

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

FLORENCA STOJČOVSKA

DIPLOMSKA NALOGA
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

FLORENCA STOJČOVSKA

**SPREMLJANJE UREJENOSTI SLADKORNE BOLEZNI PREKO
DOLOČITVE POVPREČNE KONCENTRACIJE GLUKOZE V
KRVI**

**MONITORING OF DIABETES ORDERLINESS ACCORDING
TO DEFINITION OF AVERAGE GLUCOSE CONCENTRATION
IN BLOOD**

Ljubljana, 2012

Diplomsko naložbo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Meritve so opravili v Laboratoriju na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

Zahvala

Prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. se iskreno zahvaljujem za mentorstvo, posredovanje strokovnega znanja in za vse napotke pri pisanju diplomske naloge.

Posebna zahvala gre družini in vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplomske naloge.

Izjava

**Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja
prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.**

Ljubljana, 2012

Predsednica komisije: prof. dr. Janja Marc

Mentor komisije: prof. dr. Joško Osredkar

Član komisije za zagovor: doc. dr. Marko Anderluh

KAZALO VSEBINE

KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK.....	VII
POVZETEK.....	IX
ABSTRACT.....	X
SEZNAM OKRAJŠAV.....	XI
1. UVOD	1
1.1 SLADKORNA BOLEZEN	1
1.1.1 Tipi sladkorne bolezni	1
1.1.2 Vzroki za nastanek sladkorne bolezni	5
1.2 METABOLIZEM GLUKOZE	8
1.2.1 Glikoliza	9
1.2.2 Glukoneogeneza	9
1.2.3 Glikogeneza	9
1.2.4 Glikogenoliza	10
1.2.5 Fosfoglukonatna pot	10
1.3 C-PEPTID IN INZULIN.....	11
1.3.1 Tvorba c-peptida in inzulina	11
1.3.2 Namen določanja.....	11
1.3.3 Laboratorijska diagnostika	12
1.3.4 Vrednosti c-peptida	12
1.4 GLIKIRANI HEMOGLOBIN	13
1.4.1 Vrednotenje HbA _{1c}	14
1.4.2 Reakcija glikiranega hemoglobina	14
1.4.3 Diagnostika HbA _{1c}	15
1.4.4 Metode določanja glikiranega hemoglobina.....	15
1.5 POVPREČNA KONCENTRACIJA GLUKOZE.....	18
1.5.1 Časovni potek oblikovanja HbA _{1c}	19
1.5.2 Standardizacija in namen študij.....	19
2. NAMEN DELA	21

3. EKSPERIMENTALNI DEL	22
3.1 OPIS SKUPINE PACIENTOV	22
3.2 METODA ZA DOLOČANJE HbA_{1c}	22
3.2.1 Pomen določanja HbA _{1c}	22
3.2.2 Aparat in metoda za določanje HbA _{1c}	22
3.2.3 Inhibicijska turbidimetrična metoda.....	23
3.2.4 Oprema in instrumenti.....	23
3.2.5 Stabilnost vzorca.....	23
3.2.6 Reagenti, kalibratorji in kontrole	24
3.2.7 Kalibracija	24
3.2.8 Postopek.....	24
3.2.9 Validacija in zagotavljanje kakovosti.....	24
3.2.10 Orientacijske referenčne vrednosti	24
3.3 POMEN DOLOČANJA GLUKOZE V KRVI.....	25
3.3.1 Priprava vzorca	25
3.4 METODA S HEKSOKINAZO	26
3.4.1 Oprema in instrumenti.....	27
3.4.2 Reagenti, kalibratorji in kontrole	27
3.4.3 Podajanje rezultatov	27
3.5 METODA Z GLUKOZA-OKSIDAZO.....	28
3.5.1 Podajanje rezultatov	28
3.5.2 Oprema in instrumenti.....	29
3.5.3 Reagenti, kalibratorji in kontrole	29
3.5.4 Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle	29
4. REZULTATI.....	30
4.1 KORELACIJA MED OCENJENO POVPREČNO KONCENTRACIJO GLUKOZE IN IZMERJENO KONCENTRACIJO GLUKOZE NA TEŠČE	30
4.2 KORELACIJA MED OCENJENO POVPREČNO KONCENTRACIJO GLUKOZE IN IZMERJENO KONCENTRACIJO GLUKOZE NA TEŠČE PRI MOŠKI POPULACIJI.....	31
4.3 KORELACIJA MED OCENJENO POVPREČNO KONCENTRACIJO GLUKOZE IN IZMERJENO KONCENTRACIJO GLUKOZE NA TEŠČE PRI ŽENSKI POPULACIJI	32
4.4 UREJENOST SLADKORNE BOLEZNI IN KONCENTRACIJA GLUKOZE NA TEŠČE	34

4.5 UREJENOST HbA_{1c} V PRIMERJAVI Z VREDNOSTMI GLUKOZE	36
5. RAZPRAVA	38
6. SKLEP	42
LITERATURA	43
PRILOGA	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Značilnosti sladkorne bolezni tipa I in tipa II.....	3
Preglednica II: Statistična opredelitev vseh preiskovancev.....	30
Preglednica III: Statistična opredelitev moških preiskovancev.....	31
Preglednica IV: Statistična opredelitev preiskovank	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Kronični zapleti pri slatkorni bolezni: diabetična retinopatija, diabetična nevropatija, diabetična nefropatija, diabetično stopalo, ateroskleroza	1
Slika 2: Leva stran slike prikazuje normalno izločanje inzulina iz beta celic, medtem ko desna stran slike prikazuje uničene beta celice, zato celice inzulina ne izločajo	2
Slika 3: Prekomerna telesna teža in dednost sta dejavnika tveganja za razvoj slatkorne bolezni	3
Slika 4: Nosečnostna slatkorna bolezen. Sladkor prehaja od matere skozi posteljico k plodu. Plodova trebušna slinavka izloča večje količine inzulina, odvečen sladkor se pretvarja v mašcobe. Povečan dotok hranil tako pospeši plodovo rast.....	4
Slika 5: Geni HLA so del glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC). Razdelimo jih v tri razrede. Za razvoj slatkorne bolezni tipa I so pomembnejši geni razredov MHC I in MHC II....	5
Slika 6: Prikazuje možne kombinacije genov HLA DR v družini. Očetovi HLA DR geni so tipa DR3 in DR7; materini pa tipa DR4 in DR5. Otrok, ki je podedoval gene HLA DR3/DR4, je razvil slatkorno bolezen tipa I. Drugi otrok ima enake gene kot oboleli, a nima slatkorne bolezni, vendar pa obstaja tveganje za razvoj stanja	6
Slika 7: Metabolizem glukoze.....	8
Slika 8: Cepitev proinzulina v inzulin in c-peptid	11
Slika 9: Zgradba molekule hemoglobina.....	13
Slika 10: Strukture in deleži hemoglobinov, kjer predstavlja HbA _{1c} 5 % vseh glikiranih hemoglobinov	13
Slika 11: Vezava glukoze na hemoglobin, kjer nestabilni aldimin prehaja v stabilnejši ketoamin...14	14
Slika 12: Primerjava glikiranih (HbA _{1a} , HbA _{1b} in HbA _{1c}) in neglikiranih frakcij pri zdravi populaciji in diabetikih	16
Slika 13: Graf prikazuje stopnjo nastajanja HbA _{1c} , ki je sorazmeren s povprečno koncentracijo glukoze v krvi.....	18
Slika 14: Spremljanje slatkorne bolezni (samokontrola).....	20
Slika 15: Prikaz števila preiskovancev glede na spol.....	22
Slika 16: Dimension Xpand.....	23
Slika 17: Advia 1800.....	27
Slika 18: Vitros 250	29

Slika 19: Prikazuje linearno korelacijo med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče pri vseh preiskovancih (sodelovalo je 542 preiskovancev)	30
Slika 20: Prikazuje linearno korelacijo med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče pri moški populaciji (sodelovalo je 331 moških) ..	31
Slika 21: Prikazuje linearno korelacijo med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče pri ženski populaciji (sodelovalo je 211 žensk).....	32
Slika 22: Grafikon ponazarja delež preiskovancev, ki imajo dobro/zadovoljivo/slabo urejeno slatkorno bolezen glede na HbA _{1c}	34
Slika 23: Grafikon ponazarja delež preiskovancev z različnimi vrednostmi glukoze	35
Slika 24: Dobro urejena HbA _{1c} v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče	36
Slika 25: Zadovoljivo urejena HbA _{1c} v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče	37
Slika 26: Slabo urejena HbA _{1c} v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče.....	37

POVZETEK

Sladkorna bolezen je ena najpogostejših presnovnih bolezni, za katero je značilna hiperglikemija. Nastane zaradi pomanjkljivega izločanja hormona inzulina ali njegovega okvarjenega delovanja. Glikirani hemoglobin se uporablja kot najbolj zanesljiv način presoje kroničnih glikemij v treh mesecih pred odvzemom krvi in je tesno povezan s tveganjem za dolgoročne zaplete sladkorne bolezni. Merjenje glukoze na tešče odraža trenutno stanje in ne predstavlja urejenosti glikemije v daljšem časovnem obdobju, medtem ko je raven glikiranega hemoglobina neposredno povezana s povprečno koncentracijo glukoze in ima napovedno vrednost za kronične zaplete.

Študija ADAG je odkrila matematično formulo ($AG_{\text{mmol/L}} = 1,59 \times HbA_{1c} - 2,59$), ki lahko neposredno prevede vrednosti HbA_{1c} v povprečno koncentracijo glukoze. Vzorce krvi smo pridobili od 542 preiskovancev, katerim smo določali koncentracijo glukoze v krvi na tešče z encimom heksokinaza in z uporabo GOD-PAP metode. Relativni delež HbA_{1c} pa smo v vzorcih polne krvi določali z inhibicijsko imunoturbidimetrično metodo. Z uporabo regresijske enačbe smo izračunali vrednosti povprečne koncentracije glukoze iz HbA_{1c} ter spremljali medsebojni odnos, ki se kaže v linearni premici z zmerno korelacijo.

Med seboj smo primerjali, kako urejenost sladkorne bolezni sovpada z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče: 47,4 % preiskovancev je imelo dobro urejeno sladkorno bolezen; 29,0 % preiskovancev zadovoljivo urejeno in 23,6 % slabo urejeno sladkorno bolezen. Pri preiskovancih, ki so imeli dobro urejeno sladkorno bolezen, je bilo na dan odvzema 41,2 % tistih, ki so imeli tudi zvišano koncentracijo glukoze; pri zadovoljivo urejenih preiskovancih 78,3 % tistih, ki so imeli tudi zvišano koncentracijo glukoze in pri slabo urejenih 92,2 % tistih, ki so imeli tudi zvišano koncentracijo glukoze.

Hiperglikemija povzroča kronične zaplete, vendar z njenim znižanjem lahko zmanjšamo tveganje zanje. Pomembno je vzdrževanje glikemije v ciljnem terapevtičnem območju, saj odločilno zmanjša tveganje za dolgoročne zaplete sladkorne bolezni. Spremljanje parametrov urejenosti glikemije je torej nujno tako za oceno tveganja kroničnih zapletov kot tudi za učinek zdravljenja.

ABSTRACT

Diabetes is one of the most frequent metabolism illnesses which hyperglycemia is typical for. It arises because of insufficient secretion of the hormone insulin or its defective operation. Glucose hemoglobin is used as one of the most reliable ways to judge chronical glicemia in three months before blood taking and is tightly connected with possible long-term diabetes complications risks. Measuring of glucoses on an empty stomach reflects the current state and it does not present orderliness of glicemia in a longer period of time. However, the level of glucose hemoglobin is directly connected with average concentration of glucose and it has billed value for chronical complications.

The study ADAG has found out a Mathematics formula ($AG_{\text{mmol/l}} = 1,59 \times HbA_{1c} - 2,59$) which can directly lead the values of HbA_{1c} to the average glucose concentration. We have gained samples of blood from 542 participants whose concentration of glucose in blood has been determined on an empty stomach by an enzyme hexocynasis and by using GOD-PAP method. Relative part of HbA_{1c} has been defined with samples of full blood by turbidimetric inhibition immunoassay principle. We have calculated values of average concentration of glucose from HbA_{1c} by using regression equation. We have also observed their mutual relationship which is presented in the linear premises with temperate correlation.

We have compared how orderliness of diabetes coincides with the measured concentration of glucose on the empty stomach. 47.4 % of the investigated people have had well-organized diabetes, 29 % of the investigated people have been satisfactory and 23.6 % badly organized. 41.2 % of participants had higher values of concentrated glucose; with satisfactory organized researchers 78.3 % of those with higher numbers of glucose concentration and with badly ordered 92.2 % of those who have had higher concentration.

Hyperglycemia causes chronical complications. However, if they lower its values we can lower the risk for them. It is important to maintain glucose in the targeted therapeutical area because it lowers the risk for long-term complications of diabetes. Observation of parameters of glicemia is urgent for the risk of chronical complications grading as well as the effect of healing.

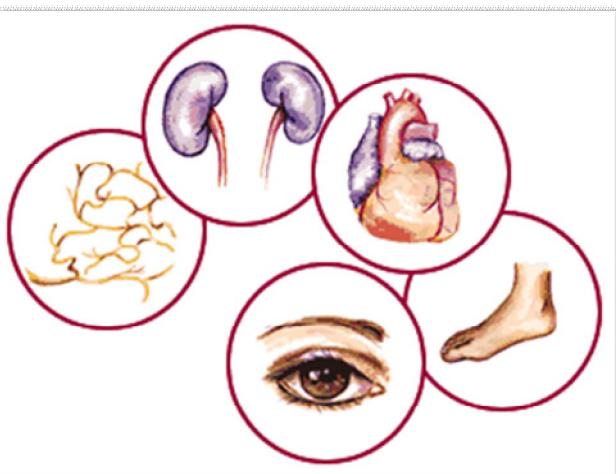
SEZNAM OKRAJŠAV

ADA	American Diabetes Association (Ameriško združenje za sladkorno bolezen)
ADAG	A1c-Derived Average Glucose study
AG	Povprečna koncentracija glukoze
ATP	Adenozin trifosfat
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
FNT	Faktor, ki povzroča nekrozo tkiva
HbA_{1c}	Glikirani hemoglobin
HLA	Humani levkocitni antigeni
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry (Mednarodno združenje za klinično kemijo)
IL-1	Interlevkin-1
MHC	Poglavitni histokompatibilni sistem
NADH	Reduciran nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Reduciran nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program

1. UVOD

1.1 SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorna bolezen je ena najpogostejših presnovnih bolezni, ki je posledica absolutnega ali relativnega pomanjkanja izločanja ali delovanja inzulina s posledično hiperglikemijo oziroma moteno presnovo predvsem ogljikovih hidratov, posredno pa tudi maščob in beljakovin. Vse to povzroča značilno klinično sliko in številne zaplete na očeh, ledvicah, živčevju in predvsem zaradi sprememb na malih in velikih žilah pomembno skrajšuje življenjsko dobo (1).



Slika 1: Kronični zapleti pri sladkori bolezni: diabetična retinopatija, diabetična nevropatija, diabetična nefropatija, diabetično stopalo, ateroskleroza

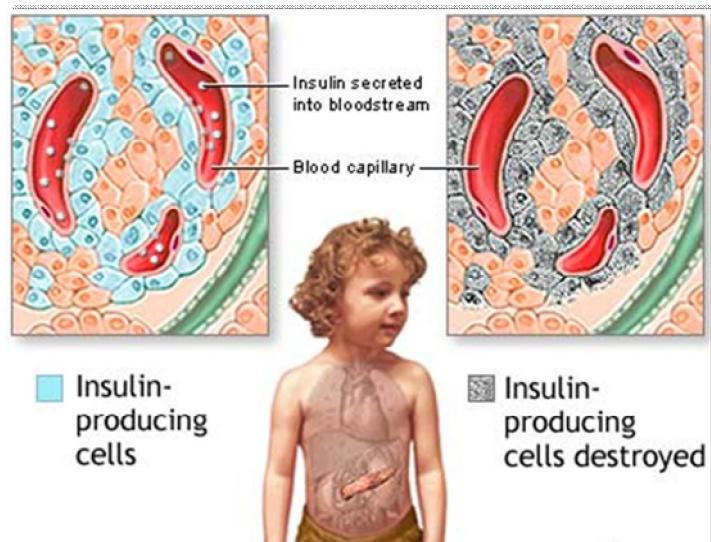
1.1.1 Tipi sladkorne bolezni

Sladkorna bolezen je etiološko heterogena, ki se razlikuje v genetskih, etiopatogenetskih in kliničnih značilnostih (2).

❖ Sladkorna bolezen tipa I

Je posledica večletnega avtoimunskega propada celic beta Langerhansovih otočkov trebušne slinavke, kar vodi do zmanjšanja ali popolne nesposobnosti sinteze in izločanja inzulina. Preživetje je možno le z nadomestnimi injekcijami inzulina. Za to obliko oboleva manj kot 10 % vseh bolnikov s sladkorno boleznjijo. Pojavlja se lahko v katerikoli starosti, običajna starost bolnikov pa je pod 30 let. Izbruhne nenadno z burno klinično sliko, pri kateri ketoacidoza ni redka. Dejavniki okolja, npr. virusna okužba ali prehrana v zgodnjem

otroštvu, spremenijo imunski sestav telesa, ki nato uniči lastne celice beta trebušne slinavke, odgovorne za tvorbo inzulina. Nekoliko je pomembna tudi dedna nagnjenost k tej bolezni, vendar manj kot pri tipu II. Ne glede na vzrok bolezni je pri slatkorni bolezni tipa I trajno uničenih 90 % celic beta trebušne slinavke (1,3,4,5).



Slika 2: Leva stran slike prikazuje normalno izločanje inzulina iz beta celic, medtem ko desna stran slike prikazuje uničene beta celice, zato celice inzulina ne izločajo

Imunsko povzročena slatkorna bolezen tipa I

Vzrok za nastanek je kombinacija avtoimunskega procesa in dejavnikov okolja. Raziskave so pokazale, da je pri enojajčnih dvojčkih le 50 % skladnost, kar kaže na to, da genetski faktorji sodelujejo pri nastanku bolezni, niso pa prevladujoči. Ob postopnem propadanju celic beta se zmanjšuje izločanje inzulina, toleranca za glukozo pa se poslabšuje (1,3).

