním buňkám příjem glukózy pro jejich energetickou potřebu.

Mechanismus působení: inzulín se váže nespecifický membránový receptor, následná produkce cyklického AMP vede k řadě reakcí, majících za následek aktivní transport glukózy přes buněčnou membránu. Existují však buňky (erytrocyty a buňky CNS), do nichž glukóza proniká i bez inzulínu.

(14)

### BIOSYNTÉZA A SEKRECE INZULÍNU

Inzulín je syntetizován v  $\beta$  - buňkách pankreatu ve formě tzv. proinzulinu, tj. prekurzoru inzulínu. Před sekrecí je proinzulin proteolyticky štěpen na dvou místech. Uvolní se tak **vlastní inzulín** a část, která původně spojovala oba polypeptidické řetězce inzulínu, tzn. **C-peptid**. Po odštěpení C-peptidu inzulín precipituje s ionty zinku za vzniku mikrokystalů inzulínu, skladovaných v sekrečních granulích.



Obr.1 Stuktura insulínu

Sumární vzorec	$C_{254} H_{377} N_{65} O_{75} S_6$
Molární hmotnost	5807 g/mol

Tab.2 obecná charakteristika insulínu

(7)

Stanovení inzulínu je důležité pro odlišení diabetu I. a II. Typu.

Inzulín snižuje glykémii, ale jeho jednorázové stanovení nemá význam. Nelze totiž rozlišit, kolik ho v krvi pochází z vlastní produkce a kolik vlivem jeho léčebné aplikace (exogenní inzulín). Dále také snižují výsledek event. přítomné protilátky v krvi pacienta. Proto se nejčastěji stanovuje po podání glukózy (např. při OGTT)

Stanovení inzulínu se provádí nejčastěji imunochemicky, proto se někdy užívá označení IRI (imunoreaktivní inzulín) (14)

Fyziologické hodnoty:

děti: 6-18 U/l = 0,25- 0,75  $\mu$ g/l = 43-108 pmol/l  
dospělí: 8-24 U/l = 0,34-1,00  $\mu$ g/l = 58-172 pmol/l

(12)

### **2.7.1.9. Stanovení C-peptidu**

Stanovení C-peptidu v periferní krvi lépe odráží skutečnou endogenní sekreci inzulínu než stanovení inzulínu samotného. Kromě toho při stanovení C-peptidu neinterferuje exogenní inzulín.

Stanovení se provádí po provokaci glukózou.

Fyziologické meze (nalačno) : 1,1 – 3,6 µg/l (Krause at al.)

(12)

### **2.7.1.10. Stanovení autoprotilátek**

Jak bylo uvedeno dříve, je diabetes mellitus I. typu autoimunním onemocnění. Můžeme tedy prokázat řadu protilátek v séru.

V séru diabetiků (I. typu) lze stanovit následující protilátky:

#### ICA

#### protilátky proti Langerhansovým ostrůvkům

Tyto protilátky se objevují v krvi diabetiků I. typu měsíce až roky před manifestním onemocněním a jsou výrazem autoimunitního procesu.

Test prokazuje protilátky proti různým antigenům ostrůvkových buněk pankreatu. Nejvýznamnějšími cíli jsou GAD a IA-2.

Indikace: při podezření na latentní diabetes I. typu u dětí a při podezření na vznik diabetu I. typu.

Diabetes se klinicky manifestuje, až když je zničeno asi 80 % B-buněk. I když včas prokážeme vysoký titer protilátek, a tedy můžeme očekávat vznik diabetu, nedovedeme zatím nástup onemocnění spolehlivě oddálit.

Hodnocení: výsledek je v kvalitativní podobě pozitivní/negativní

Metoda stanovení: ELISA, fluorescence

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum

### GAD

#### protilátky proti glutamátdekarboxyláze

Protilátky proti GAD se vyskytují u 70 – 80% pacientů s diabetem I.typu a u 80 – 90 % pacientů v preklinickém stadiu. Jsou však pozitivní i u 3-9 % zdravé populace.

Klinická senzitivita je limitovaná faktem, že existují lidé s vysokými titry protilátek, zvláště trpí polyendokrinním autoimunitním onemocněním. Stejně jako ICA jsou významným markerem pro latentní diabetes I.typu u dětí a při podezření na vznik diabetu I.typu.

Hodnocení: normální hodnoty 0- 32 ng/ml

Metoda stanovení: ELISA

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum.

### IAA

#### protilátky proti inzulínu

Časný marker diabetu I.typu. Protilátky jsou nalézány u 37% nově diagnostikovaných pacientů, u 4% jejich nejbližších příbuzných a u 1,5% zdravých dárců krve.

Mohou být detekovány několik měsíců až let před klinickou manifestací choroby.

Korelují s věkem pacienta. U dětí s DM I.typu do 5 let se vyskytují v 90 – 100 %, u dětí nad 12 let pouze u 40 % a klesají dále s věkem.

Pokud se vyskytnou bez současného výskytu protilátek GAD a IA-2, riziko vzniku DM I.typu se významně snižuje.

Indikace: marker DM I.typu, monitorování inzulínové terapie při hyposenzitivitě nebo v případech zvyšování potřeby inzulínu.

Hodnocení: normální hodnoty 0 – 10 U/ml

Metoda stanovení: ELISA

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum

## IA-2

### protilátky proti tyrozinofosfatáze

Protilátky jsou v závislosti na věku detekovatelné u 50 – 70 % pacientů s DM I.typu na počátku onemocnění. Vysoká prevalence je zaznamenána u dětí a dospívajících, zatímco u méně než 50 % dospělých pacientů jsou detekovány až s objevením se klinických projevů. V případě positivity u příbuzných prvního stupně je průměrná doba do objevení se klinické manifestace diabetu I.typu 1,5 roku. Tyto protilátky jsou však detekovány pouze u poloviny pacientů, u kterých dojde k rozvoji diabetu I.typu. Indikace: při podezření na latentní DM I.typu u dětí a při podezření na vznik DM I.typu.

Hodnocení: výsledek je kvalitativní pozitivní/negativní

Metoda stanovení: ELISA

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum

(22)

## **2.8. LÉČBA DIABETU**

Základem terapie DM I.typu jsou 1) substituční léčba inzulínem  
2) současně diabetická dieta

Protože DM II.typu je součástí širšího komplexu metabolických poruch jsou zde popsány obecné cíle terapie. Těmi jsou: normalizace glykémie, snížení úrovně inzulínové rezistence a normalizace hladiny plazmatických lipidů. Důležitou součástí farmakoterapie diabetiků je také léčba hypertenze.

