

УДК 616.379-008.64:547.963

В.А.Королёв

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА**

Крымский государственный медицинский университет, г. Симферополь

Проблема обнаружения и учета гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) всегда была связана с выбором метода его определения. При этом существует довольно большое число способов его выявления. Для его определения используют различные приемы — в основном это колориметрические, хроматографические, электрофоретические, радиоиммунологические и др. По данным одних авторов этих способов существует более 20 [17], по данным других — более 30 [13]. Существующие методы определения HbA_{1c} могут быть разделены на три группы.

Первая группа включает методы, основанные на различии электрического заряда молекул гликозилированного и негликозилированного гемоглобина. Например катион-обменная хроматография (КОХ) [12] и хроматография под высоким давлением (HPLC) [25], электрофорез в агаровом геле [12], изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) [24]. Вторая группа включает приемы, основанные на структурном различии между гликированными и негликированными компонентами. Например, борнат-аффинная хроматография [18] и иммунологический способ [10,15]. Третья группа включает методы, которые основаны на химической реактивности HbA_{1c}. Это фотоколориметрические методы (ФК) [4, 25]. Определение HbA_{1c} предлагается как индекс средней глюкозы крови как у больных сахарным диабетом 1 типа (СД1), так и сахарным диабетом 2 типа (СД2).

Цель настоящего исследования сравнить основные методы определения HbA_{1c} из разных групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследован 731 больной. Среди обследованных были 442 больных СД, 228 больных СД1

и 214 больных СД2. Кроме этого обследованы доноры и больные с различными заболеваниями с отсутствием явного СД (всего 289 человек) (табл. 1).

Таблица 1

Распределение обследованных больных с отсутствием явного сахарного диабета

Больные стационара	47
Больные с ИБС и гипертонической болезнью	12
Больные с гепатитами и циррозами печени	6
Больные с хроническими гломеруло-нефритами	11
Больные в отделении реанимации и интенсивной терапии	9
Больные санаториев	133
Больные с ИБС и ГБ	113
Больные с хроническими бронхитами	6
Больные с нейроциркуляторной астенией	2
Больные с ревматоидными артритами	12
Больные с неуточненным СД	92
Доноры со станции переливания крови	17
Всего	289 больных

Для определения уровня HbA_{1c} использовали следующие методы:

1. Метод ИЭФ в капилляре [5].
2. Метод катион-обменной хроматографии на микроколонках [12].
3. Метод HPLC под высоким давлением [25].
4. Метод борнат-аффинной хроматографии (Abbott) [18].
5. Метод ФК с использованием неполного гидролиза гликированного белка шавелевой кислотой [1].
6. Метод ФК с использованием неполного гидролиза гликированного белка соляной кислотой [2].
7. Метод ФК с использованием неполного гидролиза гликированного белка фосфорной кислотой [1].

Кроме этого определяли уровень гликемии натощак (преГл), гликемии после еды (постГл),

гликемии в 12 часов (Гл12), в 17 часов (Гл17), в 21 час (Гл21) по цветной реакции с ортотолуидиновым реактивом и глюкозооксидазным методом, уровень мочевины крови (МК) определяли диацилмонооксимным методом, уровень креатинина крови (КК) — методом Поппера. Уровень калиемии (K^+) и натриемии (Na^+) сыворотки крови определяли методом пламенной фотометрии. Фибронектин (Ф-н) плазмы определяли весовым методом. Уровень общего билирубина (БК) определяли методом Ендрасика—Грофа. Уровень общего белка сыворотки крови (ОБС) определяли биуретовой реакцией, активность амилазы крови (АМК) — методом Каравея. Время свертывания крови (ВСК) определяли на основании времени образования сгустка венозной крови. Осмолярность плазмы (ОП) определяли при помощи осмометра ОМКА ТЦ-01. Уровень общего холестерина сыворотки крови (ОХС) определяли методом Илька, уровень β -липопротеидов — турбодиметрическим методом. Кроме этого определяли уровень альбумина сыворотки крови (СА), альфа 1-глобулинов (α_1 -гл), альфа 2-глобулинов (α_2 -гл), бета-глобулинов (β -гл) и гамма глобулинов (γ -гл) — электрофорезом сыворотки крови на бумаге, С-реактивного белка (Срб), серомукоидов (СРМ), СОЭ, гематокрит (Нт), хлоридов (Cl^-), протромбинового индекса (ПТИ), активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), азота мочевины (N), а также гаптоглобин (Г-н) [7]. ССЭ определяли методом, основанном на представлении об эритроците как об универсальном адсорбенте.*