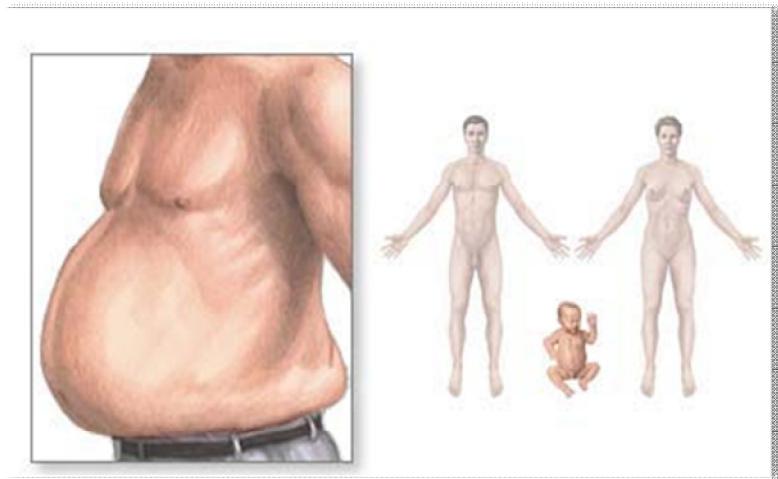
Idiopatična slatkorna bolezen tipa I

Gre za obliko bolezni s stalno hipoinzulinemijo in nagnjenostjo h ketoacidozi, vendar je mnogo redkejša in ni imunsko povzročena (1).

❖ Slatkorna bolezen tipa II

Njen nastanek sprožita odpornost proti inzulinu in oslabljena sposobnost celic beta trebušne slinavke za izločanje inzulina. Nastop bolezni ni buren in verjetno poteka prek faze zmanjšane tolerance za glukozo ali mejne bazalne glikemije. Pojavlji se lahko že v otroštvu ali mladostniški dobi, vendar je najpogostejša po 30. letu ter s starostjo narašča. Za to obliko oboleva približno 80–90 % vseh bolnikov s slatkorno bolezni. Debelost je

dejavnik tveganja za razvoj bolezni. Genska osnova je tu precej močnejša kot pri tipu I, saj je verjetnost za obolenje pri enojajčnem dvojčku bolnika s sladkorno boleznijo tipa II skoraj 100 %.



Slika 3: Prekomerna telesna teža in dednost sta dejavnika tveganja za razvoj sladkorne bolezni

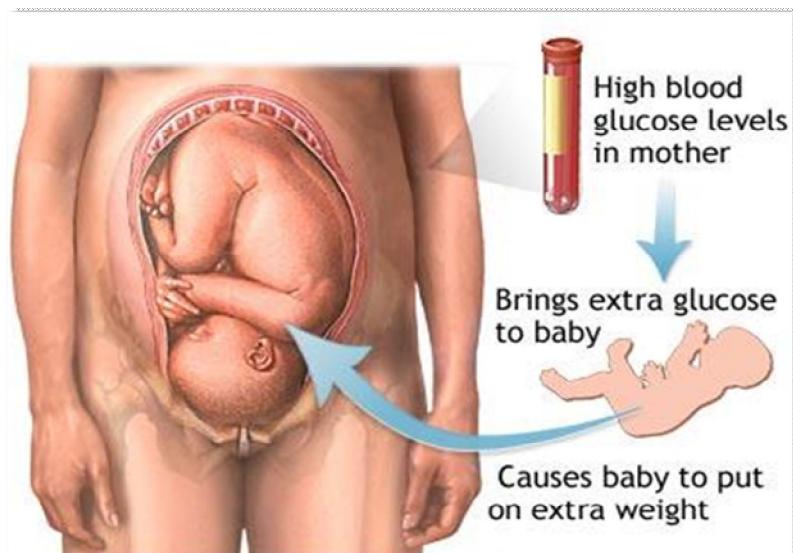
Začetni okvari pri nastanku bolezni sta zmanjšana občutljivost za inzulin in zmanjšan učinek inzulina v perifernih tkivih (periferna inzulinska odpornost), ki je največkrat gensko določena, lahko pa tudi pridobljena (debelost, nepravilna prehrana, telesna neaktivnost). Na začetku bolezni je možno vzdrževati normalno koncentracijo glukoze v krvi z zvečanim izločanjem inzulina. Povečano izločanje inzulina iz celic beta je povezano s povečanim izločanjem amilina (iz amiloida), kar v daljšem času povzroča degenerativne spremembe Langerhansovih otočkov in posledično zmanjšano izločanje inzulina (1,3,5).

Preglednica I: Značilnosti sladkorne bolezni tipa I in tipa II

Značilnost	Bolezen tipa I	Bolezen tipa II
Običajna starost	pod 30 let	nad 30 let
Običana telesna teža	normalna	povečana (80 %)
Ženske : moški	1 : 1	1,3 : 1
Anamneza	burna	neizrazita
Nagnjenost h ketoacidozi	velika	majhna
Vrsta poslabšanja	ketoacidoza	hiperosmolarni sindrom
Odvisnost od inzulina	življenska	možna
Rodbinska nagnjenost	5 – 10 %	50 %
Skladnost dvojčkov	50 %	100 %
Pogost HLA DR3, DR4	95 %	ni zvečana
Avtoimunske značilnosti	da	ne
Pomanjkanje inzulina	da	ni pogosto
Odpornost na inzulin	ne	da

❖ Nosečnostna slatkorna bolezen

Nosečnostna slatkorna bolezen se pojavi pri približno 4 % vseh nosečnosti. Nastopi zaradi povečane inzulinske odpornosti pretežno v drugem in tretjem trimestru. Razvije se pogosteje pri debelih nosečnicah, starejših nosečnicah in osebah, ki imajo v družini slatkorno bolezen. Pojavlja se v nosečnosti, vendar po porodu in končanem dojenju mine, ker se presnova glukoze normalizira. Bolnice z gestacijskim diabetesom so kandidatke za slatkorno bolezen tipa II ali moteno toleranco za glukozo v poznejšem obdobju. Sklepamo lahko, da se gestacijski diabetes razvije zaradi metabolnega stresa v nosečnosti pri ženskah, ki so genetsko nagnjene k slatkorni bolezni ali moteni toleranci za glukozo. Nekateri nosečnostni zapleti so pri diabetičnih ženskah pogostejši: okužbe sečil, glavobol, zlatenica, preeklampsija, nepravilnost placente in mrtvorjeni otroci. Za diagnostiko uporabljamo 100 g oralni glukozni tolerančni preskus (OGTT), če niso prisotni kriteriji za diagnozo na tešče (1,3,4).



Slika 4: Nosečnostna slatkorna bolezen. Sladkor prehaja od matere skozi posteljico k plodu. Plodova trebušna slinavka izloča večje količine inzulina, odvečen sladkor se pretvarja v maščobe. Povečan dotok hrani tako pospeši plodovo rast

❖ Drugi redki specifični tipi

Sekundarna slatkorna bolezen je heterogena oblika bolezni, ki se pojavlja v različnih znanih okoliščinah, pri katerih je vzročna zveza povsem očitna, ali pa gre za pogostejše pojavljanje v zvezi z nekaterimi stanji. Najpogosteje se razvije po akutnem in kroničnem pankreatitisu, poškodbah trebušne slinavke, infekcijah, endokrinopatiji, po dolgotrajnem jemanju kortikosteroidov, tiazidnih diuretikov, nikotinske kisline (4).

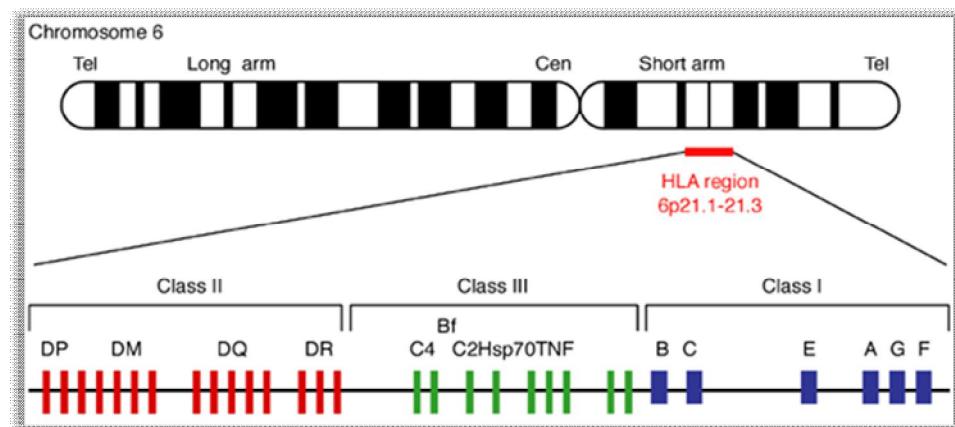
1.1.2 Vzroki za nastanek sladkorne bolezni

❖ Nastanek sladkorne bolezni tipa I

Nastane pri določeni dedni dispoziciji pod vplivom zunanjih dejavnikov, ki sprožijo v beta celicah trebušne slinavke destruktivni avtoimunski proces (2).

Genetična predispozicija

Geni MHC, ki vplivajo na njen nastanek, so locirani na kratki ročici 6. kromosoma v območju, ki določa strukturo antigenov HLA. MHC geni kodirajo pri tipu I antigene HLA D (DR, DQ, DP, DM).

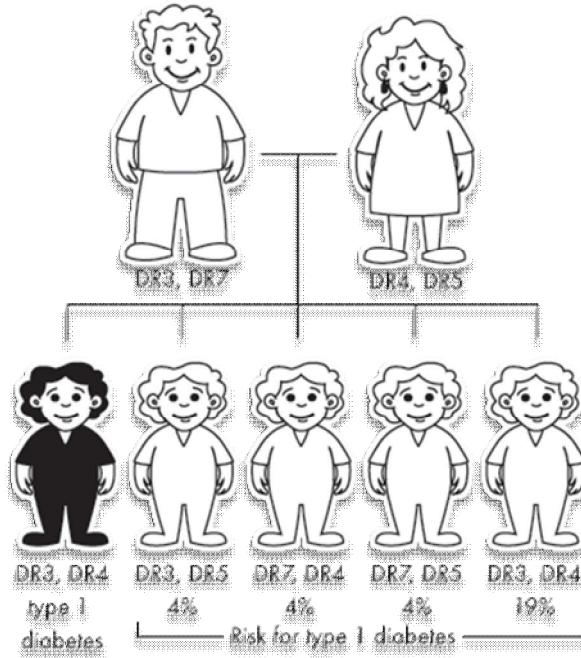


Slika 5: Geni HLA so del glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC). Razdelimo jih v tri razrede. Za razvoj sladkorne bolezni tipa I so pomembnejši geni razredov MHC I in MHC II

Pogosteje kot normalno se namreč pojavljajo njihovi proizvodi antigeni HLA DR3 in HLA DR4, vendar ti (anti)geni niso specifični za sladkorno bolezen. Znano je, da osebe s kombinacijo HLA DR3/B8 ali HLA DR4/B15 zbolijo štirikrat pogosteje kot ljudje, ki jih nimajo, saj antigeni HLA DR2 preprečujejo nastanek inzulinsko odvisne sladkorne bolezni. Pomembno vlogo ima HLA DQ, saj prisotnost aspartata na 57. mestu verige beta ščiti pred nastankom bolezni, odsotnost pa poveča tveganje za nastanek tipa I celo za 207-krat.

Pri predstavitvi in prepoznavanju telesu tujega antiga nastane na površini makrofagov kompleks med antigenom in molekulo razreda II MHC. Limfocit s svojim receptorjem, specifičnim za oba antiga, prepozna ta kompleks in se aktivira v celico T pomagalko. Ta aktivira celični in humorálni imunski odziv. Vsak permisivni antigen aktivira en klon celic T pomagalk, delovanje klonov pa zadržujejo zaviralni limfociti T. Zato je možnost

nastanka bolezni veliko večja ob kombinaciji permisivnih antigenov (npr. pri HLA DR3/HLA DR4 heterozigotnosti). Vendar pa ne zbolijo vsi nosilci antigenov z visokim statističnim tveganjem za bolezen, očitno je pomembno tudi delovanje okolja (1,2,4).



Slika 6: Prikazuje možne kombinacije genov HLA DR v družini. Očetovi HLA DR geni so tipa DR3 in DR7; materini pa tipa DR4 in DR5. Otrok, ki je podedoval gene HLA DR3/DR4, je razvil sladkorno bolezen tipa I. Drugi otrok ima enake gene kot oboleli, a nima sladkorne bolezni, vendar pa obstaja tveganje za razvoj stanja

Sprožilec uničenja celic beta iz okolja

Pri bolniku z genetično predispozicijo začne določen sprožilec proces propadanja celic β . Sprožilec ni znan, osumljeni pa so virusi mumpsa, hepatitisa, rubelle, citomegalovirusi, Coxackie B in influence. Pri okužbi z rubello v tretjem trimesečju nosečnosti pri otrokovki tkivni strukturi HLA DR3/DR4 vedno povzroči okvaro celic beta v trebušni slinavki in klinično dokazljivo sladkorno bolezen tipa I takoj po rojstvu ali čez nekaj let (2).

Vpletene imunskega odziva

Pri zdravem človeku levkociti npr. makrofagi stalno odstranjujejo škodljive klice, ki jih prepoznavajo kot tujke po antigenih na površinah bakterij, ki se razlikujejo od človeških. Za nastanek sladkorne bolezni tipa I je ključna napačna ocena makrofaga. Ta namreč opredeli antigenske komponente površine celic beta v trebušni slinavki, ki so spremenjene kot tujek in aktivirajo avtoimunski proces, ta pa v končni fazi uniči celice beta. Antigeni se sprostijo iz okvarjene površine celic beta v trebušni slinavki ob določeni sestavi HLA pod

vplivom škodljivih dejavnikov. Prek predstavitve makrofagu z IL-1 aktivira celice T pomagalke, ki začnejo sproščati različne limfokine, predvsem IL-1 in interferon γ . Ta spodbuja že aktivirane in do tedaj neaktivirane makrofage ter celice ubijalke k izločanju faktorja, ki povzroča nekrozo tkiva (FNT), ki hkrati z IL-1 povzroča okvaro celic beta. Hkrati limfokini, ki jih sproščajo T pomagalke, aktivirajo vedno nove celice iste vrste in makrofage, ki prodirajo v Langerhansove otočke in povzročajo v njih avtoimuno vnetje (insulitis) z značilno limfocitno infiltracijo. Limfokini aktivirajo tudi limfocite B, ki sprostijo protitelesa proti površinskim in citoplazmatskim komponentam celic beta, kar povzroči njihovo dodatno poškodbo. Natančen vzrok propada celic beta ni znan, kaže pa, da limfokini, predvsem IL-1, FNT in interferon γ , v mikrookolju celic beta povzročajo propad celic s kopičenjem zelo toksičnih prostih radikalov, z zmanjšanjem antioksidantnega potenciala in s kopičenjem oksidov ter peroksida (2).

❖ Nastanek sladkorne bolezni tipa II

Ključna vzroka za nastanek bolezni sta neustrezen življenski slog in genetske spremembe, ki vplivajo na spremenjeno izločanje inzulina. Njen nastanek sprožita odpornost proti inzulinu in oslabljena sposobnost celic beta za izločanje inzulina. Prizadeta je sposobnost beta celic, da proizvajajo inzulin in/ali povečano odpornost na njegovo delovanje v nekaterih tkivih (predvsem v mišicah) ter čezmerno nastajanje glukoze v jetrih (22).

Trebušna slinavka

Moteno je spoznavanje koncentracije glukoze, izločanje inzulina pa ni usklajeno s spodbujanjem. Patohistološka slika Langerhansovih otočkov kaže degenerativne spremembe s sorazmerno dobro ohranjenimi celicami beta. Opazno je odlaganje amiloida, kateremu prepisujejo tudi možno vpletenost v nenormalno delovanje celic beta.

Odpornost proti inzulinu

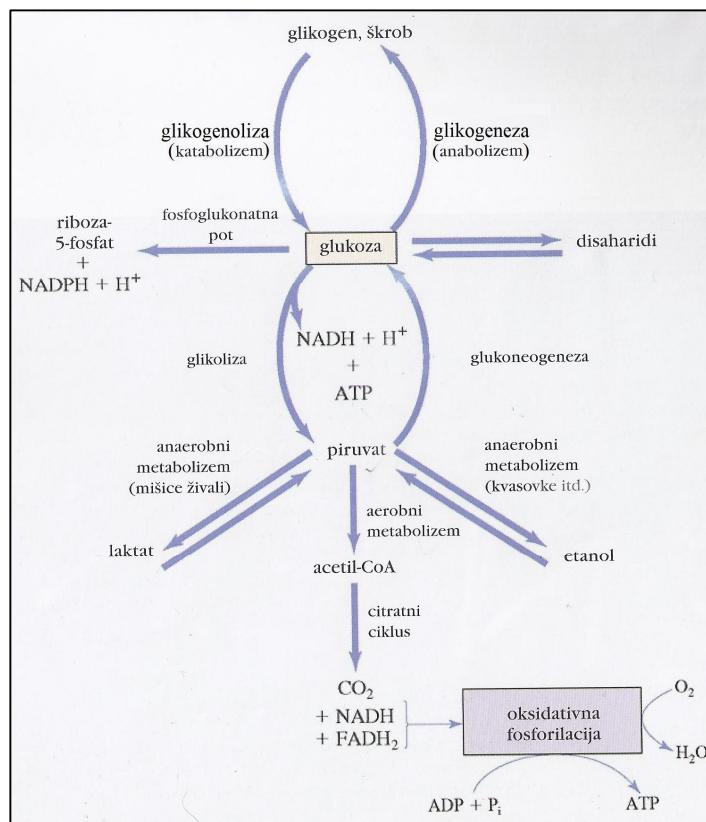
Periferna odpornost nastane zaradi motenj na receptorskem in poreceptorskem nivoju. Zmanjšano je število receptorjev in aktivnost tirozin kinaze. Eden od mehanizmov toksičnosti je verjetno reverzibilno zaviranje tirozin kinaze preko protein kinaze C na receptorski podenoti beta. Posledica receptorske motnje je zmanjšana občutljivost za delovanje inzulina, kar pomeni, da je za enak učinek potrebna večja koncentracija. Pri poreceptorskem motnji je moč učinka inzulina v celoti zmanjšana.