### **2.8.1. DIETA**

Dieta tvoří v životě diabetika základní pilíř léčby (především u diabetiků II.typu), který bývá často podceňován nebo dokonce přehlížen. Samotný pacient nepovažuje dietu za léčbu a

to může vést k jejímu nedodržování až ignorování. Výsledkem je neuspokojivá kompenzace diabetu, zvyšování dávek léků včetně inzulínu, ale požadovaný výsledek se obvykle nedostavuje.

Dieta musí být vždy zvolena individuálně pro daného diabetika.

Volba diety u diabetika I. a II. typu má určité odlišnosti. U dětských a mladistvých diabetiků respektujeme růst organismu. Moderní způsoby léčby umožňují určitou volnost (zj. léčba inzulínem). Naopak u diabetika II. typu, kdy dieta zůstává prvořadým léčebným opatřením, bychom měli být přísnější.

U DM II. typu, kdy většina pacientů trpí obezitou je základní dietou dieta nízkenergetická (redukční). Doporučuje se snížení tělesné hmotnosti u osob obézních a osob s nadváhou o 5-10%. Podaří-li se dosáhnout redukce tělesné hmotnosti, většina nemocných se obejde bez léčby perorálními antidiabetiky či inzulínem.

(2)

## **2.8.2. FYZICKÁ AKTIVITA**

Podobně jako dieta patří i jakákoli fyzická aktivita k základním léčebným metodám, které neopouštíme ani když jsme léčeni tabletkami nebo inzulínem. Doporučována je mírná fyzická aktivita přibližně 30 minut denně.

U diabetu II. typu je nejčastěji vyvinutá inzulínová rezistence v kosterním svalstvu. Ochabování kosterního svalstva přispívá inzulínové rezistenci a tím také zhoršuje DM II. typu.

Je důležité aby byl diabetik dobře kompenzován, protože při zvýšené tělesné námaze u špatně kompenzovaného diabetika by mohlo dojít ke zhoršení stavu ( např. ve smyslu rozvoje ketoacidózy). Důležité je také poučení pacienta, který se léčí inzulínem nebo antidiabetiky. Při špatném dávkování léku a zvýšené fyzické námaze může dojít k hypoglykémii.

(9)

### 2.8.3. INZULÍN

Základním smyslem léčby inzulinem je substituovat chybějící funkci. U diabetu I. typu chybí jak bazální, tak stimulovaná sekrece inzulinu. Moderní terapie se snaží napodobit obě složky inzulinové sekrece.

V současné době se používají biosynteticky připravené humánní (HM) inzulíny.

#### TYPY INZULÍNU

Inzulín se získává jako čirý roztok s neutrálním pH (krystalický inzulin), který působí krátce a teprve jeho modifikací vznikají inzulíny středně a dlouho působící.

- inzulíny krátkodobě působící – mají rychlý nástup účinku, prakticky okamžitý při i.v. aplikaci, při s.c. aplikaci je nutno počítat s 30 minutovou prodlevou, ale pak působí zpravidla 5-6 hodin.
- středně dlouhodobě působící – působí průměrně 8-12 hodin (intermediální krátkodobé); 16-24 hodin (intermediální dlouhodobé)
- s dlouhodobým účinkem – působí 24-30 hodin. Mají pomalý nástup účinku (nejdříve za 2 hodiny po aplikaci inzulinu subkutánní) ale jsou schopny udržet relativně stabilní koncentraci insulínu v krvi.

Aplikace inzulinu je prováděna buď pomocí zvláštních injekčních stříkaček nebo pomocí inzulinových dávkovačů, na kterých si pacient přímo nastaví počet jednotek, které injikuje.

Aplikace se provádí subkutánně do oblasti břicha, přední strany stehů nebo paží. Jinou možností je kontinuální aplikace inzulinu pomocí inzulinové pumpy, zpravidla subkutánní do oblasti břicha.

#### INDIKACE INZULÍNOVÉ LÉČBY

Základní indikací je neexistující syntéza vlastního inzulinu, tedy u diabetu I. typu nebo tehdy, kdy byl pankreas silně poškozen či chirurgicky odstraněn (tj. sekundární



pankreatoprivní diabetes). Dále je třeba léčit inzulínem těhotné diabetičky a některé diabetiky II.typu, u nichž došlo k selhání léčby perorálními antidiabetiky (PAD).

Léčba DM II.typu inzulínem: protože bazální sekrece inzulínu je často u diabetu II.typu zvýšena a těžce porušená je zejména 1. fáze postprandiální inzulínové sekrece, kauzální přístup k léčbě diabetes II.typu je především v podání malých dávek krátce působícího inzulínu před jídlem.

Kromě snížení glykémie, což je pozitivní efekt této léčby, je však současně zvyšována i inzulinemie a to zejména v období mezi jídly, kdy inzulín není nutný v příliš vysoké hladině. Tento jev může akcelerovat aterosklerozu a vést k zvyšování váhy.

### KOMPLIKACE LÉČBY INZULÍNU

1) hypoglykémie – vzniká při relativně vyšší dávce inzulínu ve vztahu k příjmu potravy a fyzické aktivitě. Pod vlivem inzulínu je odsunuta glukóza z extracelulární tekutiny zejména do hepatocytů a svalových buněk a její hladina v extracelulární tekutině klesá. Výsledkem je stimulace sympatiku a parasympatiku, což vede mj. k tachykardii, bušení srdce, pocení, třesu, hladu a nauze. Při delším trvání se projeví nedostatek glukózy v CNS jako bolesti hlavy, zmatenost až koma (hypoglykemické koma.).

2) Lipodystrofie – lipodystrofie je úbytek tukové podkožní tkáně v místě vpichu inzulínu. Vzniká u malého procenta nemocných, z nich zvláště u těch, kteří jsou léčeni inzulíny zvířecího původu. Tito nemocní mají být převedeni na lidský inzulín.

3) Alergie- různé alergické exantemy po aplikaci inzulínu jsou rovněž důvodem k převodu na lidský inzulín

4) Přírůstek váhy, obezita a aterogeneze – pacient při léčbě inzulínem nemá přibývat na váze. Zbytečně vysoké dávky inzulínu vedou k přírůstku váhy a představují významný aterogenní činitel.