Для проведения изоэлектрического фокусирования в капилляре использовали полиакриламидный гель с узким градиентом концентрации ионов водорода (рН), соответствующем изоточке (рI) HbA_{1c} . Вначале готовили исходный трисборатный буфер — 0,01 М борная кислота и трис (оксиметил) аминометан $C_4H_{11}O_3N$ до рН 7,8–8,0.

* В статье также используются следующие сокращения: ИМТ — индекс массы тела; СГ — глюкозурия за сутки; СП — протеинурия; ССЭ — сорбционная способность эритроцитов; ФВ — фракция выброса; фн — уровень фибриногена в крови; ХГН — хронический гломерулонефрит; DCCT — The Diabetes Control and Complications Trial (исследование по контролю диабета и его осложнений); F_{exp} — критерий Фишера в эксперименте; рI — изоточка; R^2 — коэффициент детерминации; UKPDS — United Kingdom Prospective Diabetes Study (Великобританское проспективное исследование диабета).

Потребуется 1,5–2 литра данного буфера. Далее готовили два раствора в тёмных сосудах — **раствор № 1:** к 100 мл исходного буфера добавляли 4 мг рибофлавина и 0,04 мл темеда, перемешивали встряхиванием; **раствор № 2:** к 600 мл исходного буфера добавляли 24 мл раствора № 1 и 0,24 мл темеда, перемешивали встряхиванием. Затем готовили 2 градиентных раствора объёмом 50–100 мл в тёмных сосудах. Для этого проводили титрование глицерина (ЧДА или ХЧ) в раствор № 2 до рН 7,3 (градиентный раствор № 1) и рН 7,2 (градиентный раствор № 2). В градиентные растворы добавляли акриламид и метиленакриламид из расчёта 68 и 2,03 мг на 1 мл раствора, перемешивали встряхиванием. Хранили при температуре $+1...+4^\circ C$ в холодильной камере. Перед исследованием градиентные растворы согревали при комнатной температуре. Затем брали капилляры размером 60×1 мм и заполняли их поочерёдно градиентным раствором № 1 и № 2, при этом в начале капилляра оставляли немного места для внесения исследуемого гемолизата. Далее осуществляли фотополимеризацию под лучами дневного света не менее 5–6 часов до образования гелей. Для упрощения метода ИЭФ после проведения фокусирования использовали ФК по принципу метода “Диабет-тест” (ФК с применением неполного гидролиза гликированного белка щавелевой кислотой) и назвали условно этот способ — метод ИЭФ+ФК (или просто ИЭФ+ФК). При этом уровень HbA_{1c} рассчитывали по формуле $HbA_{1c} = E_{оп} \cdot 0,029 \cdot 3,3 \cdot 100\%$, где 0,029 — экстинкция 1% HbA_{1c} .

Аналитическая специфичность метода ИЭФ+ФК подтверждена тем, что при фокусировании гемолизата в зоне градиентов рН, соответствующим изоточке (рI) задерживалась преимущественно фракция HbA_{1c} [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сопоставлении уровня HbA_{1c} при использовании метода “Диабет-тест” и ИЭФ+ФК обнаружено, что в случае фокусировки HbA_{1c} этот показатель был значительно меньше (примерно в 3 раза), как у здоровых, так и у больных СД (рис. 1). Это можно объяснить тем, что при проведении колориметрического метода гидролиз проходит только на 30% [2, 6]. Поэтому необходимо ввести коэффициент 3,3 для того, чтобы получить достоверный результат.