Nadzor nad sproščanjem glukoze iz jeter

Normalno tako inzulin kot zvečana koncentracija glukoze uspešno zavreta sproščanje glukoze iz jeter. Pri slatkorni bolezni tip II se to ne zgodi. Možni vzroki so: odpornost jetrnih celic proti inzulinu, prenehanje učinka glukoze zaradi kronične hiperglikemije ali pa učinek zvečane koncentracije glukagona v krvi (4).

1.2 METABOLIZEM GLUKOZE

Po zaužitju hrane se hranila resorbirajo v kri. Enostavni sladkorji in aminokisline pridejo po portalnem sistemu do jeter. Od 40 do 60 % glukoze se tu zadrži za energijske zaloge, večji del se pretvori v glikogen, po zapolnitvi njegovih zalog pa se ostanek pretvori v maščobne kisline. Ostali del glukoze zapusti jetra in se v perifernih tkivih shrani kot mišični glikogen, del pa se oksidira. Če celica v določenem trenutku potrebuje energijo, mora takrat potekati glikoliza in razgradnja glikogena, kar zagotovi dovolj glukoza-1-fosfata za glikolizo. Kadar je poraba energije manjša, se mora razgradnja glukoze v glikolizi upočasniti, glukoza pa se s pospešeno sintezo glikogena shranjuje za prihodnost (4,6).



Slika 7: Metabolizem glukoze

1.2.1 Glikoliza

Glikoliza je oksidativni proces, v katerem se sprošča energija, ki izvira iz oksidacije glukoze in se uporabi za sintezo ATP in NADH. Razgradnja glukoze poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja je glikoliza, v kateri iz glukoze nastaneta dve molekuli piruvata oziroma laktata in ATP. Druga stopnja razgradnje poteka ob prisotnosti kisika v mitohondriih. Pričenja se s Krebsovim ciklusom, v katerega vstopa piruvat preko acetil koencima A. Glukoza se v tem ciklusu razgradi do ogljikovega dioksida in vode. Pri tem se sprostijo protoni, ki vstopajo v dihalno verigo, v kateri poteka oksidativna fosforilacija, ob tem pa se sprosti energija v obliki ATP. Nekatera tkiva oziroma celice nimajo mitohondrijev in pridobivajo energijo samo v procesu glikolize. Takim tkivom pravimo glikolitična tkiva, to so npr. eritrociti, sredica ledvic in nekateri tipi skeletnomišičnih vlaken, ki sicer imajo mitohondrije, vendar se mišična vlakna zaradi posebne vrste prekravavitve pogosto nahajajo v anaerobnih razmerah (6,7).

1.2.2 Glukoneogeneza

Sintezo glukoze iz izhodnih spojin, ki niso ogljikovi hidrati, imenujemo glukoneogeneza. Izhodne spojine za sintezo glukoze so lahko piruvat, laktat, glicerol in številne aminokisline ali druge majhne biomolekule. Če organizem potrebuje energijo, se prosta glukoza sprosti iz uskladiščenih zalog. Najpomembnejši nesladkorni vir so aminokisline, ki se lahko pretvorijo v aminokislino alanin, ta pa v piruvat, iz katerega lahko nastane glukoza. Proces glukoneogeneze poteka v glavnem v jetrih, lahko pa tudi v kostnih celicah in v skorji ledvic. Proses glukoneogeneze je bistven za preživetje organizma med stradanjem in stresom (6,7,8).

1.2.3 Glikogeneza

Po obroku hrane se viški glukoze vključijo v anabolni proces, ki mu pravimo glikogeneza. To je proces pretvorbe glukoze v glikogen. Sposobnost skladiščenja glikogena imajo samo jetrne celice in skeletnomišična vlakna in še v slednjih je ta sposobnost omejena. Preostali viški glukoze se zato pretvorijo v proste maščobne kisline, ki se skladiščijo v obliki trigliceridov v maščobnih celicah.

1.2.4 Glikogenoliza

Proces razgradnje glikogena imenujemo glikogenoliza. Glukoza, ki se sprosti iz jetrnega glikogena, je na voljo vsem celicam, glukoza iz skeletnomišičnega glikogena pa samo skeletnomišičnim vlaknom za potrebe mišičnega dela (7).

1.2.5 Fosfoglukonatna pot

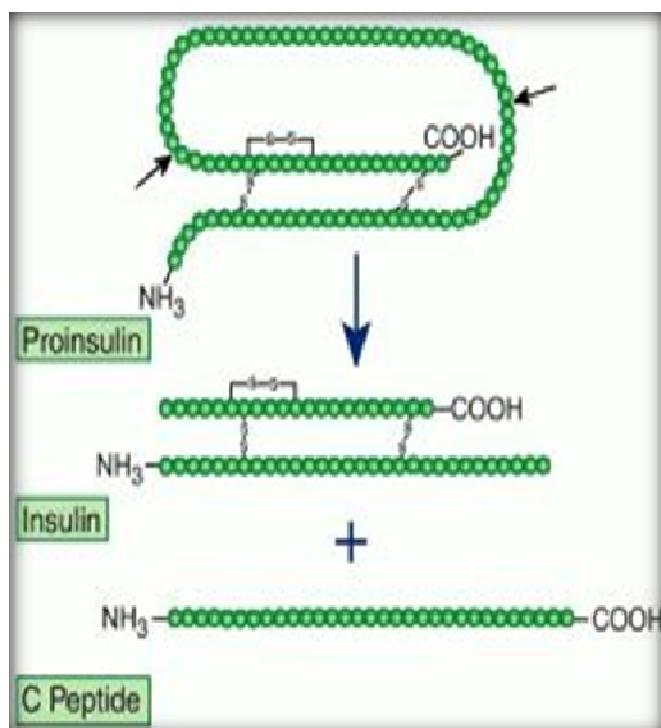
Je dodatna pot za oksidacijo glukoze pri živalih. Fosfoglukonatna pot oksidira glukozo do pentoze riboza-5-fosfata in pri tem nastane reducirani koencim NADPH. Riboza-5-fosfat je prekurzor za sintezo nukleotidov, nukleinskih kislin in mnogih koencimov. NADPH pa je potreben za redukcijske reakcije v biosinteznih procesih, še posebej v tkivih, kjer nastajajo maščobne kisline in steroidi. Fosfoglukonatna pot ne poteka v skeletnih mišicah. Za aktivacijo glukoze je potreben le en ATP in vsi ogljikovi atomi v glukozi se porabijo za nastanek riboza-5-fosfata in CO₂. Na vsako glukozo, ki vstopi, nastane ena molekula riboza-5-fosfata in dve molekuli NADPH (6).

1.3 C-PEPTID IN INZULIN

1.3.1 Tvorba c-peptida in inzulina

Prvi proizvod v celicah beta je preproinzulin, kateremu se hitro odcepi del molekule in nastane biološko neučinkovit proinzulin. Sestavljen je iz dveh polipeptidnih verig A in B, ki sta med seboj povezani z dvema disulfidnima mostovoma in še z veznim c-peptidom. V Golgijevem aparatu se tvorijo zrnca, v katerih se pod vplivom endopeptidaz proinzulin razgrajuje v inzulin in c-peptid.

V ekvimolarni količini tako nastaneta c-peptid in dvoverižni hormon inzulin, ki se z eksocitozo izločita v izvencelično tekočino. Končni izločki celic beta so inzulin (95 %), c-peptid v ekvimolarni količini in proinzulin (5 %) (3,4).



Slika 8: Cepitev proinzulina v inzulin in c-peptid

1.3.2 Namen določanja

Trebušna slinavka sočasno izloča inzulin in c-peptid. Nahajata se v enakih količinah, zato lahko raven c-peptida pokaže, koliko inzulina proizvede trebušna slinavka. Tip I je avtoimunski proces, kjer se beta celice popolnoma uničijo v daljšem časovnem obdobju, zato se proizvaja manj ali nič c-peptida. Pri sladkorni bolezni tipa II je povečana

proizvodnja inzulina, kar povzroči poškodbe beta celic, zato ima bolnik normalno ali visoko raven c-peptida. Sintetični inzulin nima c-peptida, zato bo imela oseba z visoko koncentracijo glukoze po uporabi inzulina še vedno nizko vrednost c-peptida. Inzulinom povzroči, da sprosti trebušna slinavka več inzulina, posledično pa tudi padec krvnega sladkorja. Osebe z inzulinom bodo imele visoko koncentracijo c-peptida in visoko vrednost inzulina v krvi (23).

1.3.3 Laboratorijska diagnostika

Merjenje koncentracije 24-urnega urina je zanesljiv pokazatelj celotne količine dnevno proizvedenega inzulina. Koncentracije v serumu (plazmi) se analizira zjutraj, tešče in z obremenitvenim glukoznim testom. Inzulin se določa z metodama RIA (radioimunološko določevanje) in EIA (encimsko-imunološko določevanje).

C-peptid se meri v serumu in urinu radioimunološko. Klinične aplikacije c-peptida vključujejo razlikovanje med endogenim in eksogenim hiperinzulinom. Koncentracije c-peptida v krvi so večje od inzulina zaradi daljše razpolovne dobe (9,12,23).

1.3.4 Vrednosti c-peptida

Povišane vrednosti

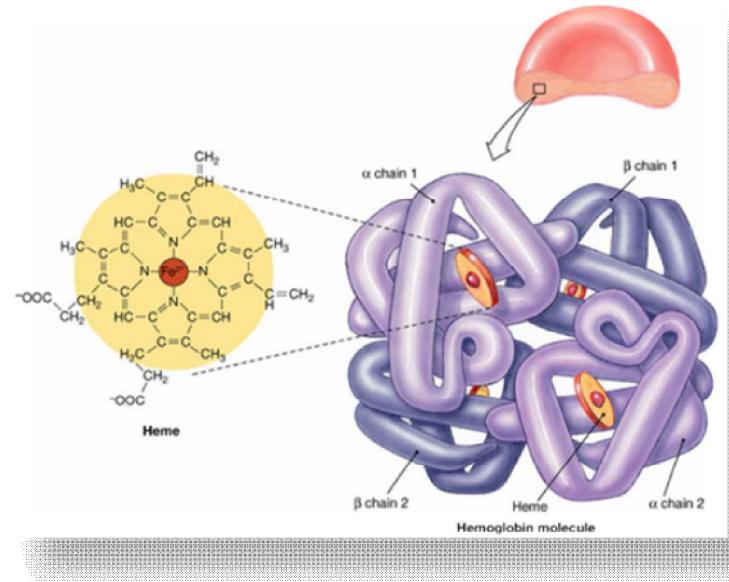
Visoke vrednosti c-peptida in glukoze v krvi najdemo pri ljudeh, ki imajo slatkorno bolezen tipa II in odpornost proti inzulinu (Cushingov sindrom). Visoka raven c-peptida z nizko ravnijo glukoze v krvi lahko pomeni, da inzulin proizvaja tumor trebušne slinavke (inzulinom) oziroma uporaba nekaterih zdravil, ki povisajo vrednost. Če je po odstranitvi inzulinoma koncentracija c-peptida še vedno visoka, sumimo na ponovitev tumorja ali razširitev na druge dele telesa (metastaziranje). C-peptid se izloča preko ledvic, zato je zvišana vrednost prisotna pri obolenju ledvic.

Znižane vrednosti

Znižane vrednosti obeh (c-peptida in glukoze) najdemo pri bolezni jeter, Addisonovi bolezni, hudih okužbah in inzulinski terapiji. Nizko vrednost c-peptida z visoko ravnijo glukoze najdemo pri slatkornih bolnikih tipa I. Popolna odstranitev trebušne slinavke (pankreatomija) povzroči, da se c-peptid toliko zniža, da ga ni več mogoče izmeriti. Raven glukoze se bo zviševala, zato je nujen inzulin, da bo oseba preživila (24).

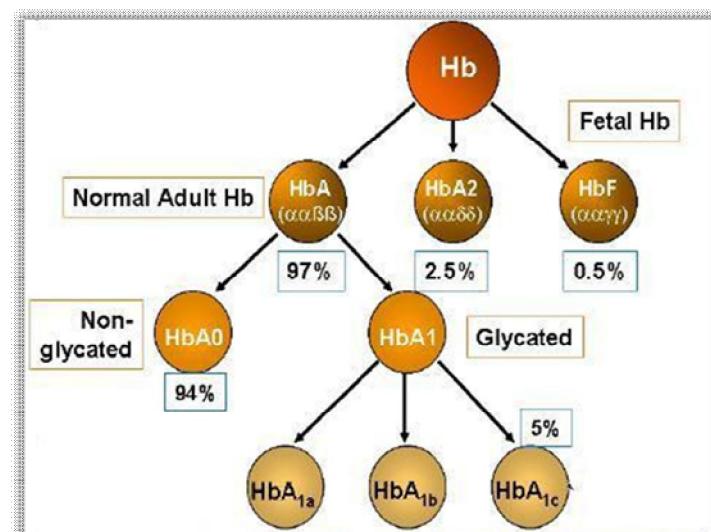
1.4 GLIKIRANI HEMOGLOBIN

Hemoglobin je beljakovina, ki je normalen sestavni del rdečih krvničk. Naloga hemoglobina je prenašati kisik iz pljuč po žilah do tkiv, kjer se kisik porabi za pridobivanje energije. Na HbA_{1c} se veže krvni sladkor, zato ga imenujemo glikirani hemoglobin.



Slika 9: Zgradba molekule hemoglobina

Z ionsko izmenjevalno kromatografijo je možno iz hemolizata eritrocitov ločiti šest glavnih komponent glikohemoglobina (HbA₁): HbA_{1a1} (na beto verigo hemoglobina je vezana fruktoza-1,6-difosfat), HbA_{1a2} (na beta verigo hemoglobina je vezana glukoza-6-fosfat), HbA_{1b} (struktura ni poznana), HbA_{1c} (na beta verigo hemoglobina je vezana glukoza), HbA_{1d} (struktura ni poznana), HbA_{1e} (struktura ni poznana) (10).



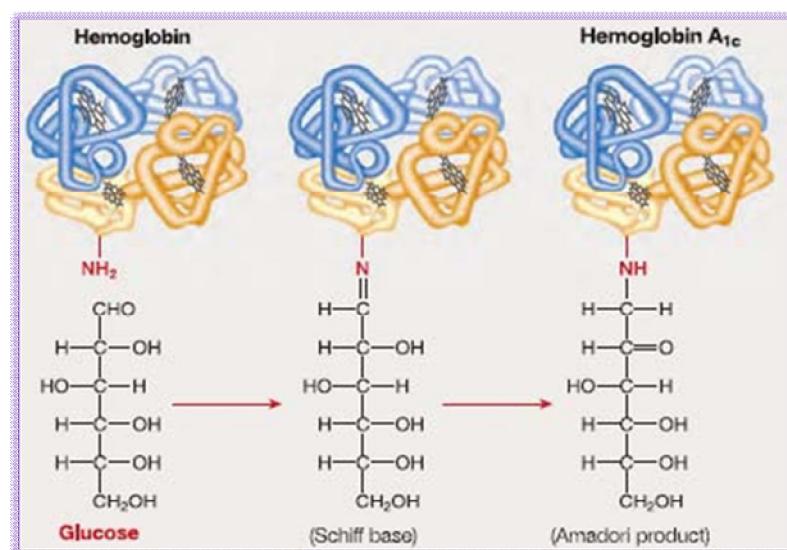
Slika 10: Strukture in deleži hemoglobinov, kjer predstavlja HbA_{1c} 5 % vseh glikiranih hemoglobinov

1.4.1 Vrednotenje HbA_{1c}

Sistematsko določanje vrednosti sladkorja v krvi, ki ga izvajajo bolniki sami, če se zdravijo z inzulinom, je vodilo za sprotne popravke vrednosti sladkorja v krvi, izvid HbA_{1c} pa za splošno urejenost sladkorne bolezni. Urejenost glikemije ocenimo z HbA_{1c}, ki je mera za urejenost glikemije v daljšem časovnem obdobju in ima napovedno vrednost za kronične zaplete. Izrazito nizek, pod 6,5 % od običajnih vrednosti meritev sladkorja v krvi, podaja sum na pogosta obdobja nizke ravni sladkorja v krvi. Normalna vrednost glikiranega hemoglobina je do 7,0 %. Sladkorni bolniki jo redko dosežejo, vendar se ji z dobrim nadzorom bolezni lahko približajo. ADA priporoča merjenje glikohemoglobina najmanj dvakrat letno pri sladkorni bolezni tipa I in tipa II ali štirikrat letno, če smo spremenili režim zdravljenja (1,3).

1.4.2 Reakcija glikiranega hemoglobina

HbA_{1c} se sintetizira pri neencimski reakciji med terminalno amino skupino aminokisline valin beta verige hemoglobina in aldehidno skupino glukoze. Relativno hitro se tvori Schiffova baza oziroma aldimin-hemoglobin ali pre-HbA_{1c}. Ta labilna oblika glikohemoglobina se z Amadorijevim prestrukturiranjem počasi pretvarja v stabilnejšo ketoamino obliko glikohemoglobina HbA_{1c}. Prvi del reakcije je reverzibilen, drugi del pa ireverzibilen (10).



Slika 11: Vezava glukoze na hemoglobin, kjer nestabilni aldimin prehaja v stabilnejši ketoamin

1.4.3 Diagnostika HbA_{1c}

Priporočene so metode, s katerimi dosežemo znotraj laboratorijskega koeficienta variacije <3 % in med laboratorijskimi koeficienti variacije <5 %. Želeni cilj terapevtskega režima po DCCT je vrednost glikohemoglobina <7 %, (referenčni interval je 4–6 %), režim zdravljenja pa je potrebno prevrednotiti pri vrednostih >8 %. Na vrednost glikiranega hemoglobina ne vplivajo starost, spol, etična pripadnost, sezonske spremembe in akutna stanja. Na lažno znižanje glikohemoglobina pa vplivajo vsa klinična stanja z znižano življensko dobo eritrocitov ali znižano povprečno starostjo eritrocitov (hemolitična anemija, akutna izguba krvi).