(2)

## 2.8.4. PERORÁLNÍ ANTIDIABETIKA (PAD)

Diabetes 2. typu se zachovalou sekrecí inzulínu je často provázen poruchou, při níž samotná dietní opatření nevedou k podstatnému zlepšení, ale kdy je zapotřebí podat léky stimulující sekreci inzulínu (sulfonylmočoviny, glinidy), zlepšující jeho periferní působení (biguanidy, glitazony) nebo léky zpomalující vstřebávání glukózy ze střeva (inhibitory střevních alfa-glukosidáz).

Terapie perorálními antidiabetiky by neměla být zahájena před zhodnocením efektu alespoň 8 týdnů trvající důsledné dietoterapie (výjimkou jsou případy masivní hyperglykémie). V žádném případě však použití perorálních antidiabetik nenahrazuje dietní a režimová opatření a účinky fyzické aktivity.

(3)

### 2.8.4.1. Sulfonylmočoviny

Indikace – preparáty této skupiny jsou určeny pro diabetiky II. typu, kde jsou zachovány fungující B-buňky, kdežto jejich podávání u diabetiků I. typu není odůvodnělé a naopak je kontraindikované. Jedná se zejména o diabetiky, u nichž je postižena sekrece inzulínu, neboť sulfonylmočovina může tuto poruchu napravit. Naproti tomu výrazná inzulínová rezistence u obézních diabetiků podmíněná nedostatečným účinkem inzulínu v periferních tkáních (svalová a tuková tkáň) bývá ovlivněna jen minimálně. Navíc již existující hyperinzulinémie u obézních pacientů se může ještě zvyšovat, což vyvolá spíše zhoršení inzulínové rezistence než zlepšení kompenzace diabetu. To je též důvod, proč zvyšování dávek sulfonylmočoviny u obézních jedinců se zcela mine účinkem. Zde má zásadní význam redukce tělesné hmotnosti projevující se zlepšením utilizace glukózy a tedy poklesem glykemií. Deriváty sulfonylmočoviny se podávají u neobézních pacientů.

(3)

### 2.8.4.2. Glinidy

Glinidy (repaglinid a nateglinid) vedou k rychlému uvolnění inzulínu z beta-buněk pankreatu. Diabetici nemusí čekat než začne antidiabetikum působit a proto se nemusí vystavovat zvýšenému riziku hypoglykémie. Tyto léky regulují prandiální glykémii.

Jde o novou látku v nové skupině a jako u všech nových léků bude důležité zhodnocení její účinnosti v klinických podmínkách a výsledky dlouhodobé studie.

(3)

### 2.8.4.3. Biguanidy

Biguanidy jsou zcela odlišnou skupinou, jejíž efekt je spíše antihyperglykemizující než hypoglykemizující. Nepůsobí na B-buňky, sekreci tedy nestimulují. Působí na periferii, zvyšují utilizaci glukózy, snižují glukoneogenezu a glykogenolýzu a tím i glykémii nalačno. Snižují postprandiální glykémii. Hlavním zástupcem této skupiny je metformin.

Mechanismus účinku:

- snížením resorpce sacharidů v tenkém střevě
- snížením jaterní glukoneogeneze
- snížením periferní inzulínové rezistence, zvláště v kosterním svalu

Také biguanidy (stejně jako deriváty sulfonylmočoviny) se používají v co nejnižších dávkách a za přísného dodržování kontraindikací: při jaterním selhání, ledvinovém či kardiopulmonálním selhání, alkoholismu a samozřejmě v těhotenství. Mezi nejobávanější vedlejší účinky patří těžká až fatální laktátová acidóza. Zvláště nebezpečná je kombinace biguanidů spolu s příjmem alkoholu.

Biguanidy jsou indikovány u obézních diabetiků II. typu, nedoporučuje se však ordinovat biguanid s velmi přísnou redukční dietou nebo dokonce při hladovění. Zvyšuje se tím riziko laktátové acidózy.

V léčbě můžeme kombinovat biguanidy s preparáty sulfonylmočoviny.

(13)

#### **2.8.4.4. Glitazony ( thiazolidindiony)**

Glitazony se používají od roku 1997.

Účinek spočívá ve zvýšení citlivosti svalů, jater a tukové tkáně na inzulín. Jsou tedy účinné zejména u pacientů trpících diabetem II. typu (mající syndrom inzulínové rezistence). V menší míře snižují produkci glukózy játry a mohou také zlepšovat funkci beta-buněk redukcí volných mastných kyselin. Snižují glykémii i hyperinzulinemii a podmiňují i pokles koncentrace triacylglycerolu v séru. Glitazony však nepůsobí přímo na sekreci inzulínu a proto nejsou spojovány s hyperglykemií. Glitazony svými účinky poskytují možnost účinného ovlivnění klíčových patofyziologických dějů u pacientů s 2. typem diabetu.

K vedlejším účinkům terapie patří vzestup tělesné váhy a ukládání vody. Edém nohou se objevuje u 3 – 5 % pacientů, kteří užívají glitazony. Incidence stoupá se současným užíváním jiných látek snižujících glykémii. Zvyšují ALT a AST a pokud hodnoty enzymů dosahují trojnásobné hodnoty od normálu, musí se léčba těmito léky ukončit.

Glitazony mohou být používány při kombinované terapii s metforminem nebo sulfonylureovými deriváty. Terapie není vhodná u pacientů se srdeční slabostí. Nevýhodou je také fakt, že se jedná o novou skupinu léků a tedy chybí výsledky dlouhodobých studií.

(5,6,10,17)

#### **2.8.4.5. Inhibitory alfa-glukosidáz**

Inhibitory alfa-glukosidáz zastupuje akarbóza a miglitol. Tyto léky se používají od roku 1996. Zamezují absorpci disacharidů v tenkém střevě. Výsledkem je snížení postprandiální glykémie. Působí jako kompetitivní reversibilní inhibitory alfa-glukosidazy a alfa-amylasy, které mění disacharidy na absorbovatelnou glukózu. Nerozštěpené sacharidy vedou v tlustém střevě ke vzniku metanu a tím k plynatosti a průjmům, které jsou jejich nejvýznamnějšími nežádoucími účinky. Tyto látky nezpůsobují hypoglykémii. Mohou být podávány v kombinaci s jinými perorálními antidiabetiky. Pokud v takovém případě dojde k hypoglykémii, je nutné pacientovi podat čistou glukózu.

(4,11)

### **3. CÍL PRÁCE**

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda skladování krve významně ovlivňuje pozdější biochemické stanovení koncentrace glukózy a také zda mohou některé přísady případně ovlivnit stálost tohoto parametru.

