



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **20167** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКОВАНОГО ФІБРИНОГЕНУ ПЛАЗМИ КРОВІ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ**

1

2

(21) u200607620

(22) 07.07.2006

(24) 15.01.2007

(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 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) Спосіб визначення глікованого фібриногену плазми крові у хворих на цукровий діабет колориметричним шляхом у клініко-лабораторних умовах, який **відрізняється** тим, що глікований фібриноген плазми крові визначають після інкубації протягом трьох з половиною годин при  $T=100\text{ }^{\circ}\text{C}$  загального фібриногену крові з насиченою шавлевою кислотою та подальшої інкубації отриманого супернатанта впродовж 50 хвилин при  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  з насиченим розчином тіобарбітурової кислоти.

Корисна модель відноситься до медицини, лабораторної та клінічної діагностики і дозволяє якісне та кількісне визначення глікованого фібриногену, що може бути використано для діагностики цукрового діабету та динамічному спостереженні за станом вуглеводного обміну у хворих на цукровий діабет, дозволяє оцінити, за короткий відрізок часу, адекватність гіпоглікемічної терапії, ступінь компенсації вуглеводного обміну, а також розширити арсенал лабораторно-діагностичних засобів при гіперглікемічних станах.

Хронічна гіперглікемія є однією з причин виникнення і прогресування ускладнень цукрового діабету та глюкзотоксичних станів, що переконливо підтверджують численні клінічні дослідження, зокрема, дослідження DCCT [Diabetes Control and Complications Trial group, 1993].

Для оцінки компенсації вуглеводного обміну, зокрема у хворих на цукровий діабет, використовують визначення неферментативного глікозування гемоглобіну. Процес глікування (неферментативного глікозування) гемоглобіну відбувається в результаті неферментативного з'єднання молекули глюкози з молекулою гемоглобіну.

Таким чином, визначення глікованого гемоглобіну є інформативним інтегральним показником для визначення компенсації вуглеводного обміну у хворих на цукровий діабет.

Головним недоліком цього методу є можливість визначення компенсації вуглеводного обміну тільки впродовж тривалого проміжку часу, і він не

може бути використаний для короткострокового контролю за станом метаболізму вуглеводів у хворого на цукровий діабет після зміни режиму терапії. Крім того, на показники глікованого гемоглобіну впливають такі чинники, як гемоліз, стан уремії, куріння, вагітність і т.д.

У клініко-лабораторній практиці найширше використовують колориметричний метод визначення глікованого гемоглобіну.

Суть методу [Fluckiger, Winterhalter, 1976] полягає в тому, що стабільна форма глікованого гемоглобіну містить 1-дезоксигуанозил-2-(N-валіл)фруктозу та дегідратується фосфорною кислотою з утворенням 5-оксиметил-2-фуральдегіду, який взаємодіє з 2-тіобарбітуровою кислотою з формуванням комплексу, що володіє максимумом абсорбції при 443 нм.

Даний метод визначення глікованого гемоглобіну є найбільш близьким до того, що заявляється, по технічній сутності та результату, що може бути досягнутий, тому він обраний як найближчий аналог.

Спосіб виконується наступним чином.

З досліджуваної цілісної крові пацієнта готують гемолізат, використовуючи для цього заздалегідь приготований лізуючий розчин. Потім, для встановлення вмісту глікованого гемоглобіну, до гемолізату додають фосфорну кислоту і вносять отриману композицію в пробірки, що щільно закриваються гумовими пробками із заздалегідь уколоною в них ін'єкційною голкою. Проби нагрівають протягом 30

(13) **U**(11) **20167**(19) **UA**

хвилин на гліцериновій лазні при  $t^{\circ} 100^{\circ}\text{C}$ . Через 10 хвилин нагрівання з пробок виймають ін'єкційні голки. Після закінчення дегідратації пробірки охолоджують в проточній воді або на крижаній лазні протягом 10 хвилин, потім додають розчин трихлороцтової кислоти. Після перемішування пробу інкубують на водяній лазні протягом 40 хвилин при  $t^{\circ} 37^{\circ}\text{C}$ . Потім вимірюють оптичну щільність розчину.

Враховуючи, що реакція неферментативного глікування білків крові неспецифічна і при стані гіперглікемії глюкоза крові взаємодіє не тільки з гемоглобіном, але і з іншими білками крові, що впливає на інтегральний терміновий показник компенсації метаболізму глюкози, нами було поставлено завдання - розробити клініко-лабораторну методику визначення неферментативного глікування білка, який має короткий період напіврозпаду і може слугувати адекватним інтегральним показником компенсації метаболізму глюкози за короткій проміжок часу.

Завдання, покладене в основу корисної моделі вирішується тим, що одним із зворотних глікованих білків є фібриноген, з періодом напіврозпаду три-чотири доби, визначення якого відображає рівень глікемії за короткий проміжок часу і може слугувати адекватним інтегральним показником компенсації вуглеводного обміну у хворих на цукровий діабет.

Позитивний ефект корисної моделі обумовлений тим, що на процес глікування фібриногену не впливають такі численні чинники, як гемоліз, ку-

ріння, уремія, вагітність і т.д., крім того, заявлений спосіб визначення глікованого фібриногену дозволяє отримати інтегральний показник метаболізму глюкози за три-чотири доби та оперативно скоректувати гіпоглікемічну терапію, а також розширити арсенал клініко-лабораторних методів визначення фруктозаміну.

Спосіб виконується наступним чином.

У пацієнта беруть з вени 3 мл крові, змішують з 0,3 мл 3,7% цитрату натрію. З плазми виділяють фібриноген. Потім виділені 10 міліграм фібриногену інкубують на протязі трьох з половиною годин при  $t^{\circ} 100^{\circ}\text{C}$  з 2мл насиченої щавлевої кислоти (1 ммоль/л). Після охолодження 1 мл 20% трихлороцтової кислоти додають в пробірку і центрифугують протягом 15 хвилин при 3000 об/хв. 2 проби супернатанта (по 1 мл 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  $t^{\circ} 40^{\circ}\text{C}$ . Вимірювання проводять на спектрофотометрі в кюветах з довжиною оптичного шляху 1см, проти контролю, на хвилі 443нм. Для калібрування використовують серію розчинів по 1 ммоль/л фруктози.

Одиниці вимірювання: мікромоль фруктозаміну на 10 міліграм фібриногену/фібрину (мкмоль ФА/10 міліграм).

Допускаються незначні відхилення в температурному, кількісному та часовому діапазоні.