

А.П. Лихоносова, М.П. Лихоносов

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДІВ, ЗАСТОСОВУВАНИХ ДЛЯ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Санкт-Петербурзький державний медичний університет ім. І.П. Павлова, Санкт-Петербург (Росія)

ВСТУП

У розвинутих країнах розповсюдженість цукрового діабету (ЦД) сягає 5-7% [1]. ЦД називають групу неоднорідних захворювань, для яких загальними є гіперглікемія та порушення толерантності до глюкози, викликані абсолютним (ЦД 1-го типу) або відносним (ЦД 2-го типу) дефіцитом інсуліну, або зниженою ефективністю дії інсуліну, або сукупністю цих причин [2]. ЦД призводить до розвитку гострих і хронічних ускладнень, що спричиняють ранню втрату працездатності та високу смертність. Основними хронічними наслідками діабету є серцево-судинні захворювання (ССЗ), нефропатія, нейропатія, синдром діабетичної стопи та ретинопатія. З віком частота ЦД збільшується, і серед осіб віком 65 років і більше вона складає понад 15% [3]. Водночас відомо, що дійсна захворюваність на ЦД значно більша за статистичну. Встановлено, що співвідношення числа пацієнтів зі встановленим ЦД та осіб із недіагностованим ЦД і латентним ЦД складає 1:2,5:3 [4].

Традиційно для діагностики ЦД найчастіше використовують визначення рівня глюкози у крові. Натомість останніми десятиріччями завдяки певному прогресу у розумінні патогенезу даного захворювання розробляються нові методи ранньої діагностики як самого ЦД, так і маркерів його ускладнень, що поліпшує контроль і дозволяє прогнозувати перебіг ЦД [5]. До їх числа входять визначення рівня глікованого гемоглобіну та мікроальбумінурії. До повсякденної практики дедалі ширше впроваджуються методи біохімічного тестування. Обстеження пацієнта має включати вивчення різних якісних і кількісних показників обміну речовин. Це обґрунтовує необхідність детального висвітлення відомих методів ранньої діагностики та контролю ускладнень ЦД, уточнення цінності кожного з методів і доцільності його вибору.

Мета роботи – порівняльна характеристика існуючих аналітичних методів ранньої діагностики та контролю перебігу ЦД і метаболічного синдрому.

АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ УСКЛАДНЕНЬ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Для діагностики, контролю перебігу, профілактики ускладнень цукрового діабету на практиці використовують визначення рівня глюкози у крові, у сечі, рівня глікованого гемоглобіну та фруктозаміну у крові, виявлення ацетону та білка у сечі вже на стадії мікроальбумінурії. З поглибленням знань про причини розвитку ЦД виникла потреба пошуку імунних маркерів ЦД. З огляду на той факт, що одним з механізмів розвитку ЦД є автоімунний, визначення імунних комплексів застосовують не лише для безпосередньої діагностики та уточнення типу діабету, але й для раннього виявлення автоімунного ураження інсулярного апарату підшлункової залози. Крім того, застосовується методика кількісної оцінки залишкової секреції інсуліну за рівнем С-пептиду.

Наразі виділяють такі антитіла до острівцевого апарату підшлункової залози: ICA (Islet cell antibodies) – антитіла проти антигену цитоплазми клітин острівців Лангерганса, IAA (Insulin autoantibodies) – антитіла до інсуліну, GADA – антитіла до декарбоксилази глютамінової кислоти (ензиму β-клітин), IA-2A (Insulinoma associated 2 autoantibodies) – антитіла до фосфатази білка тирозин, ZnT8 – нещодавно відкритий антиген острівцевого апарату підшлункової залози [6-8].

Все ширше застосовуються методи визначення рівня глікованого гемоглобіну (HbA1c) та мікроальбумінурії (МАУ). Вміст HbA1c відображає концентрацію глюкози у крові за останні 2-3 місяці [9, 10]. Останнім часом точиться дискусія про можливість використання показника HbA1c як критерію ранньої діагностики ЦД у ході скринінгових досліджень [11]. Встановлено, що підвищений рівень HbA1c є маркером ризику ССЗ у хворих на ЦД [12]. Рівень HbA1c є важливою характеристикою ступеня компенсації захворювання [13]. Оптимальна терапія хворих на ЦД вимагає визначення цільових рівнів HbA1c із метою мінімізації як ризику пізніх ускладнень

діабету, так і ризику загрозової для життя гіпоглікемії [14].

Визначення МАУ застосовується для діагностики ранньої, передклінічної стадії діабетичної нефропатії (ДН). У класифікації ДН С.Е. Mogensen (1983 р.) цю стадію визначено як III, початкову (стадію мікроальбумінурії). Надто важливим є те, що за умов адекватного лікування ця стадія ДН є зворотною [15]. Мікроальбумінурія – наявність альбуміну у сечі у кількості 30-300 мг за добу. Виявлення МАУ дозволяє вчасно призначити лікування з метою профілактики прогресування ДН, тобто розвитку хронічної ниркової недостатності [16-18].