Druhým cílem byla analýza vzorku diabetiků II. typu docházející do diabetologické poradny z různých hledisek (pohlaví, komplikace, způsob kontroly a léčby).

## 4. PRAKTICKÁ ČÁST

### 4.1. MATERIÁL A METODA

#### 4.1.1. Materiál

Dva typy zkumavek Vacuette pro odběr krve - s antikoagulačním přípravkem K<sub>2</sub>EDTA a stabilizátorem NaF, a druhý typ s aktivátorem srážení. Zkumavky byly zakoupeny od firmy Dialab (Německo). Pro měření hodnot glykémie byla použita reagensie GLU3 dodávána firmou Roche (Německo).

#### 4.1.2. Přístroj

Analyzátor Cobas integra 800 od firmy Roche (Německo) pracuje na čtyřech základních principech: absorpční fotometrie pro enzymy, substráty (např. glukóza) a drogy; fluorescenční polarimetre – léčiva, hormony štítné žlázy; turbidimetrie na stanovení specifických proteinů a potenciometrie pro Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> a Li<sup>+</sup>

#### 4.1.3. Pacienti

##### 4.1.3.1. *Stabilita glykémie v séru a plazmě*

Krev byla odebrána deseti náhodně vybraným pacientům, někteří z nich měli diagnostikovaný diabetes.

##### 4.1.3.2. *Dotazník*

Dotazník byl vyplněn 70 pacienty - diabetiky II. typu z diabetologické poradny v Hradci Králové, MUDr. P. Umlauf. Pacienti vyplnili dotazník anonymně a byly seznámeni o tom, že výsledky budou použity do bakalářské práce.

#### 4.1.4. Metoda

##### 4.1.4.1. Stabilita glykémie v séru a plazmě

Každému z deseti pacientů byla odebrána krev do čtyřech zkumavek s K<sub>2</sub>EDTA + NaF (pro získání plasmy) a čtyřech zkumavek s aktivátorem srážení (srážlivá krev pro získání séra). Takto získaná krev byla v časových intervalech 15 minut, 1 hodina, 2 a 5 hodin centrifugována (10 minut při 3 000 otáčkách), čímž byl v každém časovém bodě získán jeden vzorek plasmy a jeden séra. Po centrifugaci byla v těchto vzorcích okamžitě stanovena glykémie na analyzátoru Cobas Integra 800 (Roche).

##### 4.1.4.2. Dotazník

- 1) Pohlaví :
  - a. Muž
  - b. Žena
  
- 2) Věk:
  - a. 20-30
  - b. 30-40
  - c. 40-50
  - d. 50-60
  - e. nad 60
  
- 3) Jak je léčen Váš diabetes ?
  - a. inzulínem
  - b. perorálními antidiabetiky (prášky)
  - c. dietou

4) Kdy se u Vás diabetes projevil ?

- a. před dvacátým rokem věku
- b. 20-30 let
- c. 30-40 let
- d. 40-50 let
- e. 50-60 let
- f. věk nad 60

5) Máte během dne nějaké fyzické zatížení ?

- a. sport
- b. procházky (alespoň půl hodiny)
- c. běžné práce (např. úklid kolem domu, zahrada, apod.)
- d. jiné
- e. žádné

6) Jaké jsou Vaše komplikace spojené s diabetem ?

- a. nadváha, obezita
- b. komplikace očí, ledvin či nervové poruchy
- c. kožní infekce
- d. „diabetická noha“
- e. kardiovaskulární komplikace
- f. jiné
- g. žádné



7) Prodělal(a) jste někdy diabetické koma ?

- a. ne
- b. ano

8) Jak je Váš diabetes kontrolován?

- a. pomocí glukometru každý den (self-monitoring)
- b. v diabetologické poradně – častěji než jednou za půl roku
- c. v diabetologické poradně – přibližně jednou za půl roku
- d. v diabetologické poradně - jednou za rok

#### **4.1.5. Statistická analýza**

Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± standardní odchylka (vypočítaná podle vzorce

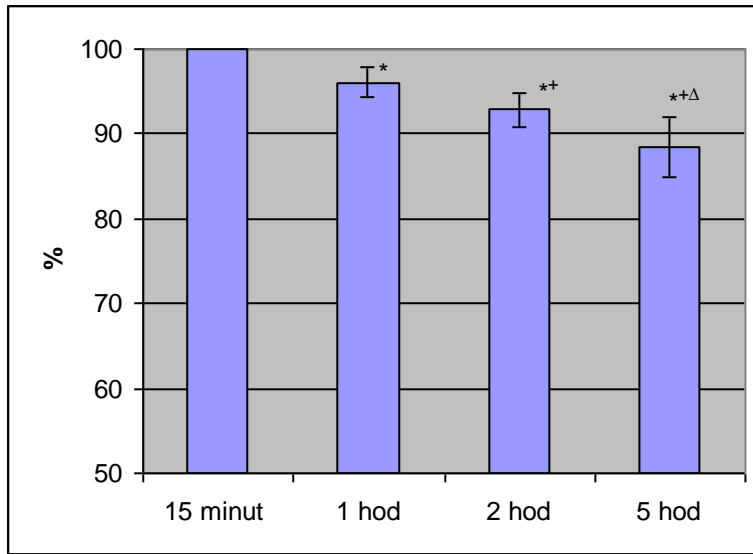
$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

). Pro statistickou analýzu stability glykémie byl využit párový T-test. Za hladinu statistické významnosti byla považována hodnota  $p < 0,05$ .

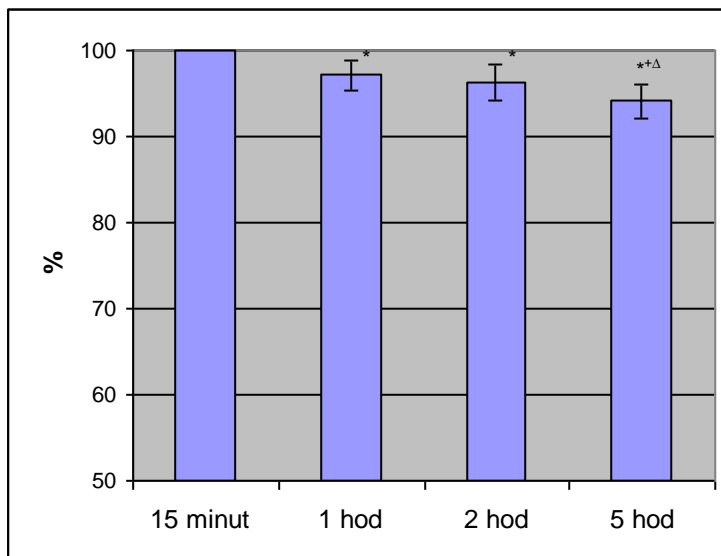
## **4.2. VÝSLEDKY**

### **4.2.1. Hladina glykémie v séru a plazmě**

V obr.2 a 3 jsou zobrazeny výsledky procentuálních poklesů hodnot glykémie v séru a plazmě, respektive, vzhledem k výchozí hodnotě (měření provedené po 15.minutách od odběru).