У обследованных 15 больных СД 1 и СД 2 для определения уровня HbA_{1c} использовали

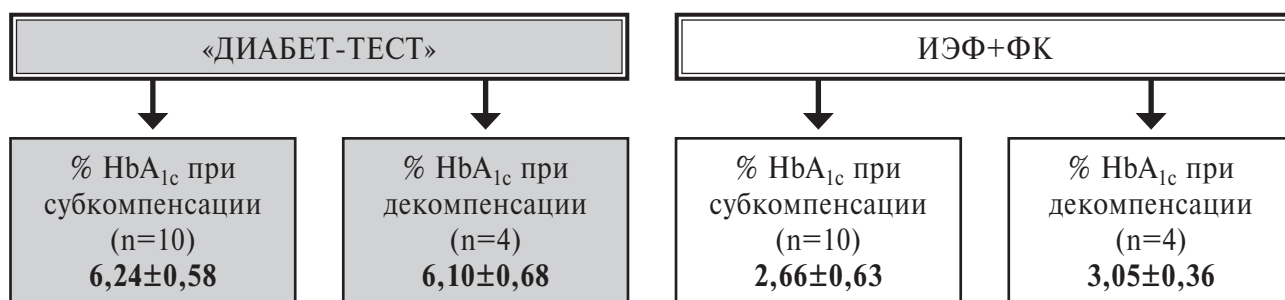


Рис.1. Сравнение методов Диабет-тест и ИЭФ+ФК

колориметрический метод с применением неполного гидролиза HbA_{1c} соляной кислотой и определением Еоп фона, и проведением калибровки по фруктозе. При этом выявлена довольно высокая воспроизводимость в различных сериях (V=2,59–2,68%).

Проводили клиническую апробацию фотометрического метода, основанного на неполном гидролизе гликозилированного белка фосфорной кислотой, калибровку с фруктозой и колориметрию с 2-тиобарбитуровой кислотой для определения HbA_{1c} у больных СД. Обследовано 134 больных СД, среди которых было 57 больных с СД1 и 77 с СД2. Уровень HbA_{1c} определяли фотометрическим методом, основными этапами которого были неполный гидролиз HbA_{1c} фосфорной кислотой, колориметрия с 2-тиобарбитуровой кислотой, калибровка по фруктозе (табл. 2).

Мы сравнили фотометрический Lachema с методом HPLC производства BIO-RAD company

facilities, Lyphochek Diabetes Control у 16 больных СД. Обнаружено, что фотометрический метод существенно отличался от HPLC. Объяснением этому послужили следующие факты. Во-первых: при использовании критерия Вилкоксона обнаружено существенное отличие этих двух методов (3,413, p=0,001); во-вторых: низкое значение корреляции Пирсона (r=0,135); в-третьих: отсутствие регрессионной связи. В то же время данный фотометрический метод частично совпадал с методом ИЭФ. Во-первых: критерий Вилкоксона =1,877, p>0,061; во-вторых: достоверная корреляция Пирсона (r=0,358, p=0,002); в-третьих: достоверная регрессионная связь между уровнем HbA_{1c}, определенным методами Lachema и ИЭФ (рис. 2). При применении метода Lachema для определения уровня HbA_{1c} мы обнаружили связь между содержанием преГл и уровнем HbA_{1c} (корреляция Спирмена) (0,237, p<0,01), между уровнем Гл12 и HbA_{1c} (корреляция Спирмена) (0,240,