1.4.4 Metode določanja glikiranega hemoglobina

V uporabi je več kot 30 različnih metod, v glavnem pa spadajo v dve skupini. Prva kvantificira glikiran hemoglobin na osnovi različnega naboja glikiranih in neglikiranih komponent. Druga pa temelji na strukturnem razlikovanju glikiranih in neglikiranih komponent. Referenčni metodi po priporočilih IFCC sta masna spektroskopija in kapilarna elektroforeza, ki sta bolj specifični. Hemoglobinopatije (HbS, HbC...) interferirajo odvisno od metode, zato je v teh primerih priporočena boronatna afinitetna kromatografija, kjer so ti vplivi manj izraziti (3).

Metode, ki so odvisne od razlike naboja molekul

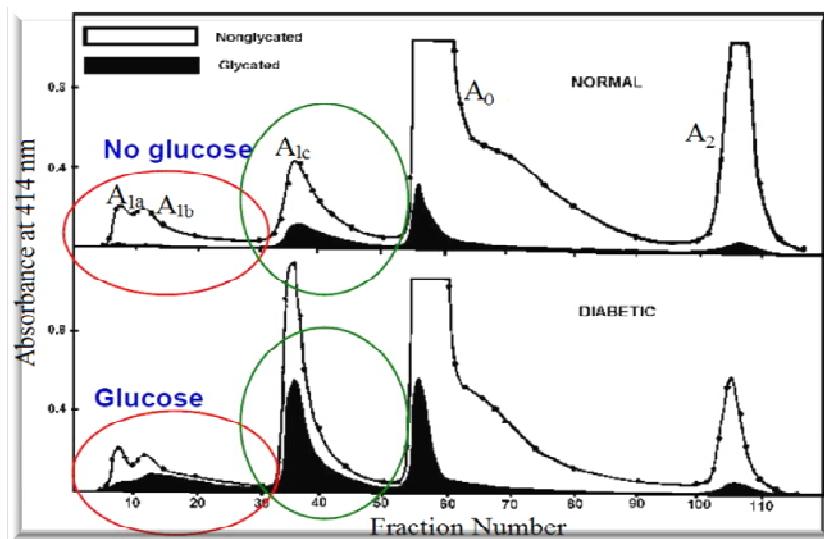
1. Ionsko-izmenjevalna kromatografija s HPLC (referenčna metoda)

Glikohemoglobin se določi iz venske ali kapilarne krvi po predanalitični obdelavi vzorca. Z boratnim pufrom odstranimo nestabilno obliko pre-HbA_{1c}.

Princip:

Ionsko izmenjevalna HPLC uporablja tri fosfatne pufre z naraščajočo ionsko jakostjo, ki potujejo skozi kromatografsko kolono v točno določenih časovnih zaporedjih. Analizna kolona vsebuje sferični kationski izmenjevalni gel. Originalne metode uporabljajo makrokolumnne, ki omogočajo ločevanje posameznih frakcij HbA_{1a}, HbA_{1b} in HbA_{1c}, pri čemer bolj negativno nabite molekule eluirajo pred HbA₀. Ta proces zahteva velike količine pufra in cianidov. pH je ključnega pomena, saj že majhna sprememba vpliva na stopnjo separacije manjših hemoglobinov. Mikrokolumnne so v veliki meri nadomestile

zgoraj navedeni sistem, vendar s to metodo ni mogoče izmeriti glikiranega hemoglobina kot ločene frakcije, ampak le kot HbA₁. Labilen hemoglobin vodi k visokim vrednostim HbA₁, zato se ga mora pred testom odstraniti. Prisotne so tudi variante hemoglobina, na primer HbF (fetalni hemoglobin), ki sočasno eluirajo z HbA₁ in daje lažno zvišane vrednosti. HbC in HbS eluirajo sočasno z HbA, kar vodi k podcenitvi vrednosti HbA₁. Hemoliziran vzorec hrаниmo pri konstantni temperaturi 2 ± 8 °C, preden se avtomatsko vbrizga v sistem. Detekcija se vrši pri valovni dolžini 415 nm in 690 nm. Vse operacije kontrolira mikroprocesor, ki izračuna odstotek HbA_{1c} in odstotek HbA_{1(a+b+c)}.



Slika 12: Primerjava glikiranih (HbA_{1a}, HbA_{1b} in HbA_{1c}) in neglikiranih frakcij pri zdravi populaciji in diabetikih

2. Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Proteine z različnim nabojem najbolje ločimo z IEF, ki temelji na izoelektrični točki. Hemolizat nanesemo na poliakrilamidni gel, ki vsebuje amfolit s pH 6–8. Pri elektroforezi skozi pH gradient potujejo proteini tako daleč, dokler ne dosežejo svoje izoelektrične točke, tj. do položaja, kjer je pH izenačen z njim. Ta metoda ima prednost, saj se HbF, HbC in HbS ločijo med seboj, vendar pa je sam postopek drag.

3. Elektroforeza v agaroznem gelu (AGE)

Molekule vzorca potujejo skozi tridimenzionalno mrežo agaroznega gela. Vzorec damo v jamico, ki je na koncu gela, in vključimo električno napetost. Ločene sestavine lahko obarvamo ali osamimo. Bistveno je, da se tu odpravi labilna komponenta. HbC in HbS se premikajo k anodi do HbA in ne motijo ocene, HbF pa se premika na isto točko kot HbA₁.

Metodi, ki ločujeta na osnovi strukturnih karakteristik karbohidratnih skupin**hemoglobina****1. Afinitetna kromatografija**

Za ločevanje in izolacijo snovi izrabljamo njihovo selektivnost reverzibilnega vezanja z ligandom. Glikiran hemoglobin se adsorbira na afinitetni gel, medtem ko snovi, ki nimajo afinitete do liganda, potujejo neovirano skozi kolono. Adsorbirana frakcija se nato odstrani s spiranjem s kompetitivnim ligandom visoke koncentracije.

Princip:

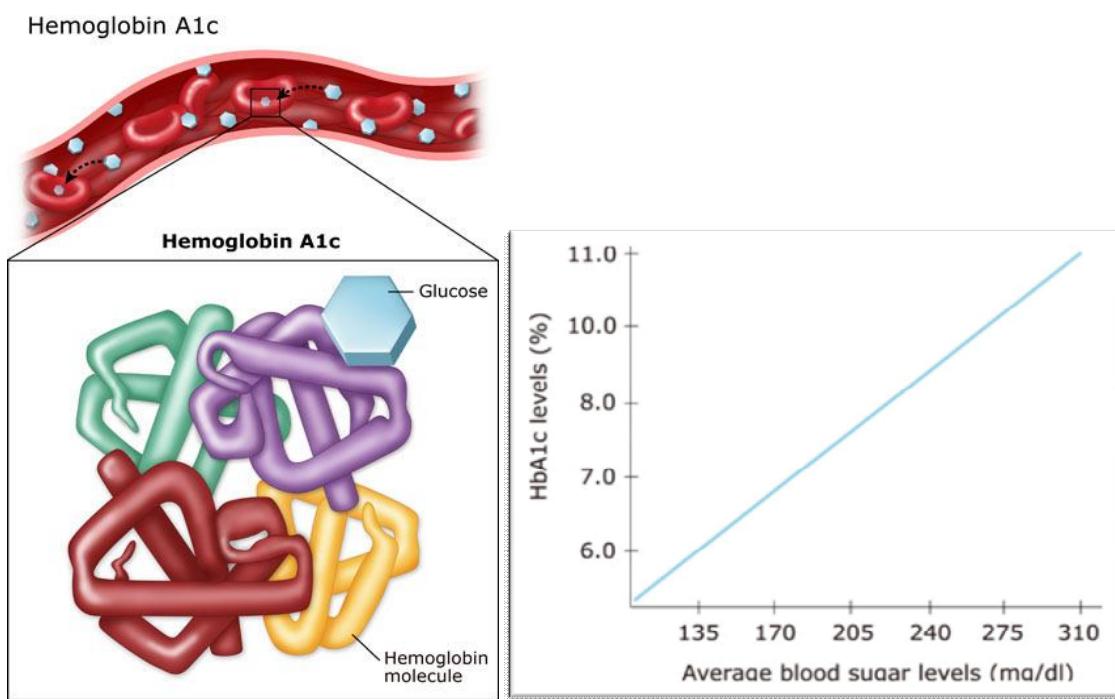
Glikohemoglobin določimo direktno iz polne krvi z dodatkom antikoagulanta (EDTA, heparin).

Sladkorji v glikohemoglobinski molekuli se specifično vežejo s polianionskim afinitetnim reagentom (dihidroksiboronat in negativno nabite molekule poliakrilata), pri čemer nastane negativno nabit kompleks, označen s fluoroformom (4-metilumbeliferon). Na principu elektrostatične interakcije s kationskim steklenim nosilcem prihaja do ločitve glikohemoglobina od reakcijske zmesi in potencialnih interferirajočih snovi. Z optičnim sistemom merimo intenziteto fluorescence 4-metilumbelifera, ki je sorazmerna koncentraciji glikohemoglobina in celotnega hemoglobina.

Sorbitol označen s fluoroformom tekmuje z glikohemoglobinom za boronatna vezavna mesta na steklenem nosilcu, pri čemer se odstrani glikohemoglobin. Po dodatku sorbitola merimo intenziteto fluorescence. Preko kalibracijske krivulje, ki jo dobimo s šestimi kalibracijskimi točkami pa odčitamo koncentracijo celotnega glikohemoglobina. Rezultate podajamo kot razmerje glikohemoglobina glede na celotni glikohemoglobin (10,11,13).

1.5 POVPREČNA KONCENTRACIJA GLUKOZE

HbA_{1c} se uporablja kot najbolj zanesljiv način presoje kroničnih glikemij v zadnjih tednih in mesecih. Tesno je povezan s tveganjem dolgoročnih zapletov sladkorne bolezni, zato vsi cilji vodijo k preprečevanju razvoja teh zapletov. Odkrili so, da imajo molekule hemoglobina sekundarno lastnost, ki jo lahko uporabimo za spremljanje koncentracije krvne glukoze, in sicer sposobnost, da se veže z glukozo. Eritrocitna membrana je prepustna za glukozo, ki vstopa v celico, kjer se veže na hemoglobin. Stopnja nastajanja glikohemoglobina je sorazmerno povezana s koncentracijo glukoze v krvi. Ko se glukoza veže na hemoglobin, ostaja večinoma pritrjena na eritrocite, dokler ne mine 120 dni, kolikor traja življenjska doba eritrocita. Vsi dejavniki, ki skrajšajo eritrocitno preživetje, bodo zmanjšali tudi koncentracijo glikohemoglobina. HbA_{1c} nam kaže nadzor glukoze v krvi v zadnjih 2–3 mesecih in je bistvenega pomena za spremljanje ustreznosti zdravljenja sladkorne bolezni ter za prilagoditev terapije. Vzrok za povečano vrednost glikiranega hemoglobina pri sladkorni bolezni (pretežno zvišana komponenta HbA_{1c}) je v preveliki neencimski glikaciji, ki se je zgodila skozi življenjsko dobo eritrocitov (14,15,16).



Slika 13: Graf prikazuje stopnjo nastajanja HbA_{1c}, ki je sorazmeren s povprečno koncentracijo glukoze v krvi

1.5.1 Časovni potek oblikovanja HbA_{1c}

Test glikiranega hemoglobina pokaže, koliko glukoze je pritrjeno na hemoglobin, torej na del v krvi, ki nosi kisik. Hemoglobin pobira glukozo v enakem sorazmerju, kakor je ta prisotna v krvi. Če je glukoza v krvi na splošno visoka, bo tudi relativni delež HbA_{1c} visok. Če je krvna glukoza nizka, bo nizek tudi relativni delež HbA_{1c}. Rdeče krvničke živijo 2–3 mesece in preden je vzpostavljen nov krog, lahko izmerimo HbA_{1c} (17).

Biokemične študije dokazujejo, da nastaja HbA_{1c}, počasi in kontinuirano v eritrocitih med njihovo življenjsko dobo, ki znaša približno 120 dni. HbA_{1c} je ovrednotena kot povprečna koncentracija glukoze v zadnjih 120 dnevih, kar pomeni, da koncentracija glukoze v zadnjih 30 dnevih bistveno bolj prispeva k vrednosti HbA_{1c} kot pa h koncentraciji glukoze v preteklih 90–120 dnevih. To pojasnjuje, zakaj se pri velikih spremembah v koncentraciji glukoze vrednost HbA_{1c} relativno hitro zviša oziroma zniža. Ker so v krvnem obtoku stalno eritrociti različnih starosti, lahko z analizo glikohemoglobina ocenimo povprečno glikemijo dva do tri meseca pred preiskavo. Teoretični modeli in klinične študije kažejo na to, da ima pacient pri stalnemu spremeljanju 50 % oblikovanih HbA_{1c} mesec pred vzorčenjem, 25 % v mesecu pred tem, preostalih 25 % pa v 2–3 mesecih (10,18,25).

1.5.2 Standardizacija in namen študij

Proizvajalci opreme lahko pridobijo NGSP certifikate, če so njihovi instrumenti kalibrirani z rezultati, ki so pridobljeni s strani NGSP-ja. IFCC je vzpostavil sistem referenčne metode za kalibracijo, ki služi za standardizacijo meritve HbA_{1c} vsem laboratorijem. Kemična osnova zanjo je sintetični standard glikiranega in neglikiranega hemoglobina. Ta referenčna metoda meri samo komponento HbA_{1c}, drugih komponent ni možno zaznati. Normalna vrednost HbA_{1c} se tako zmanjša, nižja je za 2 % od dosedanjih poročanj vrednosti HbA_{1c}. Prehod na nižje odstotke bi brez dvoma povzročil zmedo, kar bi lahko pripeljalo do poslabšanja urejenosti glikemije.

Konsenz se je zato opredelil, da je treba izražati koncentracijo HbA_{1c} na dva načina:

1. V IFCC oziroma SI enoti, izraženi v mmol A_{1c}/ mmol hemoglobina.
2. Preračunano po IFCC-NGSP enačbi v NGSP oziroma DCCT odstotek, ki ga uporabljam v klinični praksi kot merilo za urejenost glikemije.

Kronična glikemija se izraža kot odstotek glikiranega hemoglobina, medtem ko se za dnevno spremeljanje koncentracije glukoze uporabljajo enote mg/dl ali mmol/L. Ta razlika je bila vedno problematična. Če bi lahko rezultate kronične glikemije in dolgoročnih zapletov uporabliali v istih enotah kot povprečno koncentracijo glukoze, bi se ta zmeda lahko odpravila.

Študija ADAG je odkrila preprosto matematično formulo, ki lahko prevede vrednosti HbA_{1c} v povprečno koncentracijo glukoze in ugotovila, da se lahko HbA_{1c} izraža in poroča v povprečno koncentracijo glukoze z enakimi enotami, kot se uporablja pri samokontroli. Rezultat omogoča popolno oceno za dnevno glikemijo in določa dovolj močan odnos med HbA_{1c} in povprečno koncentracijo glukoze ter utemeljuje neposredni prevod iz HbA_{1c}, kar omogoča lažje razumevanje vrednosti.

Raziskovalci so za merjenje povprečne koncentracije glukoze uporabljali kombinacijo kontinuiranega merjenja glukoze in pogostega merjenja glukoze v krvi (sedemkrat na dan). Povprečna koncentracija glukoze je bila izračunana z združitvijo prilagojenih rezultatov z najmanj dvodnevnim neprekinjenim merjenjem glukoze in pri sedmih točkah kapilarne glukoze (vsaj trikrat na teden).

Povezavo med HbA_{1c} in povprečno koncentracijo glukoze so določili z linearno regresijo $AG_{\text{mmol/L}} = 1,59 \times HbA_{1c} - 2,59$, ki omogoča izračun povprečne koncentracije glukoze iz HbA_{1c} (14,16,26).



Slika 14: Spremljanje sladkorne bolezni (samokontrola)

2. NAMEN DELA

Parameter, ki kaže na urejenost sladkorne bolezni, je glikirani hemoglobin (beljakovina v krvi, na katero se veže sladkor), iz česar izračunamo povprečno vrednost glukoze v krvi v obdobju od osem do deset tednov. Ta pokazatelj napoveduje tveganje za zaplete, ki jih sladkorna bolezen dolgoročno povzroča.

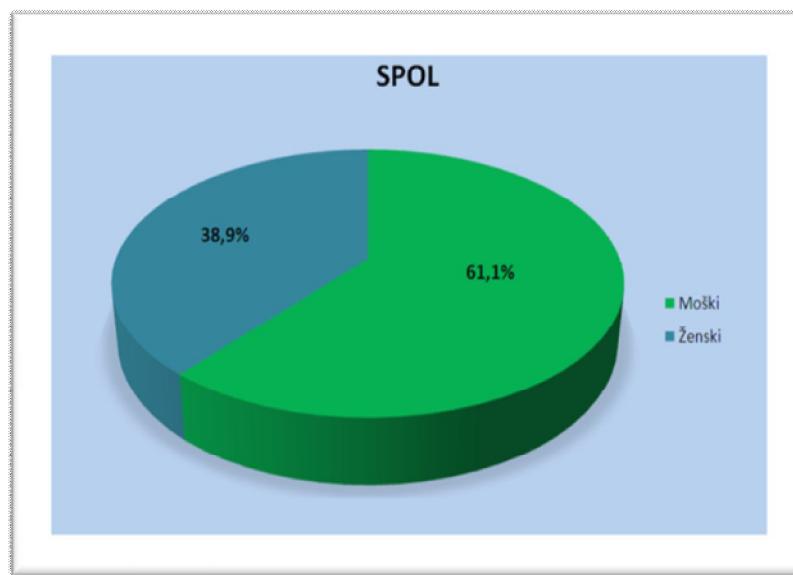
Cilj te diplomske naloge bo raziskati odnos med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze naših preiskovancev. S preprosto matematično formulo želimo ugotoviti, ali obstaja korelacija med omenjenima parametromi oziroma ali rezultati podpirajo hipotezo, in sicer da obstaja močno linearno razmerje med njima. V ta namen bomo izbrali skupino preiskovancev iz Kliničnega centra v Ljubljani, kjer bomo pridobili podatke za vrednosti HbA_{1c} in koncentracije glukoze na tešče. Pri urejanju in grafični predstavitev rezultatov si bomo pomagali s programom Excel.

