



УКРАЇНА

(19) UA (11) 33540 (13) A

(51) B6 A61B5/14, G01N33/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКІРОВАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ

(21) 99031265

(22) 09.03.1999

(24) 15.02.2001

(33) UA

(46) 15.02.2001, Бюл. № 1, 2001 р.

(72) Корольов Віталій Олександрович, Петров
Олександр Васильович(73) Кримський державний медичний університет
ім. С.І. Георгієвського

(57) Спосіб визначення глікірованого гемоглобіну, який включає проведення гідролізу глікірованого гемоглобіну, забарвлення з тіобарбітуровою кислотою, вимір загального гемоглобіну з подальшим розрахунком, який **відрізняється** тим, що перед забарвленням попередньо проводять ізоелектричне фокусування в борат-поліолній системі проби гемолізату капілярної крові в мікротрубках в градієнті рН 6,9-7,3.

Винахід стосується медицини, а саме, способам виміру характеристик крові в організмі, і може бути використаний для контролю цукрового діабету.

Відомим є спосіб визначення глікірованого гемоглобіну (Spiser K.M., Allen R.C., Buse M.J. A simplified assay of hemoglobin A in Diabetic patients by use of isoelectric focussing and quantitative microdensitometry // Diabetes. - 1978. - V. 27, № 4. - P. 384-388), який полягає в проведенні ізоелектричного фокусування приготуваних гемолізатів в амфолінах в різних діапазонах рН. Рівень глікірованого гемоглобіну визначають денситометрично і виражають в процентах.

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення аналітичної надійності і спрощення способу), необхідність використання венозної крові, приготування гемолізатів, що пов'язано із затратами часу, забарвлення гелів бензидином, наявність денситоміру дозволяє застосовувати даний метод тільки у спеціалізованих лабораторіях, а також необхідність у великій кількості дорогих реактивів, що робить спосіб досить трудомістким.

За прототип обрано спосіб визначення глікірованого гемоглобіну за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (Карпова Е.А., Городецкий В.К. Колориметрический метод определения неферментативно гликозилированного гемоглобина в крови человека // Вопросы мед. химии. - 1989. - № 1. - С. 122-127). Спосіб ґрунтується на тому, що при кислотному гідролізі (при нагріванні) глікірованого гемоглобіну відбувається відщеплення фруктози, яка перетворюється в кислому середовищі в 5-оксиметілфурфурол, який, в свою чергу, утворює забарвлений комплекс із 2-тіобарбітуровою кисло-

тою. Інтенсивність забарвлення цього комплексу вимірюють на спектрофотометрі.

Ознаками прототипу, що співпадають із суттєвими ознаками запропонованого способу, є проведення кислотного гідролізу глікірованого гемоглобіну, забарвлення з тіобарбітуровою кислотою, вимір загального гемоглобіну з подальшим розрахунком. Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення аналітичної надійності і спрощення способу), є необхідність виміру аналітичної щільності фону кожної проби, що збільшує час виміру глікірованого гемоглобіну, підвищений коефіцієнт варіації.

В основу винаходу поставлена задача вдосконалення способу визначення глікірованого гемоглобіну шляхом попереднього виділення фракції глікірованого гемоглобіну з капілярної крові за рахунок застосування ізоелектричного фокусування, що дозволяє підвищити точність виміру, тобто, підвищити аналітичну надійність способу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення глікірованого гемоглобіну, який включає проведення гідролізу глікірованого гемоглобіну, забарвлення з тіобарбітуровою кислотою, вимір загального гемоглобіну з подальшим розрахунком, згідно з винаходом, перед забарвленням попередньо проводять ізоелектричне фокусування в борат-поліолній системі проби гемолізату капілярної крові в мікротрубках в градієнті рН (6,9-7,3).

Між сукупністю суттєвих ознак способу, який заявляється, і технічним результатом, який може бути досягнутий, проявляється такий причинно-наслідковий зв'язок: проведення попереднього ізоелектричного фокусування в борат-поліолній системі капілярної крові в градієнті рН 6,9-7,3 дозволяє підвищити точність способу визначення,

оскільки при підбраному градієнті відбувається ізоелектрофокусування глікірованого гемоглобіну, а решта основних білків крові, які утворюють додатковий фон, при дії кислотою, ізоточка яких інша, йде в розчин, і таким чином з'являється можливість визначення справжнього глікірованого гемоглобіну, тобто, поліпшує критерії аналітичної надійності способу.

Запропонованим способом обстежено 17 здорових і 66 хворих на цукровий діабет. При цьому рівень глікірованого гемоглобіну достовірно змінювався у хворих на цукровий діабет порівняно із здоровими (у здорових 5-5,5%, у хворих на цукровий діабет - 8,5-12,0 %), а також добре корелював з показниками вуглеводного обміну (глікемією, глюкозурією).

Спосіб здійснюється таким чином.

Спочатку готують розчини. Для цього створюють вихідний трис-боратний буфер - 0,01 М борна кислота і трис (140 мг) в 1000 мл води, рН 7,8-8,0. Потім готують три розчини: розчин № 1 - 4 мг рибофлавіну і 0,04 мл темеду, додають до 100 мл вихідного буферу; розчин № 2 - 0,24 мл темеду і 24 мл розчину № 1 додають до 600 мл вихідного буферу, вимірюють рН; розчин № 3 - 45 мл розчину № 2 додають до 55 мл гліцерину, ретельно перемішують, вимірюють рН. Значення рН розчинів № 2 і № 3 є кінцевими точками графіку, за яким визначають значення рН двох градієнтних розчинів для ізоелектричного фокусування, що відповідає ізоточці глікірованого гемоглобіну рН 6,5-7,3. Ці два градієнтних розчини готують шляхом титрування розчину №3 в розчин № 2 відповідно в двох посудинах (по 50-100 мл). У градієнтні розчини додають акриламід і метиленбісакриламід, відповідно 68 і 2,03 мг на 1 мл розчину. Для проведення ізоелектричного фокусування беруть капіляри 60 x 1 мм і заповнюють їх зверху вниз по черзі трис-боратним буфером, градієнтним розчином з більш лужним рН, градієнтним розчином з більш кислим рН. Здійснюють фотополімеризацію до утворення гелів. Потім капіляри з полакриламідним гелем вставляють в апарат ПЕФ-1 з резиновими пробками, з раніше пробитими голкою отворами. Перед дослідженням у пацієнта беруть 0,1 мл оксалату натрію і перемішують вміст. В іншу пробірку, яка містить 16 мл 0,9% хлориду натрію, вносять 0,02 мл нерозведеної капілярної крові і визначають вміст загального гемоглобіну (будь-яким методом). Для гемолізу еритроцитів в оксалатну кров додають 1 краплю ефіру, струшують і залишають на 10 хвилин. У капіляри з гелем і вихідним буфером підшаровують за допомогою мікрошприця 10 мкл гемолізату. Апарат ПЕФ-1 заповнюють вихідним трис-боратним буфером і проводять ізоелектричне фокусування протягом 14-18 годин при напрузі не менш як 20 в/см і температурі 4°C. Після проведення ізоелектрофокусування кожний капіляр виймають із апарату і розтирають у ступці

з 0,9 мл дистильованої води до одержання гомогенної маси, яку переносять в хімічну пробірку (для кожного розтертого капіляра окрема пробірка). До цієї гомогенної маси додають 0,5 мл 0,2 н трихлороцетної кислоти, закривають пробірку резиновою пробкою із вставленими в неї ін'єкційними голками і ставлять в киплячу водяну баню. Через 10 хвилин голки виймають із пробок і вміст пробірок кип'ятять ще 50 хвилин. Потім охолоджують пробірки в крижаній воді, далі вносять 0,5 мл 40% трихлороцетової кислоти, струшують і центрифугують при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. В суху пробірку відбирають 0,5 мл надосадочної рідини, додають 0,5 мл концентрованої соляної кислоти і 0,05 мл 0,02 м тіобарбітурової кислоти, перемішують, накривають пробірку скляною пробкою "слізкою" і ставлять на 16 хвилин в киплячу водяну баню. Після цього вимірюють оптичну щільність проби на спектрофотометрі при довжині хвилі 432,5 нм в кювету з довжиною оптичного шляху 10 нм. Для виключення впливу поліакриламідного гелю, який присутній у пробі, визначають екстинкцію фону. Для цього капіляр з гелем оброблюють так, як і експериментальну пробу, виключаючи стадію нагрівання в киплячій водяній бані протягом 1 години. Екстинкція фону, як показує практика, величина стабільна, ось чому достатньо одного визначення для серії досліджень. Експериментальну пробу і пробу на фон вимірюють на спектрофотометрі проти контролю на реактиви. Концентрацію глікірованого гемоглобіну визначають за калібровочним графіком, який побудований за стандартними розчинами фруктози:

$$\text{глікований гемоглобін} = \frac{C_{\text{фр}}}{2 \times C_{\text{НВ}}} \times 100\%$$

де $C_{\text{фр}}$ - концентрація фруктози в пробі (в мол/л), яка визначена за калібровочним графіком; $C_{\text{НВ}}$ - концентрація сумарного гемоглобіну в пробі (в моль/л); 2 - коефіцієнт, який враховує, що 1 молекула глікірованого гемоглобіну зв'язана з 2 молекулами фруктози.

Позитивний ефект.

Спосіб дозволяє поліпшити критерії аналітичної надійності, що підвищує точність визначення глікірованого гемоглобіну. При цьому представляється можливим використання капілярної крові, що знижує травматичність обстежених хворих. Також відсутня необхідність виміру оптичної щільності фону кожної проби, оскільки підібрані градієнти, в яких відбувається ізоелектрофокусування глікірованого гемоглобіну, а решта основних білків крові, ізоточка яких інша, ідуть в розчин, що значно спрощує спосіб. Таким чином, запропонований спосіб визначення глікірованого гемоглобіну, який включає в себе високу відтворність і доступність у відношенні реактивів і приборів, може бути використаний в клініко-біохімічних лабораторіях.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