Таблица 2

Средние значения основных параметров обследованных больных сахарным диабетом

Показатель	Число обследованных	Минимальное количество	Максимальное значение	Среднее значение	
HbA _{1c} (%)	134	3,6	24	10,7	0,38
Пре Гл (ммоль/л)	128	2,6	27,4	10,8	0,45
Гл 12 ч (ммоль/л)	132	2,5	28,2	11,83	0,45
Гл 17 ч (ммоль/л)	124	3,0	26,4	10,82	0,43
Гл 21 ч (ммоль/л)	95	2,5	27,8	10,17	0,50
СГ (г)	90	0,1	5,2	1,63	0,12
СП (г)	98	0,02	2,97	0,64	0,06
ОБС (г/л)	88	55,5	85	68,67	0,7
ИМТ (кг/м ²)	90	16,18	40,45	25,94	0,58
ОХС (ммоль/л)	12	1,9	5,7	4,0	0,28
СДИ (ед)	63	16	72	41,6	1,68
СДМ (мг)	5	400,0	500,0	460	24,49
Длительность СД (годы)	128	0,001	35	9,68	0,69
Возраст больных (годы)	131	16,0	77,0	45,04	1,51

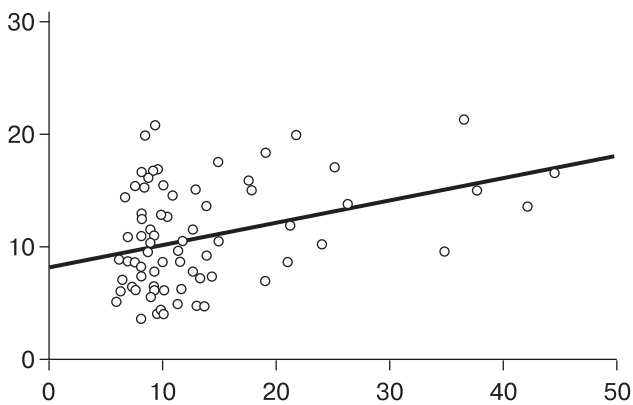


Рис. 2. Линейная регрессия между уровнями HbA_{1c} , определенного методами Lacheta и ИЭФ+ФК ($y=8,232+0,198x$, $p=0,002$, $R^2=0,128$): ось ординат — уровень HbA_{1c} , определенный методом Lacheta (в мкмоль фруктозы на 1 г гемоглобина); ось абсцисс — уровень HbA_{1c} , определенный методом ИЭФ+ФК (в %)

$p<0,01$), между уровнем Гл17 и HbA_{1c} (корреляция Спирмена) (0,249, $p<0,01$), между уровнем Гл21 и HbA_{1c} (корреляция Пирсона) (0,245, $p<0,02$), между уровнем HbA_{1c} и ИМТ (корреляция Спирмена) (0,214, $p<0,05$). Следует выделить связь между содержанием HbA_{1c} и СП (корреляция Спирмена) (0,297, $p=0,002$). При регрессионном анализе отмечалось незначительное влияние содержания преГл на уровень HbA_{1c} ($R^2=0,055$, $n=126$, $F_{\text{exp}}=7,37$, $p<0,01$). Также

нами обнаружено небольшое влияние других параметров на уровень HbA_{1c} : $R^2=0,068$, $n=128$, $F_{\text{exp}}=3,11$, $p<0,05$; $R^2=0,062$, $n=121$, $F_{\text{exp}}=4,0$, $p<0,05$; $R^2=0,060$, $n=93$, $F_{\text{exp}}=5,94$, $p<0,02$ для Гл12, гликемии в 17 часов Гл17, гликемии в 21 час (Гл21), соответственно. Следует выделить выраженную зависимость уровня HbA_{1c} от уровня СП ($y=e^{-0,1163-7,7161x}$; $R^2=0,130$; $n=96$, $F_{\text{exp}}=14,28$, $p<0,001$).