- Iz zbranih podatkov bomo izračunali povprečno koncentracijo glukoze po formuli $AG_{\text{mmol/L}} = 1,59 \times HbA_{1c} - 2,59$.
- Primerjali bomo korelacijo med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče pri vseh preiskovancih, pri ženski populaciji in moški populaciji.
- Grafično bomo prikazali urejenost sladkorne bolezni in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče glede na referenčne vrednosti.
- Grafično bomo prikazali urejenost sladkorne bolezni glede na vrednost HbA_{1c} v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 OPIS SKUPINE PACIENTOV

Od januarja do marca letošnjega leta smo zbrali 542 preiskovancev, od tega 211 (38,9 %) žensk in 331 (61,1 %) moških, katerim smo določali koncentracijo glukoze v krvi na tešče in relativni delež HbA_{1c}. Meritve so bile izvedene pred pričetkom zdravljenja, kjer so podatki zajemali različne oddelke Kliničnega centra v Ljubljani. Največ zastopanih je bilo moških preiskovancev. Najmlajši preiskovanec je bil star 10 let, najstarejši pa 94 let. Povprečna starost udeležencev je bila 65 let.



Slika 15: Prikaz števila preiskovancev glede na spol

3.2 METODA ZA DOLOČANJE HbA_{1c}

3.2.1 Pomen določanja HbA_{1c}

Določanje HbA_{1c} v krvi je smiselno pri odkrivanju sladkorne bolezni ter spremljanju učinkovitosti terapije in urejenosti diabetikov (19).

3.2.2 Aparat in metoda za določanje HbA_{1c}

Z uporabo avtomatiziranega sistema Dimension® Xpand določimo relativni odstotek HbA_{1c} v vzorcih polne krvi z inhibicijsko imunoturbidimetrično metodo (TINIA). Analiza se izvaja iz hemolizata venske ali kapilarne krvi, vzete z EDTA-jem ali heparinom (10,19).

3.2.3 Inhibicijska turbidimetrična metoda

Princip:

Molekule HbA_{1c} v vzorcu reagirajo s specifičnimi monoklonalnimi HbA_{1c} protitelesi v prvem reagentu. Na specifične HbA_{1c}-epitope molekul HbA_{1c} se vežejo protitelesa in tvori se topen imunski kompleks. Polihapteni, dekstranski nosilci, v drugem reagentu, imajo številna vezavna mesta za protitelesa (HbA_{1c}-specifične epitope). Vezava prostih protiteles na polihaptenske produkte povzroči agregacijo, ki jo merimo kot naraščajočo motnost pri 340 nm. Vsebnost HbA_{1c} določimo preko nelinearne kalibracijske krivulje ob uporabi petih kalibracijskih točk. Vrednosti HbA_{1c} podajamo kot odstotek celotnega hemoglobina, ki ga določimo istočasno z aparatom. Hemoglobin določamo fotometrično. Po dodatku hemoliznega reagenta se tvori kromofor, specifičen za hemoglobin. Produkt s karakterističnim absorbcijskim spektrom merimo bikromatsko pri 660/570 nm.

Prednost imunoturbidimetrične metode je v tem, da jo je možno uporabljati tudi na drugih selektivnih avtomatskih analizatorjih, kjer določamo tudi druge parametre za kontrolo sladkorne bolezni (glukozo, fruktozamin, trigliceride, holesterol, albumine v urinu...) (10).

3.2.4 Oprema in instrumenti

- Dimension® Xpand,
- ustrezne pipete,
- vzorčne čašice (19).



Slika 16: Dimension Xpand

3.2.5 Stabilnost vzorca

HbA_{1c} je stabilen 3 dni pri 15–25 °C, 7 dni pri 2–8 °C in 6 mesecev pri -20 °C.

3.2.6 Reagenti, kalibratorji in kontrole

- HbA_{1c} flex® reagent cartridge (Kat.št. DF105), Siemens
- Dade® Diabetes control, liquid assayed diabetes control (Kat.št. B5301), Siemens
- HbA_{1c} calibrator (Kat.št. DF105), Siemens

Reagenti in kontrole so tekoči in pripravljeni za uporabo, kalibratorje pa je potrebno pred kalibracijo raztopiti. Kalibratorji level 2, 3, 4 in 5 se uporabijo za kalibracijo HbA_{1c}. Isti vzorec kalibratorja level 3 in 4 pa sistem samodejno uporabi za izvedbo kalibracije hemoglobina (19).

3.2.7 Kalibracija

Kalibracija se izvrši z referentnimi kalibratorji za vsako novo serijsko številko (lot) reagenta oziroma vsakih 30 dni za isto serijsko številko reagenta v skladu z navodili proizvajalca. Kalibratorje se razredči z destilirano vodo. Kalibrator level 1 ni prisoten v HbA_{1c} kitu, zato namesto njega uporabimo 300–500 µL 0,9 % fiziološke raztopine (19).

3.2.8 Postopek

HbA_{1c} določamo iz vzorčne čašice in ne iz primarne epruvete. Pred pipetiranjem kri rahlo desetkrat premešamo. Vzorčenje, dodajanje reagentov, mešanje, določanje in izpisovanje rezultatov izvrši aparat samodejno.

3.2.9 Validacija in zagotavljanje kakovosti

Kakovost predanalitske, analitske in postanalitske faze postopka je zagotovljena z ustreznimi navodili. Zagotavljanje kakovosti metode določanja HbA_{1c} se dokumentira in arhivira. Tehnik obvesti odgovornega vodjo skupine ali vodjo laboratorija v primeru sprememb in težav, ki jih ne more odpraviti sam in odstopanj od postavljenih kriterijev kakovosti.

3.2.10 Orientacijske referenčne vrednosti

Rezultati so izraženi v odstotkih HbA_{1c} na eno decimalno enoto glede na celotni hemoglobin. Mejne vrednosti so 4,4 – 6,5 % (19).

3.3 POMEN DOLOČANJA GLUKOZE V KRVI

Glukoza je najpomembnejša spojina ogljikovih hidratov in eden najpomembnejših virov energije. Prisotna je v vseh tkivih in vseh celicah. Za vzdrževanje stabilnega nivoja glukoze skrbi zelo precizен regulatorni mehanizem, pri katerem igra pomembno vlogo hormon inzulin. Določanje glukoze uporabljamо v diagnostiki sladkorne bolezni in motenj metabolizma ogljikovih hidratov. Povišane koncentracije glukoze opazimo pri sladkorni bolezni, raznih hormonskih motnjah, kroničnih obolenjih ledvic, stresu... Znižane vrednosti pa najdemo pri raznih hormonskih motnjah, prekomernem vnosu alkohola, težkem obolenju jeter (20).

3.3.1 Priprava vzorca

Kri za določanje koncentracije glukoze se je odvzela zjutraj na tešče. V polni krvi se koncentracija glukoze zmanjšuje zaradi delovanja glikolize. Vzorec krvi moramo analizirati čim prej, saj se vsako uro koncentracija glukoze zmanjša za 5–7 % (0,5 mmol/L) zaradi delovanja glikolitičnih encimov iz eritrocitov, levkocitov in bakterij.

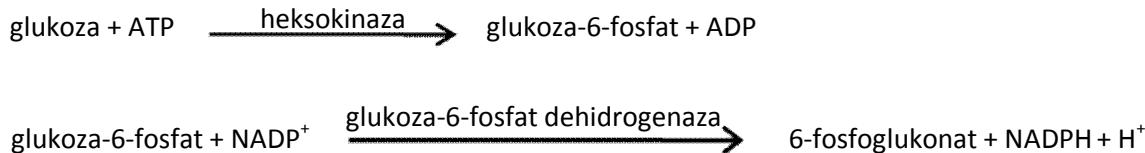
Glikolizo lahko preprečimo na več načinov:

1. Z odvajanjem plazme neposredno po odvzemu krvi. Vensko kri centrifugiramo najkasneje 30 minut po odvzemu. Plazmo takoj prenesemo v drugo epruveto, tako je glukoza stabilna 24 ur na 4 °C, če pa so epruvete sterilne, je stabilnost glukoze znatno daljša (72 ur na 4 °C).
2. Glikolizo lahko zmanjšamo z inhibicijo glikolitičnih enolaz z natrijevim fluoridom (2,5 mg/mL krvi) ali litijevim jodoacetatom (0,5 mg/mL krvi).
3. Z odvzemom kapilarne krvi neposredno v deproteinizirajoči medij v takem vzorcu lahko glukozo določamo takoj, čez nekaj ur ali pa naslednji dan.

Koncentracija glukoze v heparinizirani plazmi je za 5 % manjša kot v serumu zaradi pomika tekočine iz eritrocitov v plazmo zaradi vpliva antikoagulantov (8).

3.4 METODA S HEKSOKINAZO

Glukoza se fosforilizira v prisotnosti ATP in heksokinaze v glukozo-6-fosfat, slednji se v prisotnosti glukoze-6-fosfat dehidrogenaze in NADP⁺ oksidira v 6-fosfoglukonat. Merimo povečanje koncentracije NADPH z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 340/410 nm.

Reakcija:

V prvi reakciji lahko poleg glukoze reagirajo in se fosforilirajo tudi druge heksoze.

V drugi reakciji glukoza-6-fosfat dehidrogenaza oksidira samo glukozo-6-fosfat, medtem ko na fosforne estre fruktoze in manoze ne deluje.

Metoda s heksokinazo je referenčna in specifična za glukozo, vendar ima poleg tega še druge prednosti – je občutljiva, točna, hitra in zajema široko območje koncentracij od zelo majhnih do velikih. Prav tako ima prednost pred metodo z glukozo-oksidazo, saj urati, askorbinska kislina in druge reducirajoče spojine ne vplivajo na rezultat. Vzorec za določanje glukoze ne sme biti hemoliziran, saj motijo encimi in fosfatni estri iz eritrocitov (8).

Pri tej metodi so lahko interference:

- ikterični vzorci (>428 μmol/L),
- hemolitični vzorci (>5,0 g/L),
- lipemični vzorci (>5,7 mmol/L),
- zdravila.

Vzorec: Serum, plazma (Li-heparin).

Stabilnost vzorca: 8 ur pri 15–25 °C, 72 ur pri 2–8 °C (20).

3.4.1 Oprema in instrumenti



Slika 17: Advia 1800

3.4.2 Reagenti, kalibratorji in kontrole

Reagent, pribor	Kat. št.	Proizvajalec
Glucose hexokinase II	04903429	Siemens
Bayer Chemistry Calibrator	09784096	Siemens
Lypho. Assyed Chemistry L1	C-310-5	Bio Rad
Lypho. Assyed Chemistry L2	C-315-5	Bio Rad

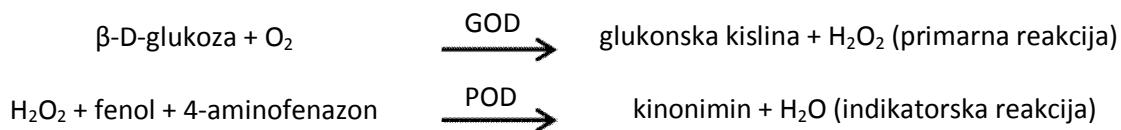
3.4.3 Podajanje rezultatov

Linearno območje: Advia 1800: 0 – 38,9 mmol/L (20).

3.5 METODA Z GLUKOZA-OKSIDAZO

Aldehidna skupina glukoze se pod vplivom encima glukoza-oksidaza (GOD) in kisika iz zraka oksidira v glukonsko kislino. Pri tem nastaja vodikov peroksid, ki s pomočjo encima peroksidaza (POD) povzroči kondenzacijo fenola s 4-aminofenazonom (PAP). Pri tem nastaja rdeče obarvan kinonimin, katerega absorbanco merimo kolorimetrično pri 540 nm (20, 21).

Reakcija:



Reakcija oksidacije glukoze je specifična za β -D-glukozo, katere je v krvi 64 %, preostalih 36 % je α -D-glukoze. Zato se v reakcijsko zmes doda mutarotaza, ki pospeši prehajanje med α in β obliko. V indikatorski reakciji se meri nastali vodikov peroksid, ki v prisotnosti peroksidaze (POD) oksidira kromogen (akceptor vodika), ki prehaja v obarvano spojino.

V metodi z glukozo-oksidazo je primarna reakcija oksidacije glukoze specifična, medtem ko v indikatorski reakciji, v kateri je vodikov peroksid, reakcija ni specifična, saj interferirajo askorbinska kislina, urati, homogentizinska kislina, adrenalin, hidrokinon in bilirubin, saj se oksidirajo namesto kromogena in prihaja do nizkih rezultatov. Razni oksidanti, npr. hipoklorit, lahko oksidirajo kromogen in so vzrok povišanim rezultatom.

Interference:

- hemoliza ($>2,5$ g/L),
- lipemija, proteini (<50 g/L, znižanje; >100 g/L, zvišanje).

Vzorec: Serum, plazma (heparin, EDTA, NaF/K-oksalat).

Stabilnost vzorca: Do 24 ur pri $18\text{--}28$ °C, 7 dni pri $2\text{--}8$ °C in do 1 leta -18 °C (8,20).

3.5.1 Podajanje rezultatov

Linearno območje: Vitros 250: 1,11 – 34,69 mmol/L (20).

3.5.2 Oprema in instrumenti



Slika 18: Vitros 250

3.5.3 Reagenti, kalibratorji in kontrole

Reagent, pribor	Kat. št.	Proizvajalec
Glukoza ploščice	170-7801	Vitros
Kalibrator kit 1	188-2208	Vitros
Performance Verifier I	806-7324	Vitros
Performance Verifier II	823-1474	Vitros

3.5.4 Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle

Serum, plazma: 3,6 – 6,1 mmol/L.

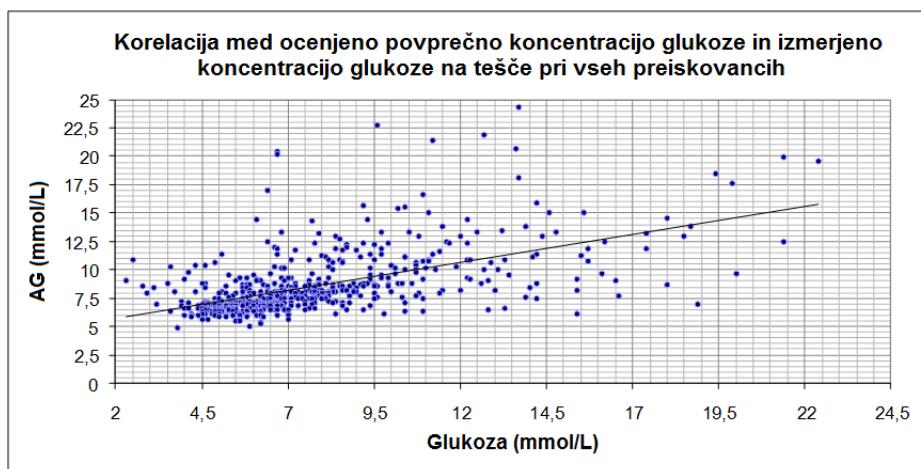
Kapilarna kri: 2,8 – 5,6 mmol/L.

Likvor: 2,5 – 3,9 mmol/L (8).

4. REZULTATI

4.1 KORELACIJA MED OCENJENO POVPREČNO KONCENTRACIJO GLUKOZE IN IZMERJENO KONCENTRACIJO GLUKOZE NA TEŠČE

Pri vsakemu pacientu smo sočasno izmerili relativni delež HbA_{1c} in koncentracijo glukoze na tešče, nato smo z uporabo računalniškega programa Excel po formuli ($AG_{\text{mmol/L}} = 1,59 \times HbA_{1c} - 2,59$) izračunali vrednosti povprečne koncentracije glukoze. Paciente smo razdelili glede na spol in zbrane podatke vnesli v diagrame korelacije med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče, kjer smo z linearno regresijsko analizo ugotavljali, ali obstaja zveza med njima. Nato smo podatke še statistično ovrednotili. Rezultati so prikazani na slikah 19, 20 in 21 ter na preglednicah II, III in IV.