Obr. 2. Změna glykémie v séru v čase. \*  $p < 0.05$  vs. výchozí hodnota (15 minut), +  $p < 0.05$  vs. 1 hod,  $\Delta p < 0.05$  vs 2. hod..



Obr. 3. Změna glykémie v plazmě v čase. \*  $p < 0.05$  vs. výchozí hodnota (15 minut), +  $p < 0.05$  vs. 1 hod,  $\Delta p < 0.05$  vs 2. hod..

#### 4.2.2. Zhodnocení dotazníku

Ze 70 dotázaných bylo 39 žen a 31 mužů. Ve věku 30 – 40 let vyplnily dotazník pouze 2 ženy, ve věku 40 – 50 let jedna žena a tři muži. Celkově ve věkové hranici do 50 let vyplnilo dotazník pouze 6 pacientů. Proto byli nakonec pacienti přerozděleni do věkových skupin pod 60 (31 pacientů) a nad 60 let (39 pacientů).

Většina dotázaných pacientů (59 %) uvedla, že jejich hladina glukózy je regulována perorálními antidiabetiky. Druhou nejčastější léčbou je inzulín (18,6 %). Podrobné výsledky dotazu na způsob léčby diabetu jsou uvedeny v Obr. 4.

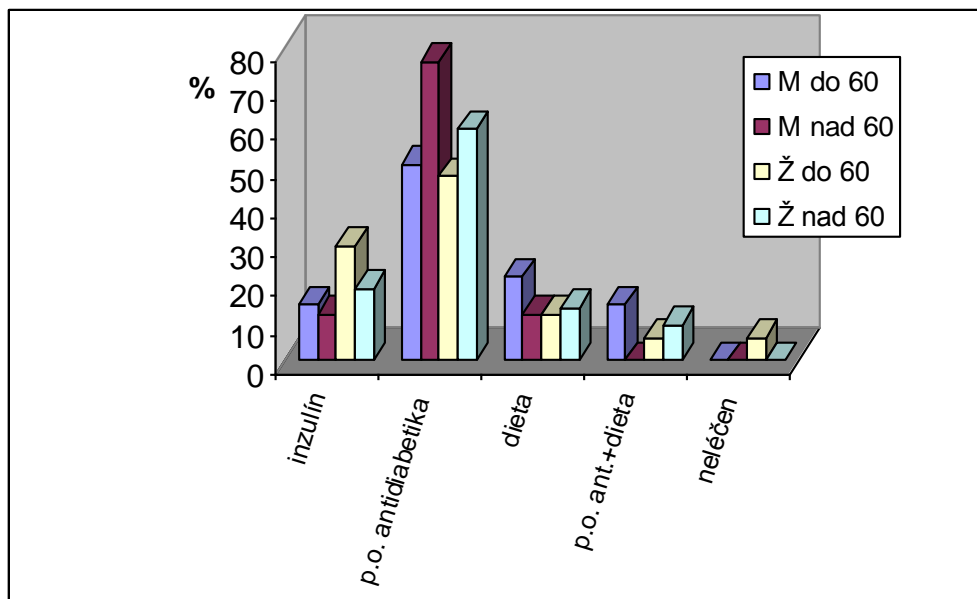
První projevy diabetu se projevily u většiny dotázaných mezi 40-60 rokem (71,4 %). Muži nejčastěji uváděli rozmezí mezi 40 – 50 rokem, kdežto ženy 50 – 60 rokem. Výsledky jsou shrnuty v Obr.5.

Nejčastější aktivita diabetiků během dne byla běžná práce (57,1 %), pak procházky (27,1 %) a nakonec sport (10%). 10 % dotázaných žen uvedlo, že nemají žádnou aktivitu. Výsledky jsou shrnuty v Obr. 6.

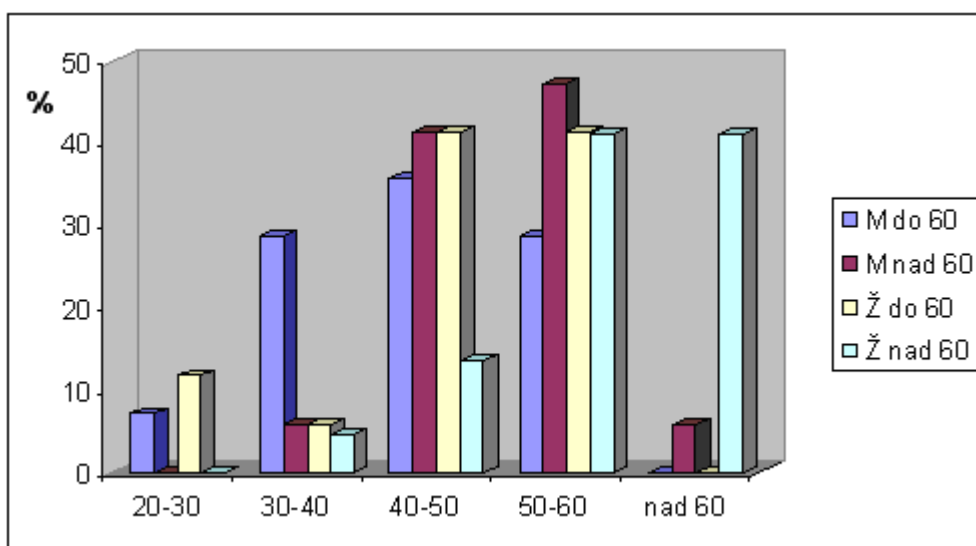
Nejčastějšími problémy vztahujícími se k diabetu (Obr. 7) byly uvedeny obezita (20,5 % žen a 32,3 % mužů) a vysoký krevní tlak (24,3 %). Pouze 13 % žen uvedlo, že nemají žádné komplikace spojené s cukrovkou, kdežto u mužů byla tato odpověď třikrát častější (39% dotázaných) .