Сучасна наука пропонує різні аналітичні методи визначення HbA1c і МАУ:

1. Хроматографія – катіонообмінна хроматографія високого та низького тиску, іонообмінна, афінна, високоефективна рідинна (ВЕРХ).
2. Капілярний електрофорез (КЕ) та електрофокусування.
3. Колориметрія з використанням тіобарбітурової кислоти.
4. Нефелометричний і турбідиметричний аналіз.
5. Імунологічні методи.

Хроматографія – метод розділення речовин і визначення їх фізико-хімічних характеристик, заснований на різниці швидкостей руху та розмивання концентраційних зон досліджуваних компонентів, що рухаються у потоці рухомої фази, причому досліджувані речовини знаходяться в обох фазах. Необхідною умовою розділення є різниця між рухомою та нерухомою фазами у рівноважному розподілі або кінетиці його встановлення для аналізованих сполук. Підґрунтям хроматографічного розділення є участь компонентів розділюваної суміші у складній системі Ван-дер-Ваальсових взаємодій (переважно міжмолекулярних) на межі розділу фаз [18-21].

Рідинна хроматографія (РХ) – вид хроматографії, де рухомою фазою (елюентом) є рідина. Нерухомою фазою може бути твердий сорбент, твердий носій із нанесеною на його поверхню рідиною або гель. Розрізняють колонкову РХ, де крізь колонку, заповнену нерухомою фазою, пропускають порцію розділюваної суміші у потоці елюенту (під тиском або під дією сили тяжіння), та тонкошарову РХ, де елюент рухається під дією капілярних сил по пласкому шару сорбенту, нанесеному на скляну пластину або металеву фольгу, вздовж пористої полімер-

ної плівки, по поверхні циліндричної кварцової або керамічної палички, по смужці хроматографічного паперу. Розроблено також метод тонкошарової РХ під тиском (елюент прокачують крізь шар сорбенту, затиснутого між пластинами) [18-21].

До РХ зазвичай відносять також гідродинамічну хроматографію, де нерухома фаза відсутня. У цьому випадку використовують той факт, що швидкість потоку елюенту є максимальною у центрі порожнього капіляра та мінімальною – біля його стінок, а розділювані компоненти розподіляються між шарами елюенту, що рухаються з різною швидкістю, у відповідності до своїх розмірів або під впливом накладеного у поперечному напрямку зовнішнього силового поля (відцентрового, електричного, магнітного) [18].

Афінна хроматографія – різновид адсорбційної, де зв'язування здійснюється відповідно до специфічних властивостей двох молекул. Взаємодія відбувається за рахунок різних сил: іонних, водневих, гідрофобних тощо залежно від конформації та розміру молекул. В афінній хроматографії використовується нерозчинний носій, на якому іммобілізується сполука, що її називають лігандом. Він певним чином зв'язує досліджувану сполуку, що перебуває у рухомій, зазвичай рідкій фазі. Ліганд утримується за рахунок ковалентних зв'язків, іноді використовують іонний обмін, адсорбцію тощо. Розчин, у якому містяться молекули, вступає у контакт із нерухомих лігандом. З усіх речовин утримуються ті, чий молекули здатні з'єднуватися з лігандом. Розрив зв'язків може відбуватися за рахунок дії агента, що зв'язується з молекулою замість ліганду, або агента, здатного зв'язуватися з лігандом замість молекули [18-21].

Колориметричний метод засновано на утворенні забарвленого комплексу продуктів гідролізу фруктози з тіобарбітуровою кислотою (тіобарбітуровий метод після кислотного гідролізу).

У **нефелометричному та турбідиметричному аналізі** використовується явище розсіяння світла твердими часточками, що перебувають у розчині у стані зависі [18-21]. Пробу освітлюють потоком світла з інтенсивністю I_0 , а потім, як і у молекулярній абсорбційній спектроскопії, вимірюють інтенсивність випромінювання, що пройшло, I_t , або визначають інтенсивність випромінювання, розсіяного під певним кутом (наприклад, 190° за 90°). Зі зростанням числа частинок у суспензії відношення I_t/I_0 зменшується, а відно-

шення типу I90/10 збільшуються, принаймні до помірних концентрацій. Для дуже розбавлених суспензій вимірювання під кутом є значно чутливішим, ніж вимірювання, коли джерело та приймач випромінювання розташовано на одній лінії, оскільки у першому випадку можна спостерігати слабе розсіяне світло на темному тлі.

Метод, у якому використовують інтенсивність світла, що пройшло, I_t , зветься турбідиметрією, а метод із вимірюванням під кутом 90° (або якимось іншим) – нефелометрією. Для турбідиметричних вимірювань можна використовувати будь-який фотометр або спектрофотометр. Якщо розчинник і розсіюючі частинки безбарвні, максимальна чутливість досягається з використанням випромінювання блакитної або ближньої ультрафіолетової ділянки. Для забарвлених систем оптимальну довжину хвилі необхідно добирати експериментально.