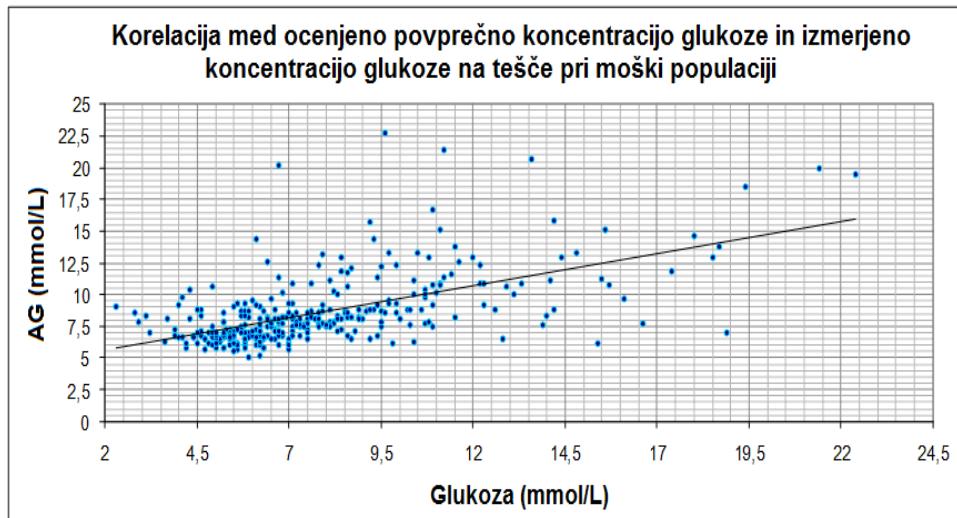


Slika 19: Prikazuje linearno korelacijo med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče pri vseh preiskovancih (sodelovalo je 542 preiskovancev)

Preglednica II: Statistična opredelitev vseh preiskovancev

Število vseh preiskovancev	542
Najstarejši preiskovanec (leta)	94
Najmlajši preiskovanec (leta)	10
Koeficient korelacije (r)	0,57
Povprečna starost preiskovancev (leta)	65
Povprečna vrednost HbA _{1c} (%)	7,0
Povprečna koncentracija glukoze na tešče (mmol/L)	7,8
Povprečna koncentracija AG (mmol/L)	8,6

4.2 KORELACIJA MED OCENJENO POVPREČNO KONCENTRACIJO GLUKOZE IN IZMERJENO KONCENTRACIJO GLUKOZE NA TEŠČE PRI MOŠKI POPULACIJI

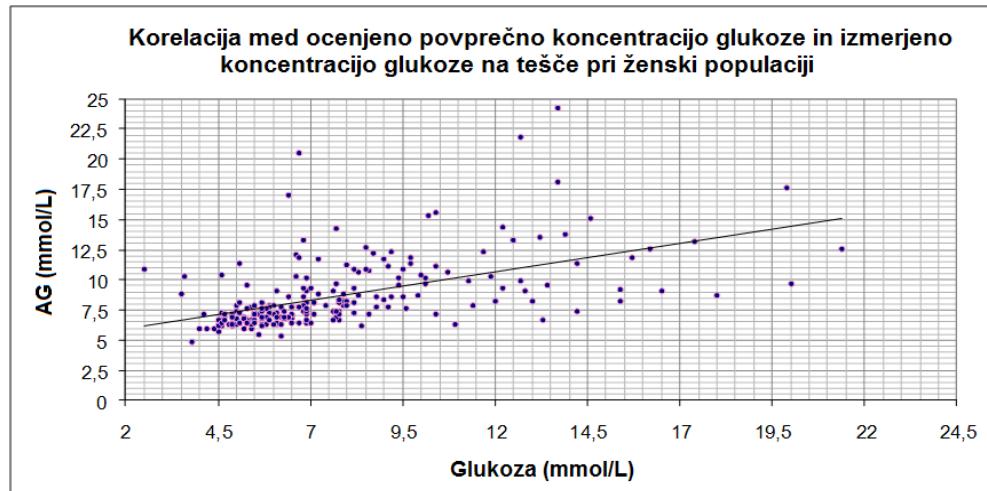


Slika 20: Prikazuje linearno korelacijo med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče pri moški populaciji (sodelovalo je 331 moških)

Preglednica III: Statistična opredelitev moških preiskovancev

Število vseh preiskovancev	331
Najstarejši preiskovanec (leta)	92
Najmlajši preiskovanec (leta)	10
Koeficient korelacije (r)	0,60
Povprečna starost preiskovancev (leta)	65
Povprečna vrednost HbA _{1c} (%)	7,0
Povprečna koncentracija glukoze na tešče (mmol/L)	7,8
Povprečna koncentracija AG (mmol/L)	8,6

4.3 KORELACIJA MED OCENJENO POVPREČNO KONCENTRACIJO GLUKOZE IN IZMERJENO KONCENTRACIJO GLUKOZE NA TEŠČE PRI ŽENSKI POPULACIJI



Slika 21: Prikazuje linearno korelacijo med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče pri ženski populaciji (sodelovalo je 211 žensk)

Preglednica IV: Statistična opredelitev preiskovank

Število vseh preiskovank	211
Najstarejša preiskovanka (leta)	94
Najmlajša preiskovanka (leta)	15
Koeficient korelacije (r)	0,54
Povprečna starost preiskovank (leta)	66
Povprečna vrednost HbA _{1c} (%)	7,1
Povprečna koncentracija glukoze na tešče (mmol/L)	7,8
Povprečna koncentracija AG (mmol/L)	8,7

Iz diagramov vidimo, da je:

- ❖ pri celotni populaciji **linearno razmerje** med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče z zmernim koeficientom korelacije ($r = 0,57$);
- ❖ pri moški populaciji **linearno razmerje** med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče z zmernim koeficientom korelacije ($r = 0,60$);

- ❖ pri ženski populaciji **linearno razmerje** med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče z nižjim koeficientom korelacije ($r = 0.54$) kot pri drugih dveh.

Na podlagi teh izsledkov lahko potrdimo našo hipotezo, da obstaja linearne razmerje med ocenjeno povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče.

Korelacija med obema parametromi ni bila močna, temveč zmerna.

S povprečno vrednostjo smo želeli ugotoviti, ali je imela populacija, ki smo jo opazovali normalno, zadovoljivo ali slabo urejeno slatkorno bolezen oziroma ali je imela populacija na dan odvzema zvišano, znižano ali normalno koncentracijo glukoze.

- **Povprečna vrednost HbA_{1c}** je bila pri celotni in moški populaciji 7,0 %, pri ženski pa 7,1 %.
- **Povprečna koncentracija glukoze na tešče** je bila pri celotni, moški in ženski populaciji 7,8 mmol/L.
- **Povprečna koncentracija AG** je bila pri celotni in moški populaciji 8,6 mmol/L pri ženski pa 8,7 mmol/L.

Iz teh podatkov smo ugotovili, da med celotno in moško populacijo ni bistvenega povprečnega odstopanja, le pri ženski populaciji so razlike minimalne. Glede na povprečno vrednost HbA_{1c} je pri celotni, moški in ženski populaciji slatkorna bolezen zadovoljivo urejena. Povprečna koncentracija glukoze na tešče pa je glede na razmejitvene vrednosti zvišana, kar pomeni, da je opazovana populacija imela na dan odvzema slab nadzor nad koncentracijo glukoze. Izračunani parameter AG (povprečna koncentracija glukoze) je v linearinem razmerju z HbA_{1c}, zato je povprečna vrednost AG pri celotni, moški in ženski populaciji zadovoljivo urejena slatkorna bolezen.

4.4 UREJENOST SLADKORNE BOLEZNI IN KONCENTRACIJA GLUKOZE NA TEŠČE

Dobljene vrednosti za HbA_{1c} in koncentracijo glukoze smo razvrstili glede na razmejitvene vrednosti, kot ga prikazujeta preglednici V in VI.

Na podlagi prvega kriterija smo preiskovance razdelili v tri skupine, in sicer:

- ❖ preiskovanci z **dobro urejeno** slatkorno bolezen,
- ❖ preiskovanci z **zadovoljivo urejeno** slatkorno bolezen,
- ❖ preiskovanci s **slabo urejeno** slatkorno bolezen.

Grafično predstavitev urejenosti slatkorne bolezni predstavlja Slika 22.

Preglednica V: Kriterij za opredelitev urejenosti slatkorne bolezni glede na HbA_{1c}

RELATIVNI DELEŽ HbA _{1c} (%)
< 6,5 (dobro urejena)
= 6,5 - 7,5 (zadovoljivo urejena)
> 7,5 (slabo urejena)



Slika 22: Grafikon ponazarja delež preiskovancev, ki imajo dobro/zadovoljivo/slabo urejeno slatkorno bolezen glede na HbA_{1c}

Drugi kriterij pa predstavlja preiskovance, ki imajo koncentracijo glukoze na tešče:

- ❖ **znižano** (hipoglikemija),
- ❖ **normalno** (normoglikemija),
- ❖ **zvišano** (hiperglikemija).

Grafično predstavitev vrednosti glukoze predstavlja Slika 23.

Preglednica VI: Kriterij za opredelitev vrednosti koncentracije glukoze

KONCENTRACIJA GLUKOZE (mmol/L)
< 3,6 (hipoglikemija)
= 3,6 - 6,1 (normoglikemija)
> 6,1 (hiperglikemija)



Slika 23: Grafikon ponazarja delež preiskovancev z različnimi vrednostmi glukoze

Ugotovili smo, da je največji delež preiskovancev imel **dobro urejeno** slatkorno bolezen, nato sledijo preiskovanci z zadovoljivo urejeno in zatem tisti s slabo urejeno slatkorno bolezniyo.

Največji delež preiskovancev pa je na dan odvzema imel **zvišano koncentracijo glukoze**, nato sledijo preiskovanci z normalno koncentracijo glukoze, najmanjši delež preiskovancev pa je imel znižano koncentracijo glukoze.

4.5 UREJENOST HbA_{1c} V PRIMERJAVI Z VREDNOSTMI GLUKOZE

V nadaljevanju smo ovrednotili oba parametra hkrati, in sicer urejenost sladkorne bolezni glede na vrednost HbA_{1c} v primerjavi s koncentracijo glukoze na tešče. Zanimalo nas je, kako se oba parametra obneseta ob sočasni interpretaciji. Pri tem smo upoštevali, da je HbA_{1c} pokazatelj dolgoročne urejenosti sladkorne bolezni, medtem ko je koncentracija glukoze kazalec za kratkoročno urejenost sladkorne bolezni (zadnji dve uri).

Izračunali smo relativne deleže preiskovancev tistih, ki imajo:

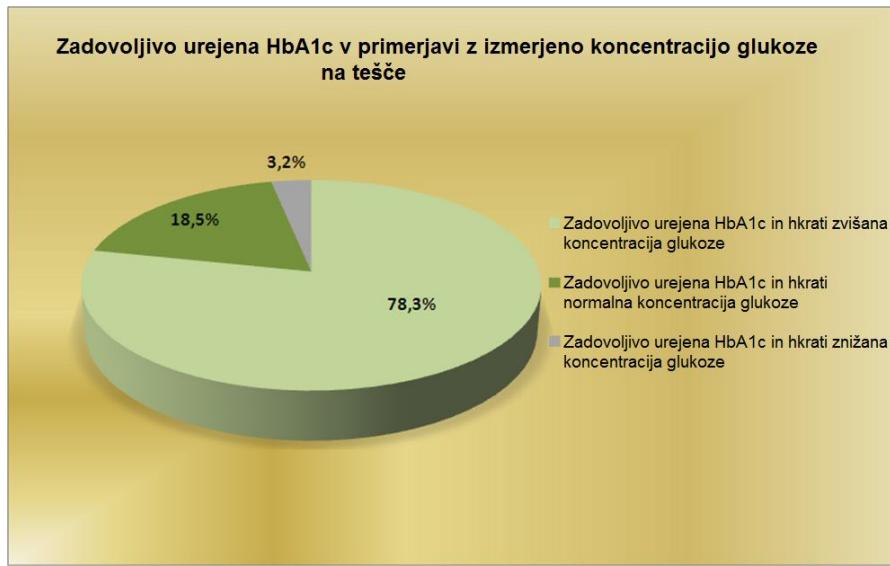
- ❖ dobro urejeno sladkorno bolezen in hkrati zvišano/normalno/znižano koncentracijo glukoze na tešče;
- ❖ zadovoljivo urejeno sladkorno bolezen in hkrati zvišano/normalno/znižano koncentracijo glukoze na tešče;
- ❖ slabo urejeno sladkorno bolezen in hkrati zvišano/normalno/znižano koncentracijo glukoze na tešče.

Rezultati so prikazani na slikah 24, 25 in 26.



Slika 24: Dobro urejena HbA_{1c} v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče

Največji delež pacientov je imel **dobro urejeno HbA_{1c} in hkrati normalno koncentracijo glukoze na tešče**, nato sledijo pacienti z dobro urejeno HbA_{1c} in hkrati zvišano koncentracijo glukoze na tešče ter nazadnje pacienti z dobro urejeno HbA_{1c} in hkrati znižano koncentracijo glukoze na tešče.



Slika 25: Zadovoljivo urejena HbA_{1c} v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče

Iz grafičnega prikaza vidimo, da je imel največji delež pacientov **zadovoljivo urejeno HbA_{1c} in hkrati zvišano koncentracijo glukoze na tešče**, nato sledijo pacienti z zadovoljivo urejeno HbA_{1c} in hkrati normalno koncentracijo glukoze na tešče ter nazadnje pacienti z zadovoljivo urejeno HbA_{1c} in hkrati znižano koncentracijo glukoze na tešče.



Slika 26: Slabo urejena HbA_{1c} v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče

Največji delež pacientov je imel **slabo urejeno HbA_{1c} in hkrati zvišano koncentracijo glukoze na tešče**, nato sledijo pacienti s slabo urejeno HbA_{1c} in hkrati normalno koncentracijo glukoze na tešče in nazadnje pacienti s slabo urejeno HbA_{1c} in hkrati znižano koncentracijo glukoze na tešče.

5. RAZPRAVA

Določanje glikohemoglobina v kliničnih laboratorijih omogoča boljši nadzor glikemije in s tem večjo stabilnost bolnikovega stanja. Primerjali smo vzorce 542-ih preiskovancev obeh spolov v starosti od 10 do 94 let, katerim smo sočasno določili odstotek HbA_{1c} in vrednost koncentracije glukoze na tešče.

Vse osebe smo obdelali v laboratorijih po enotnih kriterijih, in sicer:

- vse so bile tešče,
- odvzem krvi je potekal med 7.00 in 9.00 zjutraj,
- pri odvzemu venozne krvi so osebe sedele.

Iz vzorcih polne krvi smo določili HbA_{1c} z uporabo avtomatiziranega sistema Dimension® Xpand z inhibicijsko turbidimetrično metodo (TINIA). Glukozo v krvi pa smo določili z uporabo encima heksokinaze z analizatorjem Advia 1800 in uporabe GOD-PAP metode z analizatorjem Vitros 250. Obe metodi sta avtomatizirani. Pri imunoturbidimetrični metodi poteka analiza iz hemolizata, ki ga pripravimo pred analizo iz venske ali kapilarne krvi.

Z uporabo regresijske enačbe ($AG_{mmol/L} = 1,59 \times HbA_{1c} - 2,59$), ki je bila priporočena s strani ADA, smo izračunali vrednosti povprečne koncentracije glukoze iz HbA_{1c} ter spremljali medsebojni odnos, ki se kaže v linearni premici. Formula je bila izračunana z linearno regresijsko analizo, to je matematični način, s katerim napovedujemo točke, ki temeljijo na znanih točkah. Podatki za izračun linearne regresijske premice so bili pridobljeni iz študije z analizo rezultatov 507-ih preiskovancev različnih ras in pripadnosti. Korelacija med HbA_{1c} in izračunano povprečno koncentracijo glukoze ni popolna ($r = 1,0$), temveč je le $r = 0,84$, kar pomeni, da ne moremo natančno napovedati ali oceniti povprečne koncentracije glukoze iz HbA_{1c}, vendar pa nam daje približno oceno o urejenosti koncentracije glukoze.

Z uporabo računalniškega programa Excel smo predstavili podatke v obliki grafikona, kjer smo na x-os vstavljeni izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče (mmol/L) vseh preiskovancev/moških in žensk; na y-os pa smo vstavljeni izračunano povprečno koncentracijo glukoze iz HbA_{1c} (mmol/L), ki smo jo predhodno izračunali po zgoraj omenjeni formuli.

Ugotovili smo, da se trendna črta prilega rezultatom, kar potrdi našo hipotezo o medsebojni korelaciji med omenjenima spremenljivkama, vendar pa korelacija med njima ni bila močna, temveč zmerna. Poleg tega smo opazili, da med spoloma ni bistvenih razlik, saj je trendna črta pri obeh linearja in se prilega s korelacijo 0,60 (moški) in 0,54 (ženske). Vendar pa določeni biološki vplivi, kot so starost, letni čas, navade, lahko koncentracijo glukoze v serumu/plazmi povišajo ali znižajo. Enako lahko na spremembe vplivajo travme, stresi, fizični naporji, dnevni ritem, stradanje, šok in razna zdravila, zato smo pri teh parametrih, ki vplivajo na koncentracijo glukoze, pazljivi in upoštevamo navodila in opozorila, ki se pojavljajo pri vrednotenju tega metabolita.

S povprečno vrednostjo HbA_{1c} smo želeli ugotoviti, ali je imela populacija, ki smo jo opazovali, normalno, zadovoljivo ali slabo urejeno sladkorno bolezen oziroma ali je imela populacija na dan odvzema zvišano, znižano ali normalno koncentracijo glukoze. Ugotovili smo, da je bil povprečni relativni delež HbA_{1c} pri celotni (7,0 %), moški (7,0 %) in ženski populaciji (7,1 %) glede na razmejitvene vrednosti v območju za zadovoljivo urejeno sladkorno bolezen. Preiskovanci so svojo sladkorno bolezen 2–3 mesece pred preiskavo dobro regulirali. Vendar je podatek o povprečni izmerjeni koncentraciji glukoze na tešče zaskrbljujoč, saj je vrednost (7,8 mmol/L) pri celotni/moški in ženski populaciji bistveno višja v primerjavi z referenčnim območjem. Iz tega sledi, da so imeli preiskovanci dve uri pred preiskavo slabo regulirano koncentracijo glukoze.

Med seboj smo primerjali, kako urejenost sladkorne bolezni sovpada z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče. Merjenje glukoze na tešče poda lečečemu zdravniku informacijo o stanju glukoze za kratek čas (zadnji dve uri) in ne sme predstavljati dejanskega stanja glukoze, medtem ko je raven glikiranega hemoglobina neposredno povezana s povprečno koncentracijo glukoze. Z oceno izračunane povprečne koncentracije glukoze dobimo podatek o uspešnosti terapije ter diete pri sladkornih bolnikih v času 2–3 mesece pred preiskavo. Vendar pa na podlagi vrednosti glikiranega hemoglobina in s tem urejenosti sladkorne bolezni ne moremo ugotoviti poslabšanja metaboličnega stanja v območju treh tednov, ker se vrednosti spreminjajo počasi. Tudi pri spremembji terapije nam glikirani hemoglobin uspešnost ali neuspešnost le-te pokaže prepozno. Zato je potrebno dodatno določanje fruktozamina, saj nam daje podatek o stanju glukoze v krvi pri

sladkornih bolnikih v preteklih 2–3 tednih, kar je koristno in potrebno dopolnilo določanja glikiranega hemoglobina.