Většina dotázaných pacientů nemá zkušenosti s diabetickým (hyperglykemickým) komatem (Obr.8). Jedna žena uvedla prodělané hypoglykemické koma.

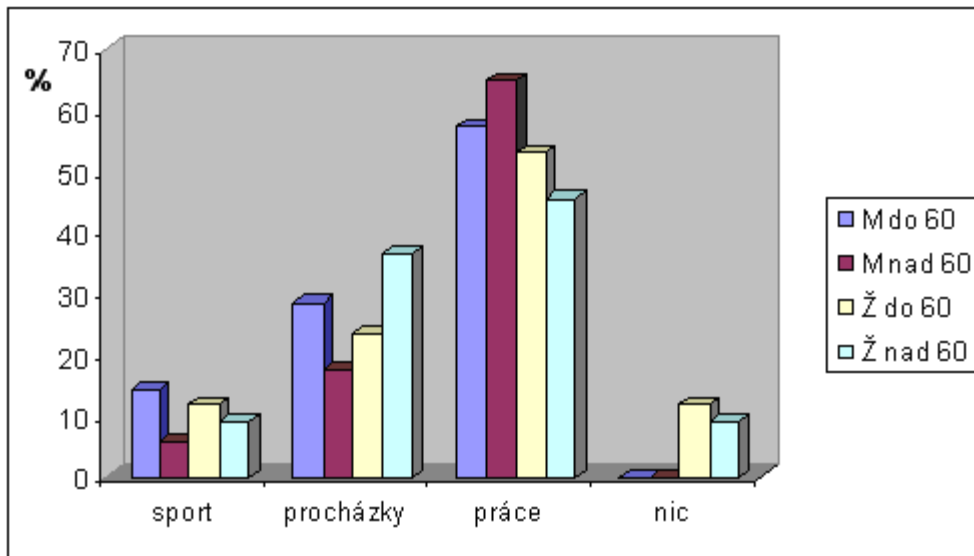
Pacienti jsou nejčastěji kontrolováni v diabetologické poradně jednou za půl roku (40 %). Poměrně velká část je vybavena glukometry pro tzv. self-monitoring (31,4 %). Osm pacientů (11,4 %) uvedlo, že si kontrolují cukr v moči diagnostickými proužky. Podrobné zhodnocení kontroly diabetiků je shrnuto v Obr.9.



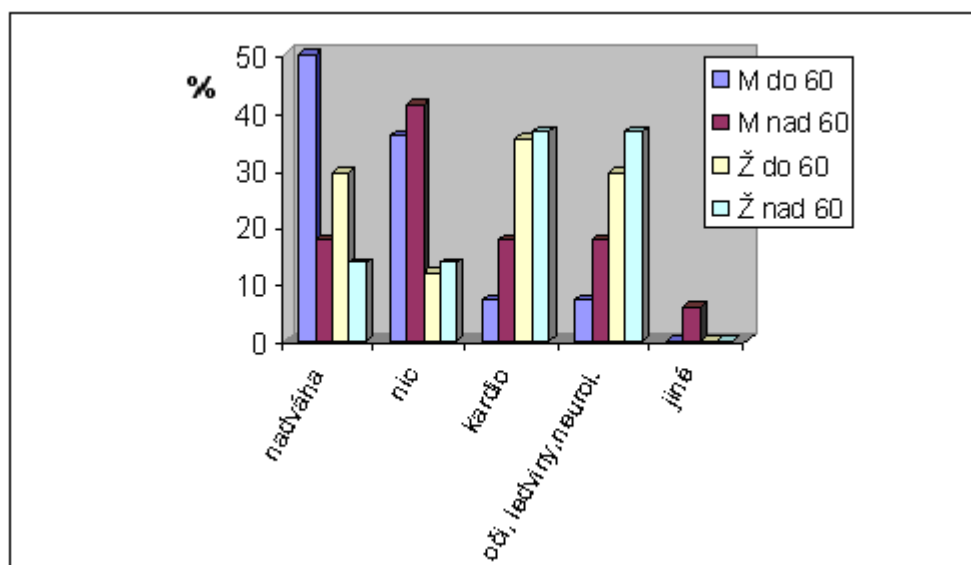
Obr.4. Procentuální rozdělení pacientů podle typu léčby vzhledem k jejich pohlaví a věkovému rozložení.



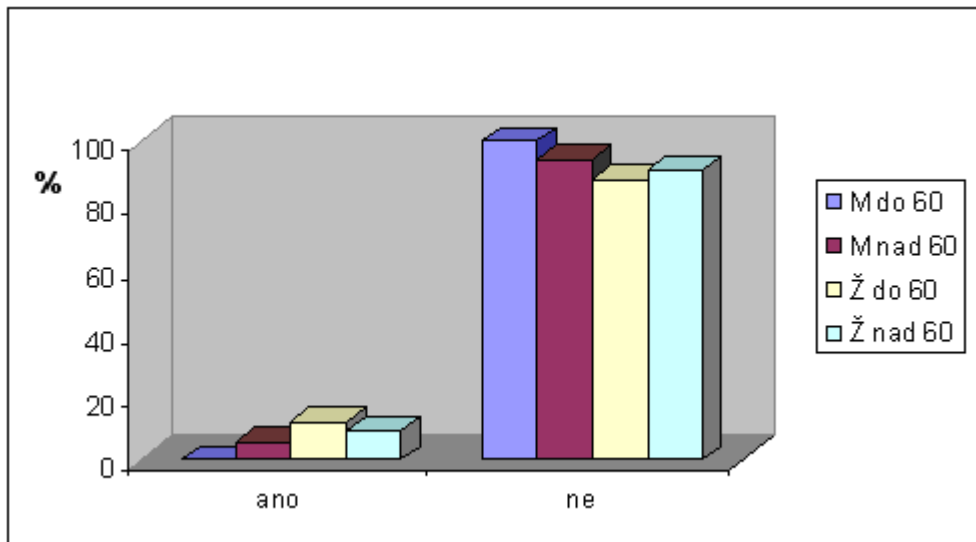
Obr.5. Procentuální rozdělení pacientů podle věku, kdy se u nich projevil diabetes