Конструкції приладів для нефелометричних і люмінесцентних вимірювань є ідентичними, тому будь-який флуорометр можна використовувати як нефелометр. Багато серійних флуорометрів оснащено спеціальними пристосуваннями для нефелометричних вимірювань. Недоліком методів, заснованих на вимірюваннях розсіяння світла, є наявність сильного впливу розміру часточок на вимірюваний сигнал. Через це необхідно суворо дотримувати ідентичності умов побудови градуовального графіка та аналізу досліджуваного розчину. Можна сказати, що і нефелометрія, і турбідиметрія можуть бути корисними для селективних аналітичних реакцій, внаслідок яких утворюється тверда сполука [18-21].

Імунохімічні методи визначення глікованого гемоглобіну ґрунтуються на імуноінгібуванні латексної аглютинації з моноклональними антитілами до HbA1c. Результати цих реакцій у подальшому аналізуються турбідиметричним або колориметричним методами. Набори складаються з рідких, цілком готових до використання, стабільних реагентів. В основі визначення антитіл наборами реагентів лежить їх взаємодія з антигенами з утворенням імунних комплексів, відповідно до чого змінюється оптична щільність реакційного середовища [18]. Набори легко адаптуються до всіх автоматичних і напівавтоматичних аналізаторів [19-21, 35].

ВЕРХ

2001 року Міжнародна федерація клінічної хімії (IFCC) у складі робочої групи зі стандарти-

зації лабораторних методів визначення HbA1c затвердила ВЕРХ (HPLC, High performance liquid chromatography), яку ще називають хроматографією високого тиску, і КЕ як референтні методи [22].

ВЕРХ – різновид РХ, використовує принцип розділення компонентів суміші, що ґрунтується на різниці у рівноважному розподілі їх між двома фазами, рухомою та нерухомою, які не змішуються (система Ван-дер-Ваальсових взаємодій).

2011 року виповнилося 110 років з часу відкриття методу РХ російським вченим М.С. Цветом. 1901 року він запропонував для розділення на складові рослинних пігментів (хлорофілу) колонки, заповнені порошком крейди [23-24].

ВЕРХ дозволяє досліджувати складну суміш розділяти на відносно прості складові, що їх далі вже легше проаналізувати за допомогою звичайних фізико-хімічних або спеціально створених для хроматографії методів. У ВЕРХ використовують колонки діаметром до 5 мм, щільно упаковані сорбентом із частками малого розміру (1,8-10 мкм), і тиск до 400 бар. Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко та цілком (час аналізу – від 3 до 30 хв.). Варіанти ВЕРХ – мікроколонкова хроматографія на наповнених колонках малого діаметра та капілярна хроматографія на порожніх і наповнених сорбентом капілярних колонках. За механізмом розділення досліджуваних речовин ВЕРХ буває адсорбційною, розподільною, іонообмінною, ексклюзійною, лігандообмінною. Слід мати на увазі, що розділення часто йде не за одним, а за декількома механізмами одночасно, чого на практиці намагаються уникати. Так, ексклюзійне розділення може ускладнюватися адсорбційними ефектами, адсорбційне – розподільчими і навпаки. Що більше різняться речовини у пробі за ступенем іонізації, основності або кислотності, за молекулярною масою, поляризованістю та іншими параметрами, то більша ймовірність прояву іншого механізму розділення таких речовин [18-21].

У ході ВЕРХ крізь колонку із сорбентом прокачується рідина (елюент) певного складу з постійною швидкістю. До потоку елюенту вводять точну дозу досліджуваного матеріалу. Швидкість складових різна, тому на виході вони з'являються у різний час, що і використовується для їх розділення. Тобто, використовуючи різні колонки, можна керувати ступенем розділення досліджуваного матеріалу. Задачею детектора є кількіс-

не вимірювання виявлених складових вихідної проби. У хроматографічній системі можуть використовуватися різні типи детекторів [25].

Переваги ВЕРХ:

- ВЕРХ з електрохімічним детектуванням дозволяє знаходити та ідентифікувати на рівні слідових кількостей біологічно активні сполуки у біологічних рідинах, визначати біогенні аміни, лікарські препарати у біологічних рідинах, здійснювати аналіз фенолів, вітамінів, іонів, амінокислот;

- має високу чутливість і розрішення, тобто за рахунок зменшення внутрішнього діаметра РХ-колонок дозволяє аналізувати мінімальні об'єми проб і наднизькі кількості речовин;

- широкий спектр вирішування дослідницьких завдань завдяки використанню колонок різної довжини. Зокрема, застосування колонок малої довжини (15-50 мм) із високодисперсними сорбентами (1,8 мкм) дає можливість використовувати більшу температуру та робочий тиск, що забезпечує значно більшу швидкість збирання даних (час аналізу 1-2 хв.), а також успішне впровадження методів паралельної регенерації колонок у процесі аналізу (нова царина швидкісної РХ – RRLC). Водночас застосування довгих колонок (50-300 мм) дозволяє суттєво (на 60% і більше) збільшити хроматографічне розрішення.

