

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 616.155.16 615.543.545-073

©Королев, Молчанов

МЕТОД ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЯ И ФОТОКОЛОРИМЕТРИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА A_{1c}

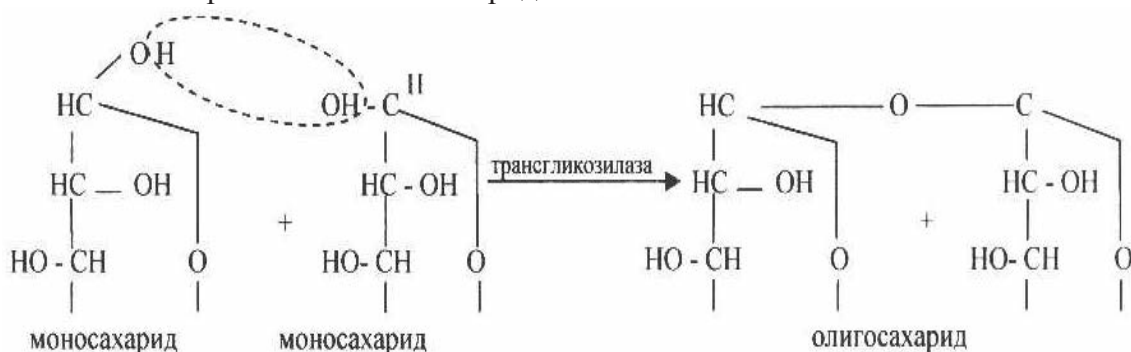
В.А. Королев, В.И. Молчанов

Кафедра медицины катастроф Крымского государственного медицинского университета, 95006 г. Симферополь, бульвар Ленина 5/7; тел.: 27-44-62; факс: 27-20-92; эл. почта: v_a_korolev@list.ru

Проведена оценка аналитической надежности разработанного метода определения гликированного гемоглобина (HbA_{1c}, GG), основанного на выделении GG при изоэлектрофокусировании в борат-полиольной системе, кислотном гидролизе GG и фотоколориметрии образовавшегося фурфурола в комплексе с 2-тиобарбитуровой кислотой (метод ИЭФ+ФК). Изучены внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость на диабетическом и недиабетическом уровнях, которая составила от 6 до 21%. Чувствительность изучаемого метода определена при исследовании физиологического раствора и 50%-альбумина. Специфичность метода доказана схожей электрофоретической миграцией со стандартом HbA_{1c}. При сравнении метода ИЭФ+ФК с ионообменной хроматографией на микроколонках (ИОХ) обнаружено отличие в содержании HbA_{1c} и отсутствие зависимости в уровнях данного показателя. Вновь созданный метод определения может быть альтернативным способом определения HbA_{1c}.

Ключевые слова: методы определения, электрофорез (аналитическая химия), патологический гемоглобин.

ВВЕДЕНИЕ. В научной литературе в последние годы сложилось представление о двух казалось бы сходных процессах – гликозилирование и гликирование. Гликозилирование, а точнее трансгликозилирование, - это перенос остатка моносахарида на другой моносахарид с образованием гликозидной связи, который является ферментативным процессом. Примером гликозилирования может быть образование олигосахарида:



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА A_{1c}

Гликирование (неферментативное гликозилирование) - это присоединение к аминогруппе белка (пептида или аминокислоты) моносахаридного остатка с образованием основания Шиффа, а затем кетамина; оно протекает без участия ферментов. Для его осуществления необходимы следующие условия: 1) наличие свободных и неэкранированных NH₂ групп у белка; 2) наличие альдегидов; 3) достаточное время контакта; 4) способность белка быстро менять конформацию и возвращаться в исходное состояние. Вот приблизительная схема гликирования:



Объединённая комиссия IUPAC по биохимической номенклатуре рекомендует использовать термин “гликирование” “glycation” для обозначения неферментативного присоединения сахара к белку. Он предпочтительнее, чем термин “неферментативное гликозилирование” “nonenzymatic glycosylation”.

На сегодняшний день известно более 20 методов определения HbA_{1c} [1]. Условно их можно разделить на хроматографические, электрофоретические, иммунохимические, колориметрические. В различных лабораториях пытаются использовать те или иные методы. Однако и на сегодняшний день уровень HbA_{1c} не нашёл должного использования в клинической практике. Одной из существенных причин этому может служить сложившееся на сегодняшний день мнение о невозможности или о плохой лабораторной стандартизации основных методов определения HbA_{1c} [2].