Изучали соотношение уровня HbA_{1c} , определенного различными методами Abbott и ИЭФ+ФК, и основных показателей метаболизма — уровня преГл, постГл (пик), Гл21, ОХС при помощи вычислительной программы с графической интерпретацией результатов исследований. Сущностью данного исследования было установление зависимости разбросов уровня HbA_{1c} от вариаций (разбросов) уровня преГл, гликемии после еды (постГл(пик)), гликемии в 21-00 (Гл21), ОХС. Для этого мы изучили “расстояние” (среднюю погрешность) между координатой уровня HbA_{1c} и разбросами уровня преГл, постГл (пик), Гл21, ОХС. Как видно из (рис. 3, 4) использование методов Abbott и ИЭФ+ФК по разному отображает зависимость уровня HbA_{1c} от разбросов других контрольных параметров СД. Так, например, при СД 1 уровень HbA_{1c} отображает

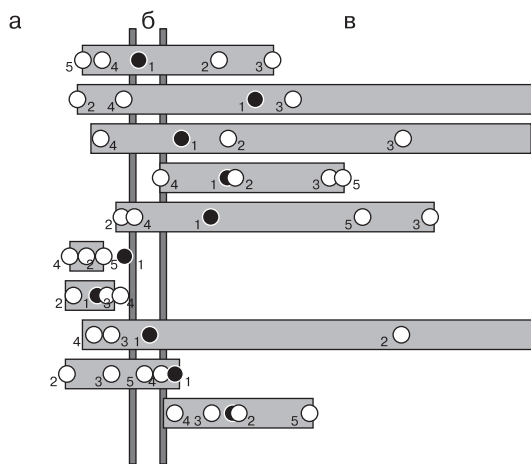


Рис. 3. Средняя погрешность по уровню гликированного гемоглобина в единицах измерения уровня HbA_{1c} до середины зоны разброса уровня пре Гл, пост Гл и ОХС (6,744) и средняя погрешность по уровню гликогемоглобина в единицах измерения уровня HbA_{1c} от средней координаты остальных показателей (4,088) у больных СД 1 типа при использовании метода Abbott: а — не диабетический уровень, б — адекватный уровень параметров СД, в — неадекватный уровень параметров СД. Маркировка: 1 — уровень HbA_{1c} (%); 2 — уровень гликемии натощак (моль/л); 3 — уровень гликемии после еды (пик); 4 — перед сном (ммоль/л); 5 — уровень ОХС (моль/л)

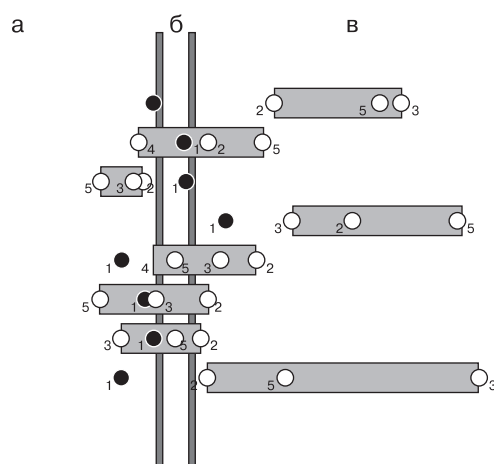


Рис. 4. Средняя погрешность по уровню гликированного гемоглобина в единицах измерения уровня HbA_{1c} до середины зоны разброса уровня преГл, постГл и ОХС (3,572) и средняя погрешность по уровню гликогемоглобина в единицах измерения уровня HbA_{1c} от средней координаты остальных показателей (3,510) у больных СД 1 типа при использовании метода ИЭФ+ФК: а — не диабетический уровень, б — адекватный уровень параметров СД, в — неадекватный уровень параметров СД. Маркировка: 1 — уровень HbA_{1c} (%); 2 — уровень гликемии натощак (моль/л); 3 — уровень гликемии после еды (пик); 4 — перед сном (ммоль/л); 5 — уровень ОХС (моль/л)

бóльший разброс уровня преГл, постГл(пик), Гл21 и ОХС при использовании метода Abbott по сравнению с методом ИЭФ+ФК. У больных СД1, у которых HbA_{1c} определялся методом ИЭФ с последующей колориметрией, средняя погрешность по уровню HbA_{1c} в единицах измерения уровня HbA_{1c} до середины зоны разброса остальных показателей — 3,572, а средняя погрешность по уровню HbA_{1c} в единицах измерения уровня HbA_{1c} от средней координаты уровня остальных показателей 3,510.