Недоліки ВЕРХ:

- значні фінансові затрати;
- не завжди можна застосовувати для масових скринінгових досліджень.

Відомо, що у крові людини, поруч з основною фракцією гемоглобіну (HbA), міститься незначна кількість інших фракцій, "мінорних": HbA1a (з фруктозою), HbA1b (із глюкозо-6-фосфатом), HbA1c (із глюкозою). У здорових дорослих частка HbA складає 90%, HbA1a – 1,6%, HbA1b – 0,8%, HbA1c – 3,6%, HbF – 0,5% [26]. Натомість лише концентрація HbA1c є прямо пропорційною середній концентрації глюкози у крові. У здорових вміст HbA1c у крові складає 4-6%, у некомпенсованих хворих на цукровий діабет його рівень може бути у 2-3 рази вищим. HbA1c, що утворюється, акумулюється в еритроцитах і зберігається впродовж всього терміну життя останніх. Напівперіод циркуляції еритроцита у кров'яному руслі складає 60 днів, тобто концентрація HbA1c відображає середню глікемію за останні 60-90 днів [27, 28]. Величезна кількість досліджень із використанням традиційних

методів вимірювання вмісту глюкози у крові підтвердили зв'язок рівня HbA1c і глікемії [28-32].

Метод визначення вмісту HbA1c ґрунтується на афінній хроматографії. Сорбент, що заповнює колонки, забезпечує на першому етапі специфічне зв'язування HbA1c (фракція Б) і його відділення від неглікованих молекул (фракція А). На другій стадії здійснюється цілковите витискання глікованої фракції за рахунок вимивання із сорбенту розчинником. За вимірними оптичними щільностями обох фракцій (довжина хвилі – 414 нм) можна обчислити вміст HbA1c у зразку крові за формулою:

$$[HbA_{1c}] = \frac{A_B}{A_B + 2,04A_A} 100\%,$$

де A_A – оптична щільність фракції А, A_B – оптична щільність фракції Б, 2,04 – коефіцієнт перерахунку, що залежить від об'єму фракцій А і Б [33].

Метод капілярного електрофорезу

Метод капілярного електрофорезу (КЕ), відомий також як капілярний зональний електрофорез (англ. CZE), ґрунтується на розділенні компонентів складної суміші у кварцовому капілярі під дією електричного поля. Мікрооб'єм аналізованого розчину вводять у капіляр, попередньо заповнений придатним буфером – електролітом. Після прикладання до кінців капіляру високої напруги (до 30 кВ) компоненти суміші починають рухатися капіляром із різною швидкістю, що залежить насамперед від заряду та маси (точніше – величини іонного радіусу) та, відповідно, у різний час досягають зони детектування. Отримана послідовність піків зветься електрофореграмою, якісною характеристикою речовини є параметр утримання (час міграції), а кількісною – висота або площа піку, пропорційна концентрації речовини [18-21]. Устаткування для проведення КЕ складається з ємності для зразка, стартового та кінцевого флаконів, капіляру, електродів, джерела живлення, детектора та аналізатора даних [36]. Найчастіше використовують пристрої, що вимірюють поглинання в ультрафіолетовій або ділянці видимого світла [37].

Детекцію шляхом **флуоресценції** може бути використано у капілярному електрофорезі зразків, які мають природну флуоресценцію, або хімічних модифікацій з флуоресцентними мітками. Такий спосіб детекції забезпечує високу чутливість, проте його неможливо використовувати для визначення зразків, які не флуоресцію-

ють. Використовують також детекцію флуоресценції, спричиненої лазером, такі системи капілярного електрофорезу дають можливість детекції у межах від 10-18 до 10-21 моль.

Для того, щоб відрізнити подібні зразки, системи розділення капілярним електрофорезом можуть бути прямо зв'язані з мас-спектрометрами. У більшості таких систем кінець капіляра вміщують у прилад для електроаерозольної іонізації. Іонізовані частки далі аналізують мас-спектрометрією [37].

Молекули можливо розділяти капілярним електрофорезом внаслідок їх відмінностей у рухомості у прикладеному електричному полі, оскільки електричне поле діє лише на заряджені молекули, незаряджені молекули слабо розділяються капілярним електрофорезом (недолік методу).

Швидкість переміщення молекул, що аналізуються, під час капілярного електрофорезу залежить від величини електроосмотичного потоку в буфері. У загальному випадку електроосмотичний потік спрямований у напрямку до негативно зарядженого катода. Молекули, відмінні за електрофоретичними рухомостями, рухаються до протилежно зарядженого електрода [37]. Негативно заряджені частки рухаються до позитивно зарядженого анода, позитивно заряджені – до катода у напрямку електроосмотичного потоку (рис. 1).