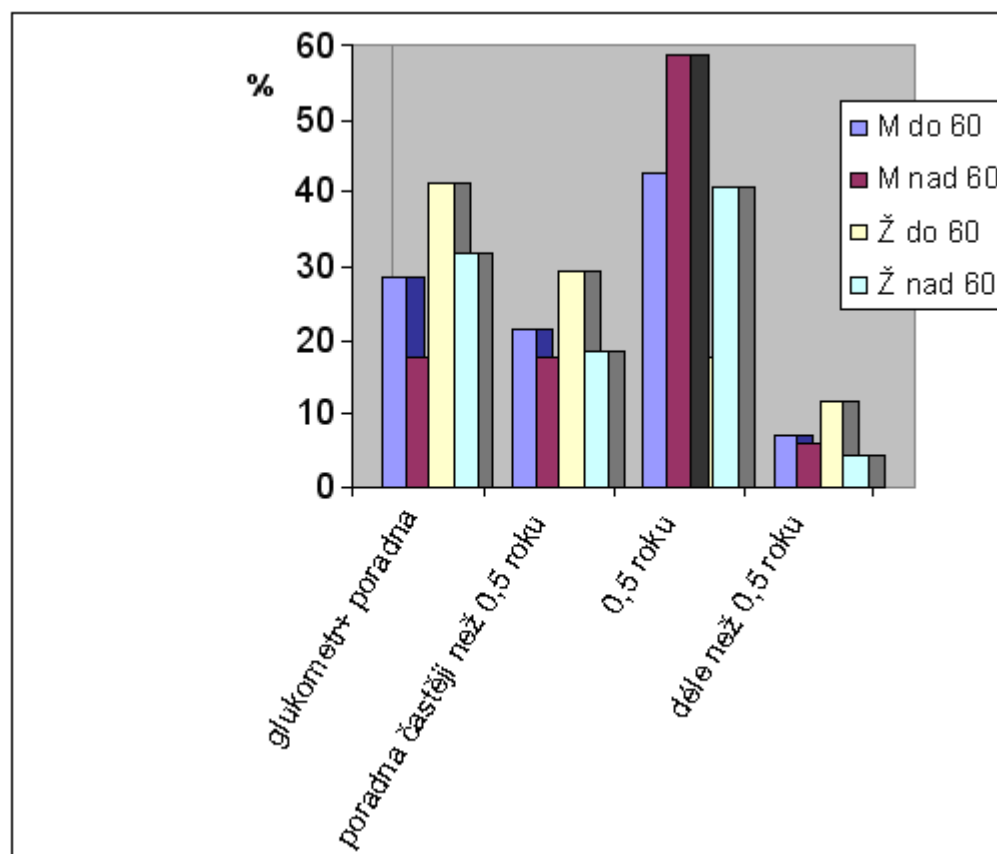
Obr. 6. Rozdělení dotázaných podle jejich denní aktivity v závislosti na věku a pohlaví



Obr.7. Problémy diabetiků v závislosti na věku a pohlaví.



Obr.8. Zkušenosti respondentů s prodělaným hyperglykemickým komatem



Obr.9. Kontrola diabetu u dotázaných.

## **4.3. DISKUSE**

### **4.3.1. Sledování stability glykémie v séru a plasmě**

V praxi se doporučuje stanovovat glykémie v plasmě získané odběrem krve do zkumavky s protisrážlivým činidlem ( $K_2EDTA$ ) a stabilizátorem NaF. Nejčastěji se však odebírá srážlivá krev a glykémie se pak měří v séru, ze kterého se stanovuje většina biochemických parametrů .

Většina laboratoří není odkázaná jen na své odběry, ale přijímá materiál také odjinud. Zpracování materiálu tedy neprobíhá hned a je potřeba zajistit podmínky, které umožní správné vyhodnocení výsledků. Z výsledků získaných v této studii vyplývá, že pokles glykémie je nižší v plasmě s přísadou fluoridu sodného než v séru bez této přísady. Fluorid sodný je známým inhibitorem enolázy (21), tedy enzymu metabolizujícího předposlední krok glykolýzy. Za pokles glukózy v krvi při biochemickém stanovení je zodpovědná enoláza v erythrocytech (14). Z výsledků je zřejmé, že k poklesu hodnot glukózy dochází i v plasmě. Je to způsobeno tím, že fluorid sodný začíná působit po delší době, která je nutná k jeho difúzi do erythrocytů, a navíc zastavuje právě až předposlední reakci glykolýzy. Ze získaných dat lze závěrem usuzovat, že stabilizace plazmy fluoridem sodným vede sice k určitému poklesu během první hodiny, ale tento pokles zůstává zachován přinejmenším během další hodiny a přestože pokles glykémie pokračuje dále, je významně snížen přidavkem fluoridu a je minimální po dobu 24 hodin (14). V případě séra je chyba způsobená měřením jednoznačně vyšší a narůstá s dobou stání odebrané krve, jak je patrné i ze statistické analýzy. V praxi se můžeme setkat i s měřením krve, která byla odebrána předchozí den, a při takovém stanovení nejsou hodnoty glykémie v séru pod 3 mmol/l výjimkou. Je třeba si uvědomit, že při takové glykémii by pacient pravděpodobně ztratil vědomí.

### 4.3.2. Dotazník

Z dotazníků nelze usuzovat zda je cukrovkou postiženo víc žen či mužů, protože bylo záměrně osloven přibližně stejný počet žen i mužů. Snahou bylo zahrnout do dotazníku co nejširší zastoupení ve všech věkových kategoriích, ale to se nepodařilo. Je to způsobeno pravděpodobně tím, že do diabetologické poradny, ve které byl průzkum uskutečněn, docházejí diabetici 2. typu staršího věku.

Protože zdravotní stav diabetiků výrazně ovlivňuje nejen jejich správná životospráva, ale také aktivní pohyb, bylo zajímavé, kolik dotázaných se snaží zlepšit svůj zdravotní stav také touto cestou. Aktivním sportem se opravdu mnoho pacientů pochlubit nemohlo. Musíme však vzít v úvahu, že se jedná o pacienty vyššího věku a často s pohybovým omezením. Právě nejčastějším problémem diabetu 2. typu je obezita. Není se však čemu divit, neboť diabetes II. typu je sdružen s metabolickým syndromem X, který zahrnuje metabolické poruchy (dislipidemie, zvýšená hladina TAG a LDL cholesterolu v krvi, a zároveň snížený HDL cholesterol), hypertenzi, obezitu, inzulinovou rezistenci a prokoagulační stavy. Je dobře zdokumentován vztah obezity a inzulinové rezistence vedoucí k hyperinzulinémii. Samotné zvýšení hladiny insulinu zvyšuje apetit a může dále vést ke zvyšování váhy, čímž se uzavírá bludný kruh. (15) Proto je tak nezbytné aby si diabetici uvědomili nezbytnost snížení váhy a důležitost aktivního pohybu, které snižují všechna tato rizika.