Z grafikonom (Slika 22) smo ponazorili urejenost sladkorne bolezni, kjer smo pri opazovani populaciji izračunali relativne deleže HbA_{1c} tistih, ki imajo dobro, zadovoljivo in slabo urejeno sladkorno bolezen. Dobro urejeno sladkorno bolezen je imelo 47,4 % celotne populacije, zadovoljivo urejeno 29,0 % in **slabo urejeno 23,6 % celotne populacije**. Zaskrbljujoč je podatek, da je imelo 23,6 % celotne populacije zvišan HbA_{1c}, kar je za nas »kritična populacija«, saj so podvrženi raznim komplikacijam, kot so: diabetična retinopatija, nefropatija, nevropatija in makroangiopatija, ki so glavni vzroki obolenosti in smrtnosti pri sladkornih bolnikih. Indikatorji za dobro uravnavano sladkorno bolezen so predvsem osveščenost prebivalstva, dosegljivost inzulina, fizična aktivnost, zdrava prehrana in prepoznavanje znakov hiperglikemij/hipoglikemije, redno spremeljanje koncentracije glukoze (večkrat na dan) in redni zdravniški pregledi.

Z drugim grafikonom (Slika 23) smo ponazorili vrednosti glukoze, kjer smo celotni populaciji izračunali relativne deleže, pri katerih je izmerjena koncentracija glukoze zvišana, normalna ali znižana. Delež preiskovancev, ki je imel **zvišano koncentracijo glukoze (hiperglikemijo), je 64,0 %**, normalno koncentracijo glukoze je imelo 34,7 % preiskovancev (normoglikemijo), znižano koncentracijo glukoze pa 1,3 % celotne populacije (hipoglikemija).

Znano je, da spremljajo sladkorno bolezen številne komplikacije, le-te pa lahko uspešno preprečujemo z dobro regulacijo koncentracije glukoze v krvi. Hiperglikemija lahko povzroči resne težave in je pravzaprav glavni vzrok za kronične zaplete sladkorne bolezni. Spremljajo jo simptomi nenehne žeje in pogostega mokrenja, hujšanja, splošne oslabelosti in tudi motenj zavesti (od zaspanosti do nezavesti). Dolgoročno pa povzroča okvare velikih (makroangiopatija) in majhnih žil (mikroangiopatija) s posledično prizadetostjo delovanja ledvic, močno pospešeno aterosklerozo z mašenjem žil (srčna in možganska kap, gangrena spodnjih okončin) in slabšim vidom. Ti pacienti lahko razvijejo diabetično ketoacidozzo (nastanek ketonov v telesu), to stanje pa ogroža življenje. Vrednosti glukoze v krvi na teče v zadovoljivi regulirani glikemiji znašajo do 6,1 mmol/L, diagnostični kriterij za potrditev sladkorne bolezni pa znaša 6,7 mmol/L.

S pomočjo grafikonov (slike 24, 25 in 26) smo ponazorili urejenost sladkorne bolezni v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče.

Pri **dobro urejeni slatkorni bolezni** je bilo 58,4 % preiskovancev z normalno koncentracijo glukoze; **41,2 % z zvišano koncentracijo glukoze** in 0,4 % z znižano koncentracijo glukoze. Iz teh podatkov lahko sklepamo, da je bil kljub temu, da so imeli pacienti dobro urejeno slatkorno bolezen, visok procent tistih, ki so imeli na dan odvzema hkrati tudi zvišano koncentracijo glukoze. Pričakovali pa smo, da bo visok delež preiskovancev, ki bodo imeli normalno koncentracijo glukoze, v primerjavi z dobro regulirano slatkorno bolezen.

Pri **zadovoljivo urejeni slatkorni bolezni** je bilo **78,3 % preiskovancev z zvišano koncentracijo glukoze**; 18,5 % z normalno koncentracijo glukoze in 3,2 % z znižano koncentracijo glukoze. Tudi tokrat je zelo veliko pacientov, ki so imeli na dan odvzema hkrati tudi zvišano koncentracijo glukoze, kljub temu da so imeli zadovoljivo urejeno slatkorno bolezen.

Pri **slabo urejeni slatkorni bolezni** je bilo **92,2 % preiskovancev z zvišano koncentracijo glukoze**; 7,0 % z normalno koncentracijo glukoze in 0,8 % z znižano koncentracijo glukoze. V tej skupini smo pričakovali visok procent preiskovancev z zvišano koncentracijo glukoze, saj so imeli tudi HbA_{1c} relativno neurejen in s tem tudi slabo urejeno slatkorno bolezen.

Hiperglikemija povzroča kronične zaplete, vendar z njenim znižanjem lahko zmanjšamo tveganje zanje. Pomembno je vzdrževanje glikemije v ciljnem terapevtičnem območju, saj odločilno zmanjša tveganje za dolgoročne zaplete sladkorne bolezni. Spremljanje parametrov urejenosti glikemije je torej nujno tako za oceno tveganja kroničnih zapletov kot tudi za učinek zdravljenja.

6. SKLEP

Pri celotni populaciji je zveza med izračunano povprečno koncentracijo glukoze in izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče linearja z zmernim koeficientom korelacije ($r = 0,57$). Pri moški populaciji je zveza linearja z zmernim koeficientom korelacije ($r = 0,60$). Pri ženski populaciji je zveza linearja z nižjim koeficientom korelacije ($r = 0,54$).

Ponazorili smo urejenost sladkorne bolezni, kjer smo pri opazovani populaciji izračunali relativne deleže HbA_{1c} tistih, ki imajo:

- ❖ dobro urejeno sladkorno bolezen (47,4 % preiskovancev),
- ❖ zadovoljivo urejeno sladkorno bolezen (29,0 % preiskovancev),
- ❖ slabo urejeno sladkorno bolezen (23,6 % preiskovancev).

Z drugim grafikonom smo ponazorili vrednosti glukoze, kjer smo celotni populaciji izračunali relativne deleže, pri katerih je koncentracija glukoze na tešče:

- ❖ zvišana (64,0 % preiskovancev),
- ❖ normalna (34,7 % preiskovancev),
- ❖ znižana (1,3 % preiskovancev).

Nato smo prikazali urejenost sladkorne bolezni v primerjavi z izmerjeno koncentracijo glukoze na tešče.

Dobro urejena sladkorna bolezen in hkrati tudi:

- ❖ zvišana koncentracija glukoze na tešče (41,2 % preiskovancev),
- ❖ normalna koncentracija glukoze na tešče (58,4 % preiskovancev),
- ❖ znižana koncentracija glukoze na tešče (0,4 % preiskovancev).

Zadovoljivo urejena sladkorna bolezen in hkrati tudi:

- ❖ zvišana koncentracija glukoze na tešče (78,3 % preiskovancev),
- ❖ normalna koncentracija glukoze na tešče (18,5 % preiskovancev),
- ❖ znižana koncentracija glukoze na tešče (3,2 % preiskovancev).

Slabo urejena sladkorna bolezen in hkrati tudi:

- ❖ zvišana koncentracija glukoze na tešče (92,2 % preiskovancev),
- ❖ normalna koncentracija glukoze na tešče (7,0 % preiskovancev),
- ❖ znižana koncentracija glukoze na tešče (0,8 % preiskovancev).

LITERATURA

1. Bohnec M, Klavs J, Tomažin Šporar M, Krašovec A, Žargaj B: Sladkorna bolezen: priročnik, samozaložba, Ljubljana, 2006: 38–40; 65; 67–69; 75; 694.
2. Kržišnik C: Etiopatogenetski vidiki sladkorne bolezni, Farmacevtski vestnik 1994; 45: 207; 210–211.
3. Lukač Bajalo J: Novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni, Farmacevtski vestnik 2005: 242–243; 246–247.
4. Kocijančič A, Mrevlje F: Interna medicina, DZS, Ljubljana, 1993: 500; 502–504; 506–508; 529–530; 532.
5. Andoljšek D: Veliki zdravstveni priročnik: za domačo uporabo, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 718.
6. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 395; 399; 406; 414; 443–444.
7. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, histologija in fiziologija, prva izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 137–138.
8. Štraus B: Medicinska biokemija, druga dopolnjena izdaja, Medicinska naklada, Zagreb, 1992: 119–120; 134.
9. Breyer D, Metelko Ž: Racionalna laboratorijska diagnostika šećerne bolesti, Farmacevtski vestnik 1994; 45: 220.
10. Možina B, Zupančič M, Joković Ž, Prezelj M, Lukač-Bajalo J: Glikohemoglobin–validacija in primerjava postopkov, Farmacevtski vestnik 1994; 45: 240–245; 249.
11. Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije: učno gradivo za študente farmacije, Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2008: 307.
12. Hoekstra JB, Rijn van HJ, Erkelens DW, Thijssen JH: C-peptide. Diabetes Care 1982; 5(4): 438.
13. Nitin S: HbA_{1c} and factors other than diabetes mellitus affecting it. Singapore Med J 2010: 616 – 620.
14. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ: Translating the A1C assay into estimated average glucose values. Diabetes Care 2008; 31(8): 1473 – 1478.

15. Sacks DB: Translanting hemoglobin A1c into average blood glucose. Clinical Chemistry 2008; 54: 1756 – 1758.
16. Kahn R, Fonseca V: Translating the A1C Assay. Diabetes care 2008; 31(8): 1704 – 1707.
17. Nograšek S: HbA_{1c} – pomemben krvni test. Diabetes zveza 2006: 1.
18. Kilpatrick ES: Haemoglobin A1c in the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. J Clin Pathol 2008; 61: 977 – 982.
19. SOP Določanje hemoglobina A1c, Interno navodilo za delo (dokumentacija se nahaja na delovnem mestu).
20. SOP Določanje koncentracije glukoze, Interno navodilo za delo (dokumentacija se nahaja na delovnem mestu).
21. Marc J: Navodila in dnevniki za vaje iz klinične biokemije I, tretja dopolnjena izdaja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 77.
22. <http://www.nasa-lekarna.si/clanki/clanek/grenke-resnice-o-sladkorni-bolezni/> (06.03.2011)
23. http://www.endolabor.kbsm.hr/o_analizama.htm#CPEP (21.03.2011)
24. <http://diabetes.webmd.com/c-peptide> (21.03.2011)
25. <http://www.ngsp.org/A1ceAG.asp> (05.03.2011)
26. http://www.diabetesselfmanagement.com/Blog/Tara-Dairman/whats_your_eag_youll_know_soon/ (16.03.2011)

PRILOGA

Zaporedna št. pacienta	Spol	Starost (let)	K-HbA _{1c} (%)	S-Glukoza (mmol/L)	AG (mmol/L)
1.	M	26	7,2	4,6	8,9
2.	M	78	7,0	9,9	8,5
3.	M	61	6,6	8,1	7,9
4.	M	86	7,1	9,5	8,7
5.	M	47	5,4	5,8	6,0
6.	M	77	8,3	4,9	10,6
7.	M	69	6,6	8,2	7,9
8.	M	68	6,7	7,5	8,1
9.	M	36	5,9	6,2	6,8
10.	M	78	7,2	6,6	8,9
11.	M	60	6,8	7,1	8,2
12.	M	57	9,2	8,7	12,0
13.	M	64	6,7	10,0	8,1
14.	M	65	6,0	5,9	7,0
15.	M	72	5,7	7,0	6,5
16.	M	74	8,3	8,6	10,6
17.	M	35	5,3	4,2	5,8
18.	M	80	6,9	8,3	8,4
19.	M	84	6,0	5,8	7,0
20.	M	43	5,8	5,2	6,6
21.	M	58	6,0	6,7	7,0
22.	M	83	5,9	5,4	6,8
23.	M	57	5,8	4,0	6,6
24.	M	71	5,9	5,2	6,8
25.	M	67	6,2	6,6	7,3
26.	M	47	9,9	7,9	13,2
27.	M	80	5,6	6,2	6,3
28.	M	49	5,4	6,7	6,0
29.	M	69	5,9	5,5	6,8
30.	M	83	6,2	5,7	7,3
31.	M	45	13,3	19,4	18,6
32.	M	69	6,1	6,0	7,1
33.	M	62	6,3	7,1	7,4
34.	M	68	6,8	8,7	8,2
35.	M	72	5,5	6,2	6,2
36.	M	69	5,5	9,8	6,2
37.	M	63	9,8	14,4	13,0
38.	M	61	7,0	7,2	8,5
39.	M	69	11,5	9,2	15,7
40.	M	77	5,9	5,3	6,8
41.	M	74	6,0	3,2	7,0
42.	M	87	6,9	3,1	8,4
43.	M	61	5,8	5,9	6,6
44.	M	87	6,4	10,3	7,6

45.	M	61	5,4	5,8	6,0
46.	M	50	6,8	8,6	8,2
47.	M	70	9,8	10,8	13,0
48.	M	64	7,2	8,1	8,9
49.	M	59	6,1	6,6	7,1
50.	M	66	8,7	15,5	11,2
51.	M	55	7,4	7,9	9,2
52.	M	73	10,0	9,7	13,3
53.	M	12	6,7	7,1	8,1
54.	M	70	5,4	6,1	6,0
55.	M	65	6,2	6,1	7,3
56.	M	69	6,2	7,5	7,3
57.	M	63	6,5	7,8	7,7
58.	M	63	5,9	4,4	6,8
59.	M	81	6,7	3,7	8,1
60.	M	66	7,2	9,3	8,9
61.	M	82	6,7	6,6	8,1
62.	M	15	5,4	5,8	6,0
63.	M	82	6,3	6,4	7,4
64.	M	65	6,3	4,9	7,4
65.	M	58	11,1	11,1	15,1
66.	M	60	8,1	8,2	10,3
67.	M	76	5,4	5,4	6,0
68.	M	72	7,4	9,4	9,2
69.	M	81	7,2	12,6	8,9
70.	M	81	15,9	9,6	22,7
71.	M	65	10,3	11,5	13,8
72.	M	36	5,3	5,2	5,8
73.	M	70	6,8	6,4	8,2
74.	M	53	14,6	13,6	20,6
75.	M	72	5,6	5,8	6,3
76.	M	60	5,9	6,4	6,8
77.	M	59	7,7	16,1	9,7
78.	M	49	14,2	21,4	20,0
79.	M	69	7,1	7,6	8,7
80.	M	63	5,9	7,3	6,8
81.	M	75	8,8	6,7	11,4
82.	M	57	6,5	16,6	7,7
83.	M	67	6,5	6,7	7,7
84.	M	71	5,8	6,3	6,6
85.	M	56	8,3	12,9	10,6
86.	M	80	7,9	10,4	10,0
87.	M	88	7,3	6,2	9,0
88.	M	60	9,3	9,5	12,2
89.	M	53	6,0	7,5	7,0
90.	M	46	9,8	18,5	13,0
91.	M	46	7,1	9,1	8,7
92.	M	47	8,5	12,2	10,9
93.	M	63	5,8	5,0	6,6
94.	M	59	5,4	6,2	6,0

95.	M	78	7,2	4,5	8,9
96.	M	71	5,7	6,1	6,5
97.	M	80	7,0	7,8	8,5
98.	M	84	6,3	5,7	7,4
99.	M	67	8,8	9,4	11,4
100.	M	68	7,2	14,2	8,9
101.	M	68	7,1	5,7	8,7
102.	M	80	8,5	7,6	10,9
103.	M	89	6,7	7,7	8,1
104.	M	87	9,1	17,4	11,9
105.	M	48	7,5	9,9	9,3
106.	M	82	6,2	6,2	7,3
107.	M	75	6,5	7,9	7,7
108.	M	67	5,3	5,2	5,8
109.	M	64	6,7	9,0	8,1
110.	M	74	7,0	2,8	8,5
111.	M	54	6,8	7,6	8,2
112.	M	65	6,9	7,1	8,4
113.	M	65	6,2	5,7	7,3
114.	M	69	7,5	7,1	9,3
115.	M	41	9,5	11,6	12,5
116.	M	81	5,7	4,7	6,5
117.	M	77	11,1	15,6	15,1
118.	M	48	5,5	4,8	6,2
119.	M	28	5,5	4,2	6,2
120.	M	70	9,8	12,0	13,0
121.	M	59	6,1	7,1	7,1
122.	M	76	7,2	10,2	8,9
123.	M	86	7,3	2,3	9,0
124.	M	83	5,9	5,3	6,8
125.	M	78	9,1	8,4	11,9
126.	M	53	6,1	6,2	7,1
127.	M	71	8,5	13,3	10,9
128.	M	73	6,5	8,2	7,7
129.	M	68	6,9	14,0	8,4
130.	M	69	5,5	7,0	6,2
131.	M	58	9,4	7,8	12,4
132.	M	63	7,4	4,0	9,2
133.	M	50	10,7	9,3	14,4
134.	M	53	10,0	10,5	13,3
135.	M	64	6,1	8,8	7,1
136.	M	60	6,5	10,7	7,7
137.	M	42	5,3	5,8	5,8
138.	M	63	9,0	8,6	11,7
139.	M	67	5,6	5,1	6,3
140.	M	55	6,9	4,6	8,4
141.	M	83	6,8	8,9	8,2
142.	M	45	8,2	4,3	10,4
143.	M	70	6,1	6,7	7,1
144.	M	55	5,4	5,6	6,0

145.	M	77	5,2	7,0	5,7
146.	M	68	6,6	6,7	7,9
147.	M	54	5,7	6,3	6,5
148.	M	65	6,7	7,3	8,1
149.	M	58	5,6	5,1	6,3
150.	M	66	6,3	9,5	7,4
151.	M	70	5,9	3,9	6,8
152.	M	36	7,5	5,8	9,3
153.	M	54	5,3	6,3	5,8
154.	M	76	7,6	6,0	9,5
155.	M	64	5,9	5,5	6,8
156.	M	82	7,0	7,0	8,5
157.	M	39	6,8	8,7	8,2
158.	M	53	8,0	6,8	10,1
159.	M	67	6,6	5,2	7,9
160.	M	54	6,6	7,2	7,9
161.	M	82	5,9	4,6	6,8
162.	M	55	8,5	7,1	10,9
163.	M	68	6,6	6,5	7,9
164.	M	82	8,4	15,7	10,8
165.	M	63	7,6	9,7	9,5
166.	M	78	6,0	18,9	7,0
167.	M	72	6,0	5,3	7,0
168.	M	61	6,4	8,1	7,6
169.	M	74	6,3	7,3	7,4
170.	M	56	5,3	6,3	5,8
171.	M	35	11,6	14,2	15,9
172.	M	66	6,4	7,4	7,6
173.	M	89	7,1	8,5	8,7
174.	M	73	5,4	4,9	6,0
175.	M	78	6,1	5,5	7,1
176.	M	60	7,8	10,7	9,8
177.	M	64	6,1	4,6	7,1
178.	M	58	5,4	7,0	6,0
179.	M	79	5,7	5,8	6,5
180.	M	70	6,8	6,9	8,2
181.	M	77	6,0	5,2	7,0
182.	M	67	5,6	10,4	6,3
183.	M	55	7,0	9,6	8,5
184.	M	81	5,9	6,0	6,8
185.	M	62	10,0	14,8	13,3
186.	M	75	5,7	4,7	6,5
187.	M	60	7,3	6,2	9,0
188.	M	73	8,6	10,4	11,1
189.	M	83	6,2	5,4	7,3
190.	M	61	12,1	10,9	16,6
191.	M	38	14,3	6,7	20,1
192.	M	85	7,0	5,2	8,5
193.	M	70	8,8	11,2	11,4
194.	M	85	8,6	8,1	11,1