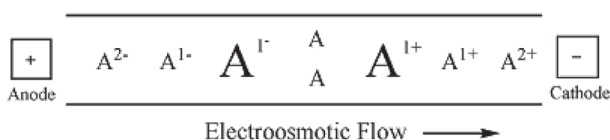


Рис. 1. Розділення заряджених і незаряджених молекул (A) відповідно до їх електрофоретичної та електроосмотичної рухомості.

Оскільки електроосмотичний потік буферного розчину зазвичай більший за електрофоретичний потік речовин, що аналізуються, усі досліджувані молекули переміщуються з буферним розчином до катода. Негативно заряджені молекули довше затримуються у капілярі у зв'язку з протиріччями у їх електрофоретичних рухомостях [37]. Порядок переміщення заряджених молекул наведено на рис. 1: невеликі катіони переміщуються швидко, малі багаторазово заряджені аніони дуже затримуються [36].

Ефективність шляхом капілярного електрофорезу, як правило, значно вища, ніж ефектив-

ність інших методів розділення, наприклад, рідинної хроматографії високого тиску. На відміну від РХВТ, у разі капілярного електрофорезу відсутнє перенесення мас між фазами [36]. Профіль потоку у випадку систем електроосмотичного потоку є пласким, на відміну від ламінарного профілю хроматографічних колонок, у яких розділення здійснюється під тиском. Внаслідок цього під час електроосмотичного розділення не відбувається розширення смуг, як під час хроматографії [37].

Розділення за допомогою капілярного електрофорезу ґрунтується на відмінностях в електрофоретичних рухомостях розділюваних молекул. Але деякі класи молекул не можуть бути розділеними, оскільки є незарядженими або незначно відрізняються за електрофоретичною рухомістю. Додавання поверхнево-активних речовин полегшує розділення незаряджених молекул. Заряджені полімери, наприклад, ДНК, можуть бути розділеними у капілярах, заповнених гелем; гель значніше уповільнює довші молекули, ніж коротші. Такий варіант капілярного електрофорезу називають капілярним гель-електрофорезом.

КЕ має низку переваг у порівнянні з ВЕРХ:

- висока **ефективність** розділення, обумовлена **пласким профілем** електроосмотичного потоку (кількість теоретичних тарілок сягає 1.000.000);

- **економічність**, оскільки практично не потрібно застосування дорогих високочистих розчинників (ацетонітрил, метанол, гексан) і низькі витрати реактивів; відсутність дорогих хроматографічних колонок;

- відсутність дорогих насосів високого тиску, необхідних для ВЕРХ;

- об'єми проби можуть становити усього лише 100 мкл;

- простота апаратного оформлення;
- відсутність твердого сорбенту в капілярі виключає можливість його "старіння", хімічної та фізичної деструкції і будь-якого неспецифічного зв'язування з ним компонентів проби;

- **швидкість** проведення аналізу (експрес-діагностика).

Ці переваги зумовлюють широке використання КЕ для **аналізу об'єктів довкілля**. Найчастіше КЕ застосовують для визначення катіонів та аніонів у водах. Слід зазначити, що розділення однієї й тієї ж суміші аніонів КЕ вимагає суттєво менше часу, ніж ВЕРХ.

Недоліки методу KE:

- метод непридатний для розділення неза-ряджених молекул та молекул, які незначно від-різняються за електрофоретичною рухомістю;
- флуоресценція, що використовується для детекції, придатна лише для речовин з природ-ною флуоресценцією, або змушує додатково виконувати хімічну модифікацію з введенням флуоресцентних міток. Такий спосіб детекції забезпечує високу чутливість, але не може бути використаним для дослідження зразків, які не флуоресціюють.

Порівняймо KE з іншими методами.

Метод **радіальної імунодифузії** є найпрос-тішим і відносно недорогим. Проте він не діс-тав значного поширення у зв'язку з тривалим інкубаційним періодом, що виключає можливість його використання для діагностики невідклад-них станів.

Радіоімуний метод є чутливим і відносно недорогим. Але наразі використовується рідко, оскільки реактиви для нього містять ізотоп йоду з відносно коротким періодом напіврозпаду і, отже, обмеженим терміном придатності.

Імунотурбідиметрія є одним з варіантів фо-тометричного аналізу, основою якого є вимірю-вання величини світлопоглинання завислими у розчині частками. Досліджувані білки утворю-ють комплекси з відповідними антитілами, по-ліетиленгліколь прискорює їх утворення. Вели-чину світлопоглинання розчину, обумовлену утворенням часток, вимірюють спектрофотомет-рично за довжини хвилі 340 нм і використовують для визначення концентрації досліджуваного білка.