Většina dotázaných uvedla více komplikací spojených s diabetem, což je pochopitelné, protože cukrovka je chronické onemocnění při kterém se komplikace s postupem času vyvíjí a přibývají. Jen několik z nich však má zkušenosti s vyhocením stavu až do komatu. Tyto stavy jsou důsledkem špatné léčby či neukázněností pacienta.

Zajímavé je, že muži mnohem častěji uvedli, že nemají žádné problémy. Zda je to způsobeno jejich nevědomostí či ignorancí nelze z této studie usoudit.

Dotazníky ukázaly, že první projevy diabetu II. typu nastávají u žen většinou později než u mužů. Pravděpodobným vysvětlením je ochranný vliv estrogenů. Ženy před menopauzou jsou lépe chráněny před vznikem metabolického syndromu díky ochrannému vlivu estrogenů. Estrogen totiž, mimo jiné, snižuje hladinu cholesterolu v krvi a tím brání i vzniku aterosklerózy. Tato výhoda však odpadá s klimakteriem.



## 5. ZÁVĚR

Z výsledků této práce je patrné, že hodnota glykémie klesá výrazněji v séru bez NaF než v plasmě s NaF. Hodnota glykémie klesá v závislosti na čase a její pokles je markantnější v případě séra. Proto je důležité, aby v případech, kdy se předpokládá delší doba od odběru krve k analýze glykémie, se krev odebírala do zkumavek s antikoagulačním přípravkem K<sub>2</sub>EDTA a stabilizátorem NaF. Tímto způsobem budou hodnoty glykémie mnohem více odrážet skutečnou koncentraci.

Z dotazníků vyplývá, že edukace pacientů s DM prostřednictvím diabetologické poradny je velmi účinná a prospěšná.. Můžeme tak usuzovat z mizivého počtu pacientů, kteří prodělali diabetické nebo hypoglykemické koma nebo těch, kteří nemají významnější problémy. Pozitivní vliv této poradny na pacienty je vidět také z jejich informovanosti o nemoci a ochotě spolupracovat, čímž se podílejí na zlepšení svého stavu.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- IAA – protilátky proti inzulínu
- IA-2 – protilátky proti tyrozinfosfatáze
- ADA – American diabetes association
- ADP – adenosindifosfát
- AMP - adenosinmonifosfát
- ATP – adenzin trifosfát
- CNS – centrální nervový systém
- ČDS – Česká diabetologická společnost
- ČSKB – Česká společnost klinické biochemie
- DM – diabetes mellitus
- GAD – protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutámové
- GHB – glykovaný hemoglobin
- GOD – glukózaoxidáza
- G6P – glukóza – 6- fosfát
- G6PD – glukóza-6-fosfátdehydrogenáza
- Hb – hemoglobin
- HDL – cholesterol o vysoké hustotě
- HK – hexokináza
- ICA – protilátky proti Langerhansovým ostrůvkům pankreatu
- LADA – latent autoimmune diabetes of the adults
- LDL – cholesterol o nízké hustotě
- MODY – maturity-onset diabetes of the young, diabetes druhého typu u mladých
- OGTT – orální glukózový toleranční test
- PAD – perorální antidiabetika
- PGT – porušená glukózová tolerance
- POD – peroxidáza
- TAG - triacylglyceroly
- WHO – světová zdravotnická organizace

## 7. LITERÁRNÍ ODKAZY

- 1 American Diabetes Association. Prevention of Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2003;26 Suppl 1:S140.
- 2 Anděl Michal, Vnitřní lékařství díl V., nakladatelství, Praha, 1996, 97-121
- 3 Bartoš, Pelikánová: Praktická diabetologie. MAXDORF, Praha 2000, s. 128
- 4 Creutzfeld W. Proceedings of the first international symposium of Acarbose, Springer Verlag, Berlin, 1988.
- 5 Guilherme A, Hmoto M, Buxton JM et al: Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2000;275:38151-9.
- 6 Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A et al: IRS-I-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$  and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 1996;271:665-68.
- 7 Huang, CC, Couch, GS, Pettersen, EF, and Ferrin, TE Chimera. An Extensible Molecular Modeling Application Constructed Using Standard Components. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 1996;1:724.
- 8 Chromý V, Fischer J, Havel J, Votava M. *Bioanalytika, analytická chemie v laboratorní medicíně*, vydala Masarykova univerzita v Brně, 2002, s. 2250 – 225
- 9 Klener P a kol., Vnitřní lékařství díl IV., nakladatelství, Praha, 1999, s. 182-193

- 10 Lee Y, Wang MY, Kakuma J et al: Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem*, 2001; 276: 5629 - 35
- 11 Lebovitz HE:  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1997;26:539-51
- 12 Masopust Jaroslav, *Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření část I*, Karolinum, Praha 1998, s. 365 – 393
- 13 Perušičová J.: *Trendy soudobé diabetologie, svazek 6*. Galén, Praha, 2002, s. 21, 37
- 14 Racek Jaroslav et. al., *Klinická biochemie*, nakladatelství Galén, Praha, 2006, s.29,163 – 171
- 15 Reaven GM, Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev*, 1995; 75; 473-86
- 16 Rybka J. Ambulantní péče o diabetiky. *Medicína pro promoci*, 2005;6: 57-62
- 17 Shimomura I, Hamer RE, Ikemoto, Brown MS, Goldstein JL: Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*. 1999;401:73-6.
- 18 Szabó M. Význam markerů autoimunní inzulitidy pro klasifikaci, predikaci a prevenci diabetes mellitus. *DMEV*, 2004; 2: 77-82
- 19 Svačina Š., *Vnitřní lékařství* 2003, 49; s.362 – 367

- 20 Škrha J. Diabetes mellitus 2002 v České republice – epidemiologická studie. DMEV 2005; 1, 5-12
- 21 ten Cate JM, van Loveren C. Fluoride mechanisms. Dent Clin North Am. 1999 Oct;43(4): 713-42
- 22 Ústav klinické imunologie a alergologie FN HK, Laboratorní vyšetření v klinické imunologii, GARAMON s.r.o Hradec králové, 1. vydání, 2004, str. 50 – 51
- 23 Vavřínek J. et al. Prevence DM 1- intervenční studie v České republice. DMEV;2003; 1, s. 59
- 24 Oficiální www stránky České diabetologické společnosti – [www.diab.cz](http://www.diab.cz)
- 25 Oficiální www stránky firmy Roche - [www.roche.cz](http://www.roche.cz)