Далее нами были оценены контрольные параметры СД при определении уровня HbA_{1c} различными методами. В сравнении участвовали следующие методы — метод Abbott, метод Диабет-тест и метод ИЭФ+ФК. Нами обнаружено, что доля соответствия уровня HbA_{1c} клинике СД была наибольшая при определении этого параметра методом ИЭФ+ФК (табл. 3).

Таблица 3

Процент соответствия уровня HbA_{1c} и результатов самоконтроля глюкозы одному и тому же течению болезни

Метод определения	СД1	СД2
Abbott	40%	33%
“Диабет-тест”	25%	-
ИЭФ+ФК	50%	33%

Обследовано 262 больных с СД, из которых с СД1 — 149 больных, с СД2 — 113 больных с длительностью болезни от впервые выявленного до нескольких десятков лет. Все больные находились на стационарном лечении в эндокринологических отделениях с неадекватным уровнем метаболического контроля или высоким сосудистым риском заболевания. Для определения HbA_{1c} использовали следующие способы: Abbott, Диабет-тест, ИЭФ+ФК и Lachema. При определении HbA_{1c} различными методами обнаружено, что наиболее высокие цифры данного показателя были при использовании ИЭФ + ФК. При СД 1-12,88±0,9, а при СД 2 — 11,31±0,75% (рис. 5, 6). В то же время при использовании других способов значения искомого показателя были меньшими. Наиболее низкими они были при использовании Abbott и составили 8,41±0,61 и 7,39±0,40%, соответственно. У тех больных, у которых HbA_{1c} определяли сразу несколькими способами, уровень искомого показателя при определении фокусирующим HbA_{1c} методом с до-

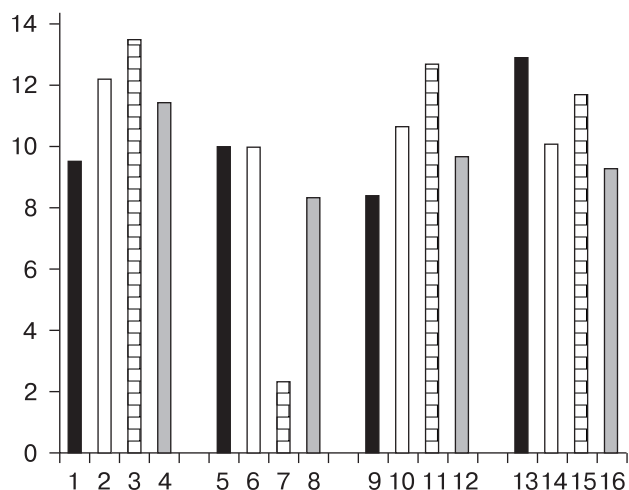


Рис. 5. Уровень HbA_{1c}, преГл, постГл(пик) и глюкозы перед сном у больных СД 1: ось ординат — уровень HbA_{1c} в % (для методов Abbott, Диабет-тест, ИЭФ+ФК) или в мкмоль фр. на 1 г Hb (для метода Lachema); ось абсцисс: 1, 5, 9, 13 — уровень HbA_{1c} (черный цвет), определенные методами Abbott (%), Lachema (мкмоль фр. на 1 г Hb), Диабет-тест (%), ИЭФ+ФК (%), соответственно; 2, 6, 10, 14 — уровень пре-Гл (ммоль/л) (белый) у этих же больных, соответственно; 3, 7, 11, 15 — уровень пост-Гл(пик) (ммоль/л) (штриховка) у этих же больных, соответственно; 4, 9, 12, 16 — уровень гликемии перед сном (ммоль/л) (серый цвет) у этих же больных, соответственно