На цей час багато зарубіжних виробників ви-пускають набори реактивів, адаптовані до сучас-них високопродуктивних біохімічних аналізаторів. Крім цього, на ринок вийшли невеликі за розмі-рами і зручні у використанні аналізатори, при-стосовані до визначення різних індивідуальних білків за допомогою імунотурбідиметрії. Для під-вищення чутливості методу використовують ан-титіла, пов'язані з частками латексу (latex enhan- ced immunoturbidimetry). Усі перераховані вище методи мають високу чутливість та специфічність, добір конкретного методу визначається аналітич-ними та, більшою мірою, фінансовими можли-востями лабораторії. Широкому використанню кількісних методів визначення окремих білків перешкоджає їх висока вартість.

Простішими у виконанні є скринінгові тести,

які належать до розряду якісних або напівкіль-кісних. Ці тести ґрунтуються на візуальній оцінці характеру аглютинації часток латексу, вкритих антитілами проти досліджуваного білка. Осно-вою методу є реакція аглютинації, яку запускає формування численних зв'язків між антитілами та антигенами з кількома антигенними детермі-нантами. Це дозволяє молекулам антитіл зв'яза-тися не лише з кількома зв'язуючими ділянками на окремій частці, але й з такими ж ділянками на сусідніх частках. Утворюється складна ґрат-часта тривимірна структура з високою молеку-лярною масою, що приводить до утворення ве-ликих комплексів та випадіння їх в осад у ви-гляді пластівців. До чинників, які впливають на швидкість аглютинації, а отже, і на точність цього методу, належать: розмір часток, тип антитіл, концентрація електролітів, в'язкість середови-ща, концентрація реагентів, локалізація та кон-центрація антигенних детермінантів, час і тем-пература інкубації. Тому слід мати на увазі, що реагенти, які використовуються в реакціях ла-текс-аглютинації, менш стандартизовані, ніж реагенти, застосовувані в сучасних "закритих" аналітичних системах.

Рання діагностика ДН, заснована на визна-ченні МАУ, проводиться такими методиками.

Основним у клініці методом визначення мік-роальбумінурії є імунотурбідиметричний.

У скринінгу для виявлення мікроальбумінурії припустимо використовувати спеціальні тест-смужки. Але у разі позитивного результату з цими тест-смужками необхідно згодом підтвер-дити наявність мікроальбумінурії за допомогою кількісних або напівкількісних методів визначення екскреції альбумінів із сечею.

Для напівкількісної експрес-оцінки ступеня мікроальбумінурії застосовують індикаторні тест-смужки. Звичайно візуальне калібрування кольорової гама передбачає такі варіанти визначення альбумінурії тест-смужками: (1) "альбумін у сечі не визначається"; (2) "сліди альбумінів" (близько 150 мг/л); (3) 300 мг/л; (4) 1000 мг/л; (5) 2000 мг/л; (6) понад 2000 мг/л. Мікроальбумінурією вважають рівень екскреції альбумінів із сечею, не вищий за 300 мг/л, а макроальбумінурією – не вищий за 1000 мг/л. Чутливість і специфічність таких тестів досяга-ють 90%.

Для кількісної оцінки мікроальбумінурії існу-ють такі основні методи:

- 1) прямий імунотурбідиметричний;

2) непрямий, заснований на існуванні сильної кореляції між вмістом у сечі креатиніну та альбуміну;

3) імунохімічний за допомогою різних систем.

Прямий імунотурбідиметричний метод ґрунтується на реакції людського альбуміну зі специфічним антитілом, за якої у присутності етиленгліколю відбувається швидка преципітація імунних комплексів; за наявності значного надлишку антитіла преципітат викликає турбідність (поглинання світла), ступінь якої залежить від концентрації альбуміну в досліджуваному зразку (турбідність вимірюють фотометрично за довжини світлової хвилі 340 нм). Вміст альбуміну в досліджуваному зразку визначають за калібрувальною кривою, яку будують згідно з результатами визначення концентрації альбуміну із застосуванням набору калібраторів. Калібрувальною кривою користуються або безпосередньо графічно, або за допомогою спеціальної комп'ютерної програми. Вміст альбуміну, визначений у другій після ранкової 3-годинної порції сечі, множать на 8 для отримання вмісту альбуміну в добовій сечі. Норма екскреції альбуміну за визначення його даним методом становить 25 мг/добу. Мінімальна концентрація альбуміну, яку можливо визначити, становить 5 мг/л.

Концентрацію альбуміну в сечі за вмістом у ній креатиніну визначають, якщо неможливо використати імунотурбідиметричний метод. Рівень креатиніну в сечі визначають відомими методами. Вміст альбуміну розраховують за формулою $МАУа = (Са/Ск \times 5,65) / 1000$, де МАУа – екскреція альбуміну (мкг на 1 мг креатиніну), Са – концентрація альбуміну (мг/л), Ск – концентрація креатиніну (мкмоль/л), 5,65 і 1000 – перевідні коефіцієнти (норма – до 40 мкг/мг). Чутливість і специфічність імунотурбідиметричного методу наближаються до 100%; відповідні характеристики креатинінового методу лише ненабагато нижчі.