195.	M	58	9,4	9,9	12,4
196.	M	63	5,6	3,6	6,3
197.	M	79	7,7	6,5	9,7
198.	M	56	8,4	10,9	10,8
199.	M	61	6,5	6,5	7,7
200.	M	62	6,3	6,5	7,4
201.	M	56	9,4	12,2	12,4
202.	M	71	6,4	5,8	7,6
203.	M	64	5,6	6,2	6,3
204.	M	66	6,4	6,2	7,6
205.	M	45	5,9	6,2	6,8
206.	M	71	6,0	5,4	7,0
207.	M	39	5,2	5,6	5,7
208.	M	72	5,8	6,3	6,6
209.	M	70	4,8	5,9	5,0
210.	M	72	6,6	2,9	7,9
211.	M	69	7,5	5,6	9,3
212.	M	70	7,0	7,5	8,5
213.	M	64	6,3	8,1	7,4
214.	M	52	6,4	7,3	7,6
215.	M	58	5,7	12,8	6,5
216.	M	58	5,8	6,1	6,6
217.	M	77	6,1	6,0	7,1
218.	M	61	5,8	4,9	6,6
219.	M	74	6,9	5,7	8,4
220.	M	59	5,7	5,8	6,5
221.	M	71	6,8	7,6	8,2
222.	M	79	8,2	10,7	10,4
223.	M	76	7,2	10,3	8,9
224.	M	74	6,0	4,8	7,0
225.	M	39	5,5	5,6	6,2
226.	M	65	7,9	8,3	10,0
227.	M	56	7,4	6,1	9,2
228.	M	70	5,4	5,6	6,0
229.	M	56	5,5	5,5	6,2
230.	M	92	5,8	5,5	6,6
231.	M	54	13,9	22,4	19,5
232.	M	82	5,7	6,6	6,5
233.	M	68	7,0	8,5	8,5
234.	M	52	8,5	11,1	10,9
235.	M	57	5,8	4,4	6,6
236.	M	67	5,9	5,4	6,8
237.	M	80	5,9	6,8	6,8
238.	M	39	6,6	9,5	7,9
239.	M	26	6,3	8,0	7,4
240.	M	73	6,6	5,2	7,9
241.	M	60	5,7	5,1	6,5
242.	M	79	10,3	18,7	13,8
243.	M	76	5,3	5,0	5,8
244.	M	58	5,2	4,7	5,7

245.	M	84	7,1	6,3	8,7
246.	M	66	5,9	5,2	6,8
247.	M	67	7,9	10,7	10,0
248.	M	75	6,4	7,2	7,6
249.	M	65	6,2	5,3	7,3
250.	M	57	6,0	6,8	7,0
251.	M	58	7,2	8,9	8,9
252.	M	65	6,7	7,7	8,1
253.	M	63	7,1	5,8	8,7
254.	M	38	6,6	10,8	7,9
255.	M	82	6,7	7,8	8,1
256.	M	70	6,7	6,2	8,1
257.	M	79	5,7	9,2	6,5
258.	M	51	5,9	7,1	6,8
259.	M	69	6,0	4,5	7,0
260.	M	59	5,8	6,3	6,6
261.	M	58	5,9	8,6	6,8
262.	M	70	6,5	7,5	7,7
263.	M	58	7,1	5,9	8,7
264.	M	60	7,3	5,5	9,0
265.	M	63	6,7	6,2	8,1
266.	M	59	7,0	7,8	8,5
267.	M	52	7,1	7,9	8,7
268.	M	65	5,9	6,7	6,8
269.	M	56	8,9	11,4	11,6
270.	M	45	9,5	6,4	12,5
271.	M	40	5,1	5,5	5,5
272.	M	55	10,8	18,0	14,6
273.	M	68	6,4	7,8	7,6
274.	M	77	7,9	13,1	10,0
275.	M	53	5,7	5,4	6,5
276.	M	76	5,7	7,5	6,5
277.	M	56	6,1	6,7	7,1
278.	M	72	6,3	10,9	7,4
279.	M	49	10,7	6,1	14,4
280.	M	63	8,4	11,1	10,8
281.	M	71	8,0	11,0	10,1
282.	M	54	5,7	5,0	6,5
283.	M	70	6,3	7,4	7,4
284.	M	72	6,7	6,7	8,1
285.	M	24	6,7	4,3	8,1
286.	M	48	7,5	9,7	9,3
287.	M	82	5,9	5,0	6,8
288.	M	75	6,8	11,5	8,2
289.	M	70	5,5	4,5	6,2
290.	M	57	4,9	6,2	5,2
291.	M	83	7,4	12,3	9,2
292.	M	56	6,2	8,4	7,3
293.	M	73	6,1	6,2	7,1
294.	M	88	6,1	8,3	7,1

295.	M	78	6,2	5,6	7,3
296.	M	59	5,7	6,5	6,5
297.	M	81	6,7	8,9	8,1
298.	M	64	7,8	4,1	9,8
299.	M	75	6,0	5,7	7,0
300.	M	10	6,8	5,9	8,2
301.	M	89	7,0	8,6	8,5
302.	M	46	6,0	4,9	7,0
303.	M	61	15,1	11,2	21,4
304.	M	80	6,4	13,9	7,6
305.	M	79	6,9	5,8	8,4
306.	M	76	8,6	14,1	11,1
307.	M	51	6,0	5,0	7,0
308.	M	48	5,8	4,1	6,6
309.	M	43	5,7	8,7	6,5
310.	M	77	5,9	5,5	6,8
311.	M	85	6,7	6,4	8,1
312.	M	64	5,5	15,4	6,2
313.	M	61	6,5	6,8	7,7
314.	M	73	7,2	9,2	8,9
315.	M	70	6,7	8,4	8,1
316.	M	58	7,5	7,0	9,3
317.	M	79	8,5	12,3	10,9
318.	M	56	6,4	8,0	7,6
319.	M	65	6,2	3,9	7,3
320.	M	87	6,8	6,8	8,2
321.	M	77	5,7	4,7	6,5
322.	M	66	6,5	6,5	7,7
323.	M	63	6,7	8,3	8,1
324.	M	63	6,3	7,8	7,4
325.	M	65	9,8	8,4	13,0
326.	M	80	6,0	5,2	7,0
327.	M	60	7,4	10,9	9,2
328.	M	62	5,9	9,4	6,8
329.	M	69	7,2	10,6	8,9
330.	M	12	5,5	5,0	6,2
331.	M	65	5,8	5,4	6,6
332.	Ž	57	7,3	16,5	9,0
333.	Ž	50	6,1	5,6	7,1
334.	Ž	63	6,7	5,7	8,1
335.	Ž	89	5,4	4,2	6,0
336.	Ž	57	5,7	5,0	6,5
337.	Ž	79	6,6	7,9	7,9
338.	Ž	52	7,5	12,2	9,3
339.	Ž	66	6,8	7,9	8,2
340.	Ž	38	9,1	9,7	11,9
341.	Ž	61	5,8	7,8	6,6
342.	Ž	60	6,3	5,0	7,4
343.	Ž	83	10,7	12,2	14,4
344.	Ž	60	5,7	6,9	6,5

345.	Ž	71	7,0	6,8	8,5
346.	Ž	80	5,4	4,0	6,0
347.	Ž	54	7,2	3,5	8,9
348.	Ž	78	16,9	13,7	24,3
349.	Ž	45	5,7	6,7	6,5
350.	Ž	80	5,8	5,0	6,6
351.	Ž	18	5,2	4,5	5,7
352.	Ž	63	8,2	4,6	10,4
353.	Ž	72	5,6	6,1	6,3
354.	Ž	79	8,7	8,0	11,2
355.	Ž	63	6,3	6,8	7,4
356.	Ž	64	6,2	6,1	7,3
357.	Ž	36	7,6	13,4	9,5
358.	Ž	82	6,0	6,5	7,0
359.	Ž	55	5,9	6,5	6,8
360.	Ž	52	5,7	5,3	6,5
361.	Ž	41	8,8	14,2	11,4
362.	Ž	82	6,6	5,0	7,9
363.	Ž	50	6,8	8,0	8,2
364.	Ž	78	6,2	4,6	7,3
365.	Ž	71	6,1	6,5	7,1
366.	Ž	72	6,8	15,4	8,2
367.	Ž	59	7,6	5,3	9,5
368.	Ž	76	6,2	8,2	7,3
369.	Ž	79	10,6	7,7	14,3
370.	Ž	76	5,7	5,1	6,5
371.	Ž	58	6,7	6,9	8,1
372.	Ž	86	12,7	19,9	17,6
373.	Ž	79	6,6	5,9	7,9
374.	Ž	15	8,6	9,1	11,1
375.	Ž	86	6,0	7,7	7,0
376.	Ž	73	7,0	9,5	8,5
377.	Ž	84	9,0	9,0	11,7
378.	Ž	73	6,1	8,6	7,1
379.	Ž	62	8,3	8,3	10,6
380.	Ž	61	6,9	9,0	8,4
381.	Ž	77	5,6	4,5	6,3
382.	Ž	81	6,1	4,9	7,1
383.	Ž	63	7,3	12,8	9,0
384.	Ž	79	7,4	15,4	9,2
385.	Ž	53	6,5	5,4	7,7
386.	Ž	92	6,0	6,2	7,0
387.	Ž	50	6,7	5,1	8,1
388.	Ž	60	9,5	21,4	12,5
389.	Ž	53	11,3	10,2	15,4
390.	Ž	66	6,6	7,4	7,9
391.	Ž	71	5,7	6,5	6,5
392.	Ž	52	5,8	5,4	6,6
393.	Ž	54	9,2	6,6	12,0
394.	Ž	81	5,7	4,9	6,5

395.	Ž	61	6,6	6,0	7,9
396.	Ž	57	12,3	6,4	17,0
397.	Ž	66	5,7	6,9	6,5
398.	Ž	53	6,0	4,7	7,0
399.	Ž	72	6,1	6,0	7,1
400.	Ž	79	15,4	12,7	21,9
401.	Ž	63	5,5	4,9	6,2
402.	Ž	78	5,4	5,2	6,0
403.	Ž	79	5,4	4,4	6,0
404.	Ž	86	5,8	7,6	6,6
405.	Ž	71	6,5	9,1	7,7
406.	Ž	63	7,6	9,4	9,5
407.	Ž	57	6,6	6,8	7,9
408.	Ž	74	7,7	10,1	9,7
409.	Ž	53	7,9	11,3	10,0
410.	Ž	58	11,1	14,6	15,1
411.	Ž	60	6,1	6,9	7,1
412.	Ž	88	7,0	8,8	8,5
413.	Ž	85	5,7	7,0	6,5
414.	Ž	60	8,1	11,9	10,3
415.	Ž	56	9,4	9,2	12,4
416.	Ž	77	9,5	16,2	12,5
417.	Ž	89	10,0	6,8	13,3
418.	Ž	29	4,7	3,8	4,9
419.	Ž	79	8,6	10,4	11,1
420.	Ž	40	5,7	6,1	6,5
421.	Ž	38	5,5	4,6	6,2
422.	Ž	74	8,1	3,6	10,3
423.	Ž	32	6,1	4,1	7,1
424.	Ž	57	6,3	7,8	7,4
425.	Ž	84	10,3	13,9	13,8
426.	Ž	58	6,1	7,8	7,1
427.	Ž	58	6,6	8,0	7,9
428.	Ž	80	8,3	10,7	10,6
429.	Ž	57	13,0	13,7	18,1
430.	Ž	70	6,1	4,7	7,1
431.	Ž	79	9,6	8,5	12,7
432.	Ž	46	8,5	8,2	10,9
433.	Ž	85	5,6	5,7	6,3
434.	Ž	53	6,1	10,4	7,1
435.	Ž	76	7,9	12,7	10,0
436.	Ž	94	8,5	9,5	10,9
437.	Ž	85	6,7	7,8	8,1
438.	Ž	77	5,4	5,4	6,0
439.	Ž	78	6,3	5,7	7,4
440.	Ž	67	6,1	4,7	7,1
441.	Ž	41	5,0	6,2	5,4
442.	Ž	70	5,8	4,6	6,6
443.	Ž	78	9,1	6,7	11,9
444.	Ž	84	7,7	20,0	9,7

445.	Ž	77	7,5	8,2	9,3
446.	Ž	65	6,2	5,9	7,3
447.	Ž	53	7,2	7,2	8,9
448.	Ž	36	6,8	12,0	8,2
449.	Ž	75	6,4	9,6	7,6
450.	Ž	62	5,9	6,3	6,8
451.	Ž	61	14,5	6,7	20,5
452.	Ž	83	8,8	5,1	11,4
453.	Ž	48	7,3	6,9	9,0
454.	Ž	69	6,5	5,9	7,7
455.	Ž	57	9,0	7,2	11,7
456.	Ž	67	5,8	5,5	6,6
457.	Ž	57	5,8	4,5	6,6
458.	Ž	71	7,0	9,2	8,5
459.	Ž	63	8,0	10,1	10,1
460.	Ž	76	7,5	7,0	9,3
461.	Ž	77	6,0	6,4	7,0
462.	Ž	31	5,8	6,9	6,6
463.	Ž	65	6,3	7,6	7,4
464.	Ž	75	9,9	17,4	13,2
465.	Ž	80	6,0	6,1	7,0
466.	Ž	83	5,6	5,8	6,3
467.	Ž	56	7,3	6,1	9,0
468.	Ž	55	8,8	9,7	11,4
469.	Ž	82	5,6	5,4	6,3
470.	Ž	68	6,2	5,5	7,3
471.	Ž	65	5,7	5,5	6,5
472.	Ž	57	6,0	6,4	7,0
473.	Ž	46	7,1	9,9	8,7
474.	Ž	74	5,8	5,3	6,6
475.	Ž	88	6,7	8,2	8,1
476.	Ž	84	6,3	7,7	7,4
477.	Ž	34	6,0	6,3	7,0
478.	Ž	74	6,5	6,5	7,7
479.	Ž	60	6,6	5,5	7,9
480.	Ž	81	6,8	13,0	8,2
481.	Ž	72	5,5	8,4	6,2
482.	Ž	33	8,0	6,9	10,1
483.	Ž	70	6,5	6,2	7,7
484.	Ž	68	5,7	5,3	6,5
485.	Ž	61	5,9	5,0	6,8
486.	Ž	84	6,5	8,8	7,7
487.	Ž	58	6,3	14,2	7,4
488.	Ž	80	6,0	5,2	7,0
489.	Ž	86	6,7	7,1	8,1
490.	Ž	80	5,5	4,5	6,2
491.	Ž	51	5,6	10,9	6,3
492.	Ž	44	9,3	8,7	12,2
493.	Ž	43	5,7	4,6	6,5
494.	Ž	86	5,8	13,3	6,6

495.	Ž	82	5,6	4,8	6,3
496.	Ž	19	7,2	7,9	8,9
497.	Ž	73	6,0	5,8	7,0
498.	Ž	79	6,3	6,9	7,4
499.	Ž	84	8,4	8,6	10,8
500.	Ž	64	10,0	12,5	13,3
501.	Ž	47	5,6	5,0	6,3
502.	Ž	80	7,5	6,8	9,3
503.	Ž	75	6,4	5,8	7,6
504.	Ž	73	6,4	6,9	7,6
505.	Ž	90	6,1	7,1	7,1
506.	Ž	26	5,6	4,9	6,3
507.	Ž	66	5,5	5,7	6,2
508.	Ž	24	6,4	5,7	7,6
509.	Ž	77	8,1	6,6	10,3
510.	Ž	58	7,1	8,3	8,7
511.	Ž	62	6,1	5,5	7,1
512.	Ž	64	8,5	2,5	10,9
513.	Ž	62	6,2	5,1	7,3
514.	Ž	70	5,9	5,7	6,8
515.	Ž	62	5,1	5,6	5,5
516.	Ž	79	6,6	11,4	7,9
517.	Ž	71	7,1	18,0	8,7
518.	Ž	79	8,2	10,0	10,4
519.	Ž	80	6,0	4,9	7,0
520.	Ž	60	8,5	8,5	10,9
521.	Ž	39	5,8	4,7	6,6
522.	Ž	42	5,7	5,1	6,5
523.	Ž	63	7,3	7,6	9,0
524.	Ž	64	9,1	15,7	11,9
525.	Ž	50	8,0	9,4	10,1
526.	Ž	64	6,4	5,3	7,6
527.	Ž	77	5,8	5,9	6,6
528.	Ž	57	5,6	6,2	6,3
529.	Ž	63	9,4	11,7	12,4
530.	Ž	74	6,3	6,3	7,4
531.	Ž	89	5,9	5,2	6,8
532.	Ž	62	6,5	6,7	7,7
533.	Ž	74	6,7	5,1	8,1
534.	Ž	53	5,6	6,0	6,3
535.	Ž	75	6,0	5,7	7,0
536.	Ž	78	7,0	6,4	8,5
537.	Ž	47	6,9	7,8	8,4
538.	Ž	52	10,1	13,2	13,5
539.	Ž	63	7,7	7,7	9,7
540.	Ž	82	11,4	10,4	15,5
541.	Ž	50	5,7	5,3	6,5
542.	Ž	89	6,7	7,1	8,1