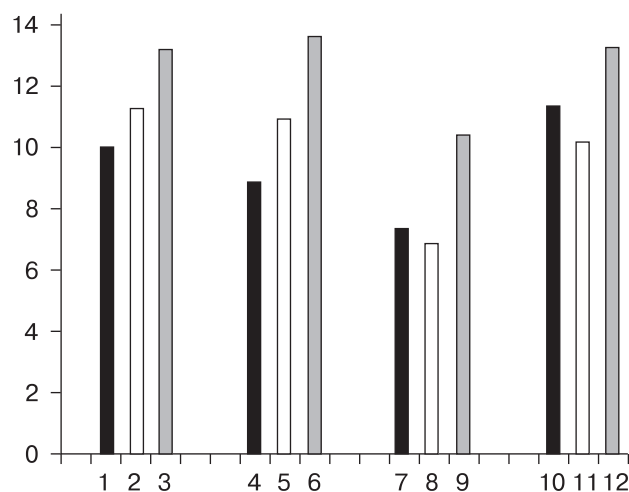


Рис. 6. Уровень HbA_{1c}, преГл, постГл (пик) у больных СД2: ось ординат — уровень HbA_{1c} в % (для методов Abbott, Диабет-тест, ИЭФ+ФК) или в мкмоль фр. на 1 г Hb (для метода Lachema); ось абсцисс: 1, 4, 7, 10 — уровень HbA_{1c} (черный цвет), определенные методами Abbott (%), Lachema (мкмоль фр. на 1 г Hb), Диабет-тест (%), ИЭФ+ФК (%), соответственно; 2, 5, 8, 11 — уровень пре-Гл (ммоль/л) (белый) у этих же больных, соответственно; 3, 6, 9, 12 — уровень постГл (пик) (ммоль/л) (штриховка) у этих же больных, соответственно

стоверностью на 95% отличался от использования других методов. При проведении корреляционного анализа обнаружено отсутствие линейной связи между уровнем HbA_{1c} и преГл, постГл и

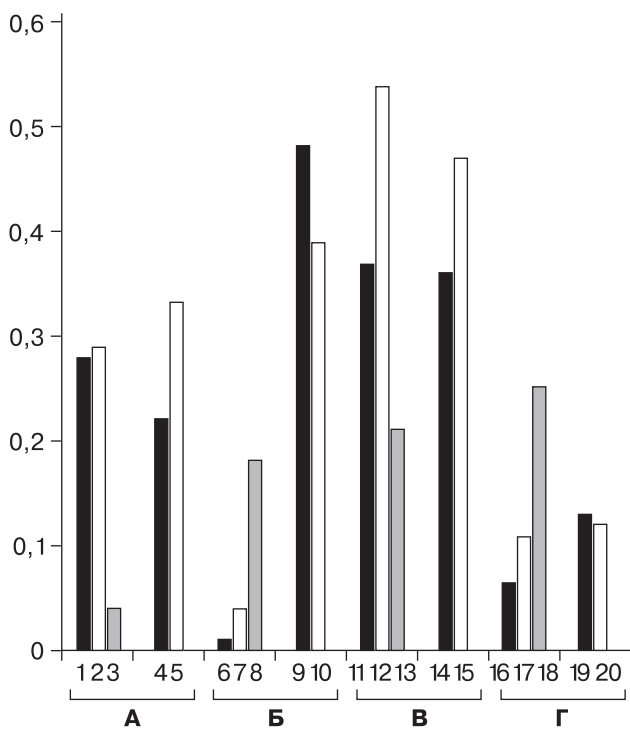


Рис. 7. Коэффициенты линейной корреляции (r) между уровнем HbA_{1c} (% или мкмоль фр. на 1 г Hb) и уровнем гликемий в течение суток (ммоль/л) у больных СД. Ось ординат — величина r. Ось абсцисс — 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 18 у больных СД1, где 1, 6, 11, 16 — r между уровнем пре-Гл (черный), 2, 7, 12, 17 — r между уровнем постГл (пик) (белый), 3, 8, 13, 18 — r между уровнем гликемии перед сном (серый) и уровнем HbA_{1c} при определении последних методами Диабет-тест (%), Lachema (мкмоль фр. на 1 г Hb), Abbott (%), ИЭФ+ФК (%), соответственно; 4, 5, 9, 10, 14, 15, 19, 20 у больных СД2, где 4, 9, 14, 19