Імунохімічний метод ґрунтується на імунохімічній реакції за участю специфічних антитіл. Комплекс антиген-антитіло утворює осад, кількість якого вимірюється фотометрично у діапазоні 610 нм. Такі системи складаються з фотометра, трансформатора та мікрокувети. Мікрокувета містить висушений шляхом заморожування реактив, необхідний для аналізу. Відбір сечі в мікрокувету здійснюється під дією капілярних сил. Перевагою таких систем є

наявність фабричного калібрування, кількісне визначення мікроальбуміну в сечі, швидке (у межах 90 секунд) отримання результатів, що дозволяє вважати імунохімічний метод експрес-методом, який до того ж не вимагає жодного додаткового обладнання, має високу точність, чутливість і специфічність і потребує мінімального обслуговування [40-43].

ВИСНОВКИ

1. Референтними методами контролю визначення HbA1c є метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) і метод капілярного електрофорезу.

2. Основним методом визначення мікроальбуміну в сечі є імунохімічний метод, він не вимагає додаткового обладнання, має високу точність, чутливість і специфічність і потребує мінімального обслуговування.

3. Вибір методу залежить від поставленого перед дослідником завдання:

– за необхідності високоточного інформативного методу перевагу слід віддати ВЕРХ,

– за необхідності швидкості й точності найкращим можна вважати метод капілярного електрофорезу,

– у разі скринінгових малобюджетних досліджень доцільно обрати портативні імунохімічні методи.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Всемирная* організація здравоохранения, шестьдесят первая сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения, Женева, 18 января 2007 года, 61/225(WHA42/1989/REC/1).
2. *Harris M., Zimmet P.* Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. In Alberti K., Zimmet P., Defronzo R., editors. International Textbook of Diabetes Mellitus. Second Edition. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, 1997. – P. 9-23.
3. *Сахарный диабет в России: проблемы и решения.* Издание Международного форума "Объединиться для борьбы с диабетом" 21.11.2008 год.
4. *Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М.* Лечение сахарного диабета и его осложнений: Учеб. пособие. – М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. – 512 с.
5. *Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А.* Федеральная целевая программа "Сахарный диабет". – Москва, 2002. – 84 с.
6. *Sacks D.B., Bruns D.E., Goldstein D.E., MacLaren N.K., McDonald J.M., Parrott M.* Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mel-

