



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19667 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКОВАНОГО АЛЬБУМІНУ КРОВІ

1

2

(21) u200608285

(22) 24.07.2006

(24) 15.12.2006

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Каліман Віктор Павлович, Каліман Павло Авксентійович, Жуков Віктор Іванович, М'ясоєдов Валерій Васильович, Клименко Микола Олексійович, Щербань Микола Гаврилович, Горбач Татьяна Вікторівна

(73) Каліман Віктор Павлович

(57) Метод визначення глікованого альбуміну крові, який включає визначення колориметричним шляхом у клініко-лабораторних умовах неферментативно глікованого альбуміну крові, який має строго певний період життя і період напіврозпаду - 19-20 діб, чітку спорідненість до неферментативного глікозування та обмежений вплив супутніх речовин.

Корисна модель відноситься до медицини, біології, клінічної та лабораторної діагностики і може бути використана для якісного та кількісного визначення глікованого альбуміну крові.

Більшість білків крові людини та тварин, що контактують з глюкозою, схильні до неферментативного глікозування (глікування). Гліковані білки, на відміну від вуглеводно-білкових комплексів, утворюються посттрансляційно.

Ступінь глікування білків крові багато в чому залежить від наявності в молекулах білка вільних аміногруп, вмісту в плазмі крові і тканинах ациклічних форм редуційних моносахаридів, зокрема глюкози, та тривалості контакту з ними.

Оскільки у здорових людей вміст в біологічних рідинах ациклічної форми глюкози невеликий, концентрація в них неферментативно глікованих білків дуже мала. Разом з тим при стійкому збільшенні рівня глюкози (яке спостерігається при цукровому діабеті) вміст глікованих білків значно зростає унаслідок збільшення вмісту в біологічних рідинах ациклічних форм редуційних вуглеводів.

На сьогоднішній день існує колориметричний метод визначення глікованих білків плазми крові - «фруктозаміну» з використанням нітросинього тетразолію [В.С. Камышников, Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. - Москва, 2004.]. Метод заснований на здатності «фруктозаміну» відновлювати нітросиній тетразолій в лужному середовищі, переводячи його у формазаз з максимум поглинання при 530нм. Реакція між «фруктозаміном» та нітросинім тетразолієм протікає при рН 10,8 (у карбонатному буфері) при температурі 37°C; фотометру-

вання проводять через 15 хвилин. Як стандарт використовують синтетичні кетоамін, фруктозолейцин.

Даний метод визначення «фруктозаміну» є найбільш близьким до того, що заявляється, по технічній сутності та результату, який може бути досягнутим, тому він вибраний як прототип.

Головним недоліком методу визначення «фруктозаміну» є те, що визначається комплекс глікованих білків плазми крові (де альбумін крові складає не більше 60%), які мають різні періоди життя та періоди напіврозпаду (від одного до трьох тижнів), а також різною спорідненістю до неферментзумовлених реакцій. Крім цього, метод визначення «фруктозаміну» недостатньо специфічний, і на результати визначення можуть впливати багато редуційних речовин крові.

У зв'язку з вищесказаним в основу корисної моделі покладено завдання - розробити методику визначення білка крові, що має строго певний період життя і напіврозпаду, чітку спорідненість до неферментзумовленого глікозування та високу специфічність до ациклічних вуглеводів, а також розширити арсенал клініко-лабораторних методик визначення фруктозаміну.

Завдання, покладене в основу корисної моделі, вирішується тим, що метод визначення глікованого альбуміну, який заявляється, дозволяє визначити неферментативно глікований альбумін крові, який має строго певний період життя і період напіврозпаду - 19-20 діб, чітку спорідненість до неферментативного глікозування та обмежений вплив супутніх редуційних речовин.

(19) UA (11) 19667 (13) U

У основу методу, що заявляється, покладений процес посттрансляційного утворення глікованого альбуміну, який протікає у декілька етапів:

1. Перший етап полягає в утворенні основ Шиффа; він протікає швидко і зворотне; альбумінова сполука, що виникає при цьому, легко гідролізується.

2. Другий, триваліший, етап - перегруповування Амадорі - завершується утворенням стабільної кетоамінової сполуки.

Вираженість процесу неферментативного глікозування альбуміну в першу чергу залежить від тривалості контакту з ним глюкози.

Метод виконується наступним чином.

У пацієнта беруть з вени 3мл крові, змішують з 0,3мл 3,7% цитрату натрію. З плазми виділяють альбумін, що можна зробити:

- шляхом висолювання глобулінів сульфатом або сульфідом натрію, або сумішшю цих солей, а також етанольним розчином трихлороцтової кислоти;

- шляхом седиментації альбуміну унаслідок ультрацентрифугування;

- шляхом використання йоноселективних електродів;

- або будь-яким іншим шляхом.

Потім 10 міліграмів виділеного альбуміну інкубують протягом трьох годин при $t^{\circ} 100C^{\circ}$ з 2,0мл насиченою щавлевою кислотою (1моль/л). Після охолодження додають в пробірку 1 мл 20% трихлороцтової кислоти та центрифугують протягом 10 хвилин при 3000об/хв. Потім 2 проби супернатанту (по 1мл кожна) відбирають і відставляють. Одну інкубують з 0,25мл насиченого розчину тіобарбітурової кислоти (дослідна проба), іншу - з 0,25мл дистильованої води (контрольна проба). Обидві пробірки інкубують протягом 50 хвилин при $t^{\circ} 40C^{\circ}$. Вимірювання проводять на спектрофотометрі в кюветах з довжиною оптичного шляху 1см проти контролю по хвилі 443нм. Для калібрування можна використовувати серію розчинів по 1ммоль/л фруктози.

Одиниці вимірювання: мікромоль фруктозаміну (ФА) на 10 міліграмів альбуміну (мкмоль ФА/10 мг).

Допускаються незначні відхилення від заявлених величин, що не впливають на кінцевий результат.