Цель настоящей работы - апробировать разработанный нами метод определения GG, сочетающий в себе выделение фракции HbA_{1c} при помощи ИЭФ и последующего определения его величины фотокolorиметрией с использованием ТБК после неполного гидролиза с щавелевой кислотой (метод ИЭФ+ФК).

МЕТОДИКА. Сущность метода "ИЭФ+ФК" заключается в следующем. Сначала готовят градиентные растворы. Для этого создают исходный трис-боратный буфер: - к 1 литру дистиллированной воды добавляют 0,01 моль борной кислоты (620 мг) и вносят трис (C₄H₁₁O₃N) до pH 7,8-8,0 (примерно 500-700 мг). Затем готовят три раствора: раствор N1 - 4 мг рибофлавина и 0,04 мл темеда (тетраэтил-метилendiамина) добавляют к 100 мл исходного буфера; раствор N2 - 0,24 мл темеда и 24 мл раствора N1 добавляют к 600 мл исходного буфера, измеряют pH; раствор N3 - 45 мл раствора N2 добавляют к 55 мл глицерина (чда или хч), тщательно перемешивают, измеряют pH. Значения pH растворов N2 и N3 являются конечными точками графика, по которым определяли значения pH двух градиентных растворов для ИЭФ ≈6,9-7,5, соответствующих изоточке HbA_{1c} (pI при ИЭФ в борат-полиольной системе 7,2-7,3). Эти два градиентных раствора готовят путём титрования раствора N3 в раствор N2 соответственно в двух тёмных сосудах (по 50-100 мл). К градиентным растворам добавляют акриламид и метилен-бис-акриламид, соответственно 68 и 2,03 мг на 1 мл раствора. Тёмные сосуды с градиентными растворами подписывают (номер, pH, дата приготовления) и хранят при температуре +1° - +4°С в холодильной камере. Перед исследованием берут стандартные капилляры (диаметр 1 мм, длина 60 мм). Заполняют капилляры

сначала градиентным раствором с более щелочным pH, затем с более кислым pH. В начале капилляра оставляют свободное место (примерно 1/5 часть капилляра) для внесения исследуемого материала. Осуществляют фотополимеризацию под лучами дневного света (не менее 5-6 часов) до образования гелей. Капилляры с полиакриламидным гелем вставляют в аппарат для электрофореза (использован аппарат ПЭФ-1 с резиновыми пробками с заранее проколотыми иглой отверстиями). Перед исследованием у пациента берут цельную кровь и готовят гемолизаты любым способом. Гемолизаты вносят в капилляры при помощи шприца на 2 мл или инсулинового, вставляют капилляры в аппарат для электрофореза, последний заполняют трис-боратным буфером, проводят ИЭФ не менее 14 часов при напряжении не менее 20 в/см и температуре +1° - +4°C (в холодильной камере). После проведения ИЭФ каждый капилляр извлекают из аппарата и растирают в ступке с 2 мл дистиллированной воды до получения гомогенной массы (для каждого растёртого капилляра отдельная пробирка). Ранее нами было показано, что в указанных условиях проведения изoeлектрофокусирования в капиллярах остаются белки с изоточкой 6,9-7,5, то есть преимущественно гликированный гемоглобин (изоточка 7,2-7,3). Количественное определение и расчет гликированного гемоглобина проводят также как в методе "Диабет-тест".

Метод "Диабет-тест". 2 мл гомогената (в методе ИЭФ+ФК) или гемолизата крови (в методе "Диабет-тест") помещают в пробирку с притертой пробкой, приливают 1 мл 0,3 н щавелевой кислоты, перемешивают встряхиванием. Пробы помещают на 1 час на кипящую водяную баню. Охлаждают до комнатной температуры на воздухе. Приливают 1 мл 40% трихлоруксусной кислоты (ТХУ), перемешивают встряхиванием. Через 10 минут центрифугируют в течение 10 минут при 3000 об/мин. К 3 мл центрифугата приливают 0,75 мл 0,05 М ТБК, перемешивают встряхиванием. Инкубируют 40 минут при 40°C на водяной бане. Колориметрируют на спектрофотометре при длине волны (λ) 443 нм против холостой пробы. Приготовление холостой пробы: 2 мл H₂O + 1 мл 0,3 н щавелевой кислоты + 0,75 мл 0,05 М ТБК - инкубировать вместе с опытными пробами. Расчёт проводят по формуле:

$$\frac{E_{443}}{0,029} \cdot 3,3 = \%HbA_{1c},$$

где E_{443} значение оптической плотности исследуемой пробы при 443 нм; 0,029 - значение оптической плотности, соответствующее 1% HbA_{1c} [3], 3,3 - коэффициент, учитывающий, что гидролиз неполный и осуществляется на 30% [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для апробации метода ИЭФ+ФК: 1. проводили оценку его аналитической надежности; 2. сравнивали вновь созданный метод с другими популярными методами для определения HbA_{1c} при сопоставлении этого показателя с основными показателями сахарного диабета (СД), существенно влияющими на состояние метаболизма при этом заболевании; 3. вычисляли значение HbA_{1c}, определенного методом ИЭФ+ФК, при заболеваниях, не связанных с СД.

Для оценки аналитической надежности метода ИЭФ+ФК изучали внутрисерийную и межсерийную воспроизводимость, чувствительность метода, специфичность его, а также сравнивали значения HbA_{1c}, полученных нашим способом с методом ИОХ. Внутрисерийную воспроизводимость изучали в различных сериях как у доноров с отсутствием СД, так и у больных СД (таблица 1).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА A_{1c}

Таблица 1. Внутрисерийная воспроизводимость результатов в группе недиабетических доноров.

Показатель	Примеры				
	1	2	3	4	5
HbA _{1c} , %	4,32	3,18	2,62	4,89	2,39
	4,55	3,64	3,40	4,89	2,50
	4,55	3,86	3,41	5,12	2,61
	4,77	3,86	3,76	5,12	2,61
	4,89	3,98	3,98	6,14	2,84
	5,00	4,43	4,10	6,26	3,07
	5,35	4,55	4,20	7,39	3,53
	5,35	5,00	4,67	7,85	
			4,67	8,31	
n	8	8	9	9	7
X _{ср}	4,847	4,063	3,868	6,219	2,793
X _q	4,860	4,098	3,917	6,346	2,817
σ	0,376	0,573	0,658	1,340	0,395
S _x	0,133	0,203	0,219	0,447	0,149
V%	7,763	14,103	17,006	21,543	14,152
V _{xmax}	1,335	1,636	1,220	1,561	1,865
V _{xmin}	1,402	1,540	1,897	0,992	1,019

Чувствительность метода ИЭФ+ФК проверена исследованием жидкостей с различной концентрацией вещества. Для этого мы провели изоэлектрофокусирование физиологического раствора и 50%-альбумина. Представляем экстинкции E_{оп} при λ=443нм физиологического раствора, отсортированного в порядке возрастания: 0,09 0,10 0,10 0,10 0,10 0,10 0,10 0,10 0,11 0,11 0,11 0,11 0,11 0,12 0,12 0,13. А чувствительность физиологического раствора можно представить как X_{ср}=0,106±0,0001. Чувствительность 50% альбумина существенно не отличалась от таковой физиологического раствора. E_{оп} при λ = 443 нм, отсортированные в порядке возрастания 0,09 0,09, 0,09, 0,09 0,09 0,09 0,09 0,09 0,10; 0,10; 0,10 0,10 0,11 0,13 0,13 0,14 0,16, чувствительность X_{ср}=0,105±0,00048.

Специфичность изучаемого метода проанализирована нами следующим образом. Для этого в плоском полиакриламидном геле изучили миграцию изучаемых гемолизатов, сфокусированных гемолизатов при различных типах СД и калибратора HbA_{1c} (стандарта по “заряду”) ("Boehringer Mannheim"). Изучаемые гемолизаты были представлены довольно выраженным фоном, а фракция HbA_{1c} в относительно небольшом размере мигрировала до уровня стандарта. И только сфокусированные гемолизаты имели небольшой фон, а фракция HbA_{1c} также мигрировала до уровня стандарта.

Далее мы сравнили уровни HbA_{1c}, определённые ИЭФ+ФК и методом ИОХ [5]. Для этого мы применили корреляционно-регрессионный анализ. Приводим результаты сравнения у всех пациентов (здоровых и диабетических доноров) (n=15). Средняя арифметическая уровня HbA_{1c} при определении искомого показателя методом ИОХ (X_a) 12,674±2,087% не отличалась от такового при применении метода ИЭФ+ФК (Y_a) 9,218±0,939% (t=1,509, p>0,1). При проведении корреляционного анализа X_a/Y_a не обнаружено линейной связи r=0,1292 (t=0,464, p>0,5) и умеренная нелинейная корреляция R=0,4944 (t=0,242, p<0,05), а обратная

нелинейная корреляция Y_a/X_a отсутствовала $R=0,4747$ ($t=1,978$, $p>0,05$). У больных СД ($n=10$) также отсутствовала связь как прямая X_a/Y_a $r=0,1372$ ($t=0,4$, $p>0,5$), $R=0,3216$ ($t=0,94$, $p>0,2$), так и обратная Y_a/X_a $R=0,3645$ ($t=1,09$, $p>0,2$). У доноров без СД ($n=5$) также не обнаружено прямой $r=-0,0377$ ($p>0,5$), $R=0,0787$ ($p>0,5$) и обратной $R=0,3438$ ($t=0,67$, $p>0,5$) корреляционной связи. При проведении регрессионного анализа обнаружен параболический вид функции: как ИОХ/ИЭФ+ФК, так и ИЭФ+ФК/ИОХ. Однако данный анализ был недостоверен как у всех больных ($p>0,05$), так и у больных СД ($p>0,05$) и недиабетических доноров ($p>0,05$). Для сравнения уровней HbA_{1c} , определенного этими двумя методами, мы применили также непараметрический парный критерий Вилкоксона (критерий Т). Обнаружено, что имеются различия между двумя выборками у всех больных (критерий $T=-3,067$; так как абсолютная величина Т больше 1,96, то имеются различия этих двух связанных выборок с уровнем значимости $p<0,05$), у больных СД (критерий $T=-2,446$; так как абсолютная величина Т больше 1,96, то имеются различия этих двух связанных выборок с уровнем значимости $p<0,05$). У доноров без СД подобного различия не обнаружено.

На следующем этапе мы сравнили метод ИЭФ+ФК с тремя популярными методами: иммунохимическим (Abbott), колориметрическим при неполном гидролизе со щавелевой кислотой – метод Диабет-тест (Д-т) и колориметрическим при неполном гидролизе с фосфорной кислотой (Ph) [6]. Для этого мы сопоставили уровни HbA_{1c} , определённые этими четырьмя методами, с основными показателями у больных СД ($n=139$). Обнаружено, что при использовании метода ИЭФ+ФК уровень HbA_{1c} устанавливал корреляционно-регрессионную зависимость со значительно большим количеством показателей СД, чем при применении других методов (рис. 1-4).

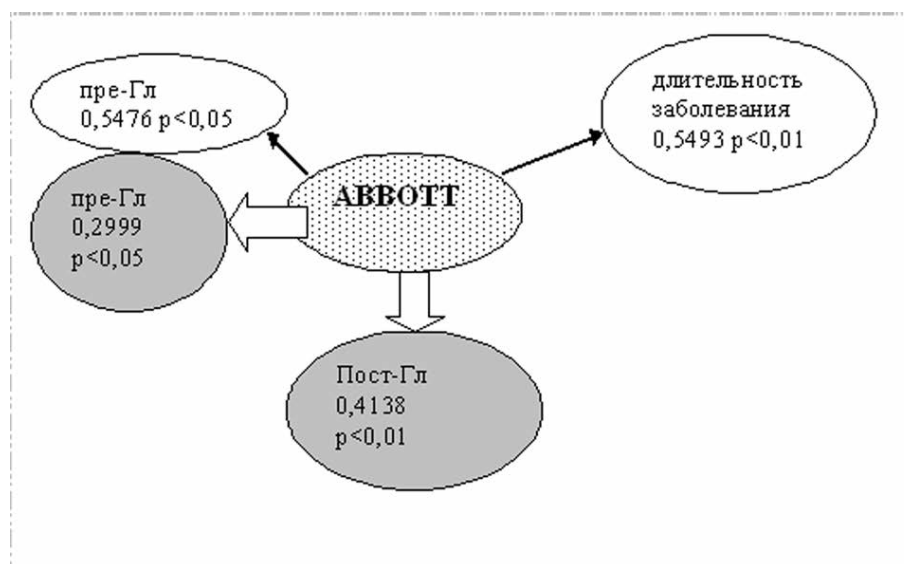


Рисунок 1.

Корреляционная \rightarrow и регрессионная \Rightarrow зависимость между основными показателями СД и уровнем HbA_{1c} , определенного методом АВБОТТ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА A_{1c}

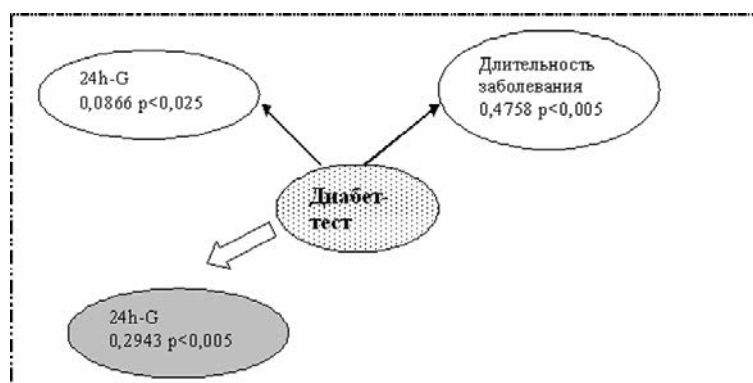


Рисунок 2.

Корреляционная \rightarrow и регрессионная \Rightarrow зависимость между основными показателями СД и уровнем HbA_{1c}, определенного методом **ДИАБЕТ-ТЕСТ**.

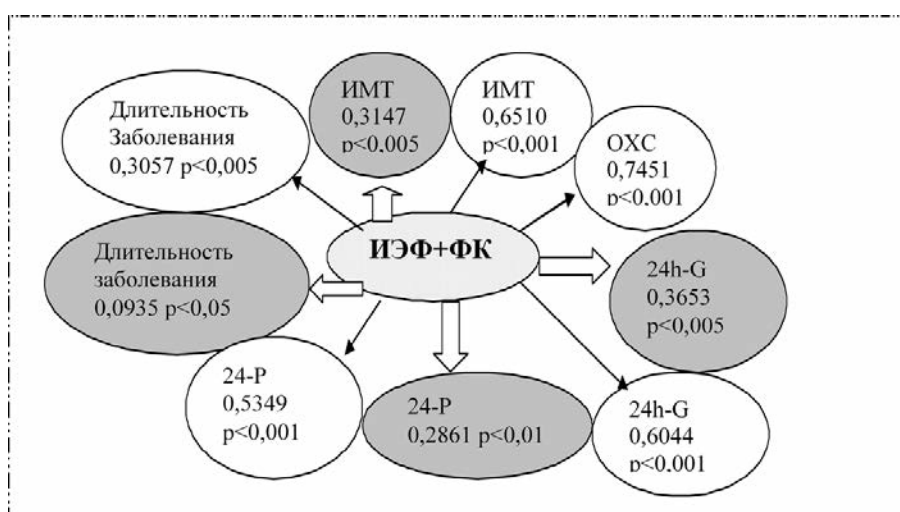


Рисунок 3.

Корреляционная \rightarrow и регрессионная \Rightarrow зависимость между основными показателями СД и уровнем HbA_{1c}, определенного методом **ИЭФ+ФК**.

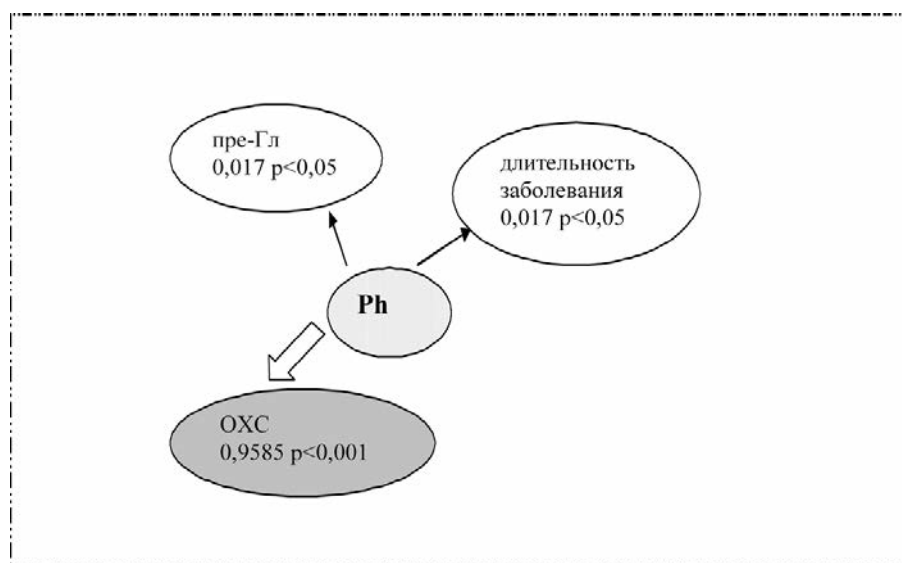


Рисунок 4.

Корреляционная \rightarrow и регрессионная \Rightarrow зависимость между основными показателями СД и уровнем HbA_{1c}, определенного методом **Ph**.

На третьем этапе мы устанавливали возможность использования HbA_{1c} у больных с различными хроническими заболеваниями, не связанными с СД. Для этого были обследованы больные кардиологического отделения ($n=11$) с ИБС и гастроэнтерологического отделения ($n=4$) с гепатитами и циррозами печени. У больных в кардиологическом отделении при изучении связи уровня HbA_{1c} с основными показателями, характеризующими состояние метаболизма не обнаружено какой-либо связи между этим параметром и основными биохимическими показателями и функцией миокарда (таблица 2). В то же время следует отметить усиление корреляционной связи протромбиновый индекс (ПТИ) / HbA_{1c} ($R=0,796$) и HbA_{1c} / фракция выброса ($R=0,6478$). Хотя эти связи и были недостоверными в проведенном исследовании ($p>0,05$), однако коэффициенты Стьюдента (t) в эксперименте существенно не отличались от критических значений. В гастроэнтерологическом отделении у больных с гепатитами и циррозами печени обнаружена весьма высокая корреляционная связь между уровнем HbA_{1c} и процентным содержанием альбумина в сыворотке (таблица 3). Следует отметить, что, хотя не обнаружено достоверной корреляции между уровнем щелочной фосфатазы (ЩФ) и содержанием HbA_{1c} ($p>0,05$), однако согласно критериям Фишера-Стьюдента (2,726 и 2,776, соответственно), данные связи незначительно отличались от достоверности.

Таблица 2. Корреляционный анализ между основными биохимическими и инструментальными показателями и уровнем HbA_{1c} у больных, находящихся на лечении в кардиологическом отделении.

Биохимический показатель/ HbA_{1c}	n	r	p	R	p
ОХС ($5,87 \pm 0,303$ ммоль/л)/ HbA_{1c} ($8,273 \pm 1,33\%$)	11	0,018	$>0,5$	0,51	$>0,1$
HbA_{1c} /ОХС				0,5577 t в эксперименте 1,999; t критическое 2,201	$>0,05$
Пре-G ($5,79 \pm 0,28$ ммоль/л)/ HbA_{1c} ($8,64 \pm 0,99\%$)	16	-0,062	$>0,5$	0,112	$>0,5$
ПТИ ($94,75 \pm 1,75\%$)/ HbA_{1c} ($15,67 \pm 2,33\%$)	5	-0,60	$>0,5$	0,796 t в эксперименте 2,302; t критическое 2,571	$>0,05$
β -липопротеины($59,56 \pm 3,98$ оп ед)/ HbA_{1c} ($8,102 \pm 0,94\%$)	16	0,29	$>0,2$	0,31	$>0,2$
Фракция выброса ($57,5 \pm 4,7\%$)/ HbA_{1c} ($12,09 \pm 1,84\%$)	8	0,22	$>0,5$	0,29	$>0,2$
HbA_{1c} /фракция выброса	8			0,6478 t в эксперименте 2,09; t критическое 2,306	$>0,05$

n - количество обследованных больных; r - коэффициент линейной корреляции и уровень значимости; R, p - выборочное корреляционное отношение и уровень значимости.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА A_{1c}

Таблица 3. Корреляционный анализ между основными биохимическими показателями и уровнем HbA_{1c} у больных, находящихся на лечении в гастроэнтерологическом отделении.

Биохимический показатель	n	r	p	R	p
Альбумин сыворотки (51,65±3,25%)/ HbA _{1c} (14,71±1,45%)	4	0,59	>0,2	0,99	<0,001
Аланин-трансаминаза (1,90±0,83 ммоль/л)/ HbA _{1c} (14,66±3,41%)	5	-0,15	>0,5	0,68	>0,1
ЩФ (387,5±58,18)/HbA _{1c} (17,52±2,64%)	4	0,51	>0,2	0,89 t в эксперименте 2,726; t критическое 2,776	>0,05
Билирубин крови (60,18±27,08 мкмоль/л)/ HbA _{1c} (14,55±2,79%)	6	0,21	>0,5	0,46	>0,2
ОХС (5,10±1,08 ммоль/л)/ HbA _{1c} (14,70±1,45%)	4	0,36	>0,5	0,55	>0,2
n - количество обследованных больных; r, p - коэффициент линейной корреляции и уровень значимости; R, p - выборочное корреляционное отношение и уровень значимости; t - распределение Стьюдента.					

Полученные данные позволяют несколько по иному взглянуть как на методы определения, так и на значение самого HbA_{1c}. Не так много показателей для которых существует столь многочисленное разнообразие методов определения, каким является гликированный гемоглобин. Однако и на сегодняшний день важный показатель HbA_{1c} фактически не используется в практической работе врачей [7]. Если HbA_{1c} и определяют в некоторых клинических лабораториях, то скорее не для клинического использования, а отдавая долг рекомендациям European Diabetes Policy Group [8, 9], согласно которым HbA_{1c} находится на первом месте в контроле СД. Лидерами в методах определения HbA_{1c} являются хроматографические методы, особенно хроматография под высоким давлением (HPLC) [10]. С хроматографическими методами обычно сравнивают вновь разработанные методы определения HbA_{1c}. Значения HbA_{1c}, определенные хроматографическим методом на большой колонке (6,5±1,5%), считают эталонными [11]. Современный HPLC-метод стараются привлекать такими характеристиками, как то, что данный метод позволяет определять HbA_{1c} за 9 минут, требуется только 1 мл крови [12]. Однако возможности хроматографических методов ограничены из-за несоответствия уровня HbA_{1c}, определенного этими методами, и диабетическим контролем. Это связано как с наличием аномальных гемоглобинов в исследуемых гемолизатах, так и с часто развивающейся гемоглобинопатией у больных СД [13], особенно при II типе этого заболевания [14]. Это же касается и других методов определения HbA_{1c} - иммунохимических, известных в последнее время как DCA 2000. Данные методы высоко коррелируют с ИОХ [15], а DCA 2000 позволяет определять HbA_{1c} в течение 7 минут и рекомендуется как дающий надежную и достоверную информацию [16]. Однако наши исследования показали, что уровень HbA_{1c}, определенный иммунохимическим методом, не отражает состояние метаболизма у

больных СД. Это же касается и колориметрических методов, основанных на фотоколориметрии с ТБК после неполного гидролиза. Отсутствие отделения лабильной фракции, процентного определения HbA_{1c} являются не единственными недостатками фотоколориметрических методов. Низкая или отсутствие связи между уровнем HbA_{1c} , определенных этими методами, и диабетическим контролем резко ограничивают использование колориметрических методов. Среди этих методов особого внимания может заслужить метод фотоколориметрии после неполного гидролиза с фосфорной кислотой, который, согласно результатам наших исследований, выполняет модель HbA_{1c} . Таким образом главным недостатком существующих методов определения HbA_{1c} является отсутствие возможности применения их для длительного диабетического контроля. То есть современные методы определения HbA_{1c} не годятся для мониторинга СД. А практическим отображением этого является тот факт, что уровень HbA_{1c} регулярно определяют у менее чем 1% больных СД [7]. В связи с этим под сомнение ставится само значение HbA_{1c} и предлагается использование других маркеров. Однако это противоречит международным данным о значении гликированного гемоглобина [17]. Использование HbA_{1c} для контроля СД необходимо, а для определения этого показателя в настоящее время поставлен вопрос о разработке альтернативных, принципиально новых методов определения HbA_{1c} [18]. Существующие методы привлекают низкими коэффициентами воспроизводимости, высокой линейной корреляцией с HPLC. На основании этого выведены предельно допустимые коэффициенты аналитической вариации для гликогемоглобина [19]. Однако воспроизводимость разработанного нами метода лишь частично согласуется со справочными данными. Особенно показательны данные чувствительности метода ИЭФ+ФК. Чувствительность высококонцентрированного альбумина лишь незначительно отличается от чувствительности физиологического раствора. Это может свидетельствовать о том, что различные белки, находящиеся в гемолизате, практически не влияют на определение искомого гемоглобина A_{1c} , что подтверждается исследованием специфичности предлагаемого метода. Возможное присутствие в исследуемых гемолизатах различных белков крови практически не может повлиять на конечный результат разработанного метода, потому что в узком градиенте pH белки, имеющие отличные pI от HbA_{1c} , не будут подвергаться изоэлектрическому фокусированию. Общеизвестно, что сравнение методов является наиболее информативным способом оценки правильности результатов [20]. Согласно международным данным, сравнительным методом для HbA_{1c} является ИОХ. Наши данные показали, что разработанный метод отличается от ИОХ, то есть приводит к иным результатам. Это согласуется с предыдущими нашими исследованиями, подтверждающими принципиально иную ассоциацию с углеводным обменом уровня HbA_{1c} , определенного методом ИЭФ+ФК по сравнению с другими общепринятыми методами [21]. Принципиальным отличием разработанного метода является предварительное выделение фракции HbA_{1c} (в данном случае при помощи изоэлектрофокусирования). Доказанной особенностью методов ИЭФ является изолированное отделение фракции гемоглобина A_{1c} от основной фракции HbA , тогда как другие фракции гемоглобинов при изоэлектрофокусировке не отделяются [22]. Клиническая оценка метода ИЭФ+ФК позволяет по иному взглянуть и на значение самого показателя HbA_{1c} . Данный параметр нужно представлять не просто как индекс длительного гликемического контроля. Результаты данного исследования показали, что содержание HbA_{1c} у доноров без СД может быть выше нормы, а в некоторых случаях даже выше, чем у больных СД. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о значении использования HbA_{1c} при хронических заболеваниях без СД для определения риска при этих патологических состояниях [23]. HbA_{1c} все больше представляется важным прогностическим параметром как на диабетическом, так и на недиабетическом уровнях.

ВЫВОД. Метод ИЭФ+ФК является принципиально иным и альтернативным способом определения HbA_{1c}. Обладая доказанной специфичностью и достаточной чувствительностью, данный метод имеет воспроизводимость по коэффициенту вариации значительно отличающейся от общепринятых норм для HbA_{1c}. А при сравнении методов предлагаемый способ для определения HbA_{1c} не совпадает с ИОХ и наиболее полно на фоне других методов отражает состояние метаболизма у больных СД.

Авторы глубоко благодарны ассистенту кафедры экспериментальной физики Таврического национального университета им. В.И. Вернадского Ляшко Д.А. за помощь, оказанную в подготовке данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lahousen T., Roller R.E., Lipp R.W., Schnedl W.J.* (2002) *Wien. Klin. Wochenschr.*, **114**, 301-305.
2. *Лукичева Т.И.* (1988) *МРЖ*, **XX**(11), 16-19.
3. *Данилова Л.А., Лопатина Н.И.* (1986) *Лаб. дело*, №5, 281-283.
4. *Линник Ю.В.* (1958) Метод наименьших квадратов и основы математико-статистической теории обработки наблюдений. Физматгиз. М.
5. *Bisse E., Abraham E.C.* (1985) *J. Chromatogr.*, **344**, 81-91.
6. *Королев В.А.* (2004) *Клин. лаб. диагн.*, №1, 18-23.
7. *Пархоменко А.Д.* (2000) Клинико-экономическая эффективность внедрения структурированной программы обучения пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Дисс. канд. наук. Москва.
8. *Guidelines for Diabetes Care* (1998) A Desktop Guide to Type 1 Diabetes Mellitus. European Diabetes Policy Group.
9. *Guidelines for Diabetes Care* (1999) A Desktop Guide to Type 2 Diabetes Mellitus. European Diabetes Policy Group.
10. *Phillipov G., Charles P., Beng C., Phillips P.J.* (1997) *Diabetes Care*, **20**, 607-609.
11. *Trivelli L.A., Ranney H.M., Lai H.T.* (1971) *N. Engl. Med. J.*, **284**, 353-357.
12. *Shiba T., Yano M., Maehata E. et al.* (1996) *Diab. Res. Clin. Pract.*, **32**, 175-182.
13. *Пашинцева Л.П., Буданцева Т.А., Троицкая О.В. и др.* (2001) *Клин. лаб. диагн.*, №7, 39-43.
14. *Давыдов А.Л.* (2000) Гемодинамические и метаболические нарушения у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с ИБС. Дисс. докт. наук. Москва.
15. *Middle F.A. et al.* (1983) *Biochem. J.*, **209**, 771-779.
16. *Kopp H.P., Festa A., Hopmeier P., Schernthaner G.* (1996) *Wien. Klin. Woch.*, **108**, 16-19.
17. *Saint Vincent Declaration for Diabetes care and research in Europe.* (1992) *Giorn. Ital. Diab.*, **12**(1), 89-90.
18. *Miedema K.* (1999) *CCLM*, **37**, 60.
19. *Меньшиков В.В.* (2000). Управление качеством клинических лабораторных исследований. Лабпресс. М.
20. *Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н.* (1987) В кн.: *Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. Медицина. М.*, с.10-15.
21. *Королёв В.А., Зинченко О.В., Головская Г.Г.* (2003) *Лаб. диагн.*, №1, 44-47.
22. *Spicer K.M., Allen R.C., Buse M.G.* (1978) *Diabetes*, **27**, 384-388.
23. *Norhammar A., Tenerz A., Nilsson G. et al.* (2002) *Lancet*, **360**(9349), 1978-1979.

Поступила: 15. 09. 2004.

**ISOELECTROFOCUSING AND PHOTOCOLORIMETRY FOR DETERMINATION
OF GLYCATED HEMOGLOBIN (HbA_{1c})**

V.A. Korolev, V.I. Molchanov

Crimea State Medical University, Lenina bul., 5/7, Simferopol, 95006 Ukraine; fax: 27-20-92;
e-mail: v_a_korolev@list.ru

Analytical reliability of a new method for determination of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) has been evaluated. The method is based on hemoglobin isolation during isoelectrofocusing followed by acidic hydrolysis and photolorimetry of furfural formed after its reaction with thiobarbituric acid. At diabetic and non-diabetic levels inter- and intraserial reproducibility varied from 6 to 21%. Sensitivity of this method was determined using physiological solution and 50% albumin.

Key words: glycated hemoglobin assay, electrophoresis (analytical chemistry), pathological hemoglobin.