- litus // *Clinical Chemistry*. – 2002. – Vol. 48. – P. 436-472.
7. *Verge C.F., Gianani R., Kawasaki E., Yu L., Pietropaolo M., Jackson R.A. et al.* Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies // *Diabetes*. – 1996. – Vol. 45. – P. 926-933.
 8. *Wenzlau J.M., Juhl K., Yu L., Moua O., Sarkar S.A., Gottlieb P., Rewers M., Eisenbarth G.S., Jensen J., Davidson H.W., Hutton J.C.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104(43). – P. 17040-17045.
 9. *Gonen B.A., Rubinstein A.H., Rochman H. et al.* Hemoglobin A1: An Indicator of the Metabolic Control of Diabetic Patients // *The Lancet*. – 1977. – Vol. 2(804). – P. 734-737.
 10. *Koenig R.J., Peterson C.M., Kilo C. et al.* Hemoglobin A1c as an Indicator of the Degree of Glucose Intolerance in Diabetes // *Diabetes*. – 1976. – Vol. 25(3). – P. 230-232.
 11. *Anand S., Razak F., Vuksan V., Gerstein H., Malmberg K., Yi Q., Teo K., Yusuf S.* Diagnostic Strategies to Detect Glucose Intolerance in a Multiethnic Population // *Diabetes Care*. – 2003. – Vol. 26. – P. 290-296.
 12. *Nakanishi S., Yamada M., Hattori N., Suzuki G.* Relationship between HbA(1)c and mortality in a Japanese population // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48(2). – P. 230-234.
 13. *Санкт-Петербург // Регионы России. Основные социально-экономические показатели городов*. – 2007. – С.140-141.
 14. *Питерс-Хармел Э., Матур Р.* Сахарный диабет. Диагностика и лечение. – Практика, 2008. – 156 с.
 15. *Балаболкин М.И.* Диабетология. – М.: Медицина, 2000. – С. 420-439.
 16. *Попова Ю.С.* Сахарный диабет. – Крылов, 2008. – 220 с.
 17. *Остапенко В.А., Фирстова Л.П., Елисеева И.П., Елисеева Л.Н., Николаев Н.А., Колбина М.В., Елисеев П.Н., Фирстов Д.А.* Оптимизация определения стабильной фракции гликозилированного гемоглобина HbA1c методом индексации суммарной фракции гликозилированного гемоглобина HbA1 // *Фундаментальные исследования*. – 2008. – №6. С. 26-33.
 18. *Васильев В.П.* Аналитическая химия. В 2 ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1989. – 384 с.
 19. *Сакодынский К.И. и др.* Аналитическая хроматография. – М.: Химия, 1993. – 254 с.
 20. *Берштейн И.Я., Каминский Ю.Л.* Спектрофотометрический анализ в органической химии. – Л.: Химия, 1986. – 187 с.
 21. *Медицинская биохимия: Лабораторный практикум (для студентов III курса специальности "Медицинская физика")* / сост.: Е.В. Бескровная, Е.Ю. Мосур, В.И. Ямковой / под ред. проф. Н.А. Семиколеновой. – Омск: Изд-во ОмГУ, 2005. – 76 с.
 22. *Jeppsson J.-O. et al.*, Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2002. – Vol. 40. – P. 78-89.
 23. *Цвет М.С.* Физико-химическое строение хлопчатого зерна. Экспериментальное и критическое исследование // *Труды Казанского общества естествоиспытателей*. – 1901. – Т.35, №3. – С. 268.
 24. *Сайт НИИ СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.* Режим доступа: <http://www.spb-gmu.ru/content/view/666/377/>
 25. *Карпищенко А.И (ред.)* Справочник медицинские лабораторные технологии. 1-2 т. – СПб, 1988.
 26. *Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. Меньшикова В.В.* Том III – Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. – М.: Лабпресс, 2000. – 278 с.
 27. *DCCT Research Group.* The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long – Term Complications in Insulin – Dependent Diabetes Mellitus // *Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 329. – P. 977-986.
 28. *ADA.* Implications of the United Kingdom Prospective Diabetes Study (Position Statement) // *Diabetes Care*. – 1999. – (SI). – P. 27-31.
 29. *Little R.R., England J.D., Wiedmeyer H.M. et al.* Interlaboratory Standardization of Glycated Hemoglobin Determinations // *Clin. Chem.* – 1986. – Vol. 32. – P. 358-360.
 30. *Little R.R., England J.D., Wiedmeyer H.M. et al.* Interlaboratory Comparison of Glycated Hemoglobin Results: College of American Pathologists (CAP) Survey Data // *Clin. Chem.* – 1991. – Vol. 37. – P. 1725-1729.
 31. *Little R.R., England J.D., Wiedmeyer H.M. et al.* Interlaboratory Standardization of Measurements of Glycohemoglobin // *Clin. Chem.* – 1992. – Vol. 38. – P. 2472-2478.
 32. *Goldstein D.E., Little R.R.* Bringing Order to Chaos: Standardizing the Hemoglobin A1c Assay // *Contemp Int. Med.* – 1997. – Vol. 9(5). – P. 27-32.
 33. *Медицинская биохимия: лабораторный практикум (для студентов III курса специальности "Медицинская физика")* / сост.: Е.В. Бескровная, Е.Ю. Мосур, В.И. Ямковой / под ред. проф. Н.А. Семиколеновой. – Омск: Изд-во ОмГУ, 2005. – 76 с.
 34. *Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1C Measurement.* Consensus Committee // *Diabetes Care*. – 2007. – Vol. 30(9). – P. 2399-2400.
 35. *Сакодынский К.И. и др.* Аналитическая хроматография. – М.: Химия, 1993. – 219 с.
 36. *Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R.* Principles of

- Instrumental Analysis. 6th ed. Chapter 28 Thomson Brooks / Cole Publishing: Belmont, CA, 2007. – 178 p.
37. *Skoog, D.A., Holler F.J., Crouch S.R.* Principles of Instrumental Analysis 6th ed. Chapter 30 Thomson Brooks/Cole Publishing: Belmont, CA, 2007. – 178 p.
 38. *Бутолин Е.Г., Иванов В.Г.* Клиническая информативность показателей биологических жидкостей организма (Справочное пособие). – Ижевск: Экспертиза. 1998. – 112 с.
 39. *Колб В.Г., Камышников В.С.* Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 189 с.
 40. *Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е.А. Кост.* – М.: "Медицина", 1975. – 124 с.
 42. *Морозова В.Т., Миронова И.И., Марцишевская Р.Л.* Исследование мочи – М.: РМАПО, 1996. – 47 с.
 43. *Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. Меньшикова В.В.* Том III – Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. – М.: Лабпресс, 2000. – 158 с.

РЕЗЮМЕ

Сравнительный анализ методов, применяемых для ранней диагностики сахарного диабета
А.П. Лихоносова, Н.П. Лихоносов

В лекции приведена сравнительная оценка различных аналитических методов диагностики и контроля течения сахарного диабета и метаболического синдрома, в частности методов определения гликемии, глюкозы в моче, гликированного гемоглобина и микроальбуминурии.

Ключевые слова: сахарный диабет, лабораторная диагностика.

SUMMARY

Comparative analysis of methods for early diagnostics of diabetes mellitus
A. Likhonosova, N. Likhonosov

Lecture shows comparative study of various analytical methods of diagnostics and treatment control of diabetes mellitus and metabolic syndrome such as methods of evaluation of glycemia, glucose in urine, glyated haemoglobin and microalbuminuria.

Key words: diabetes mellitus, laboratory diagnostics.

Дата надходження до редакції 13.12.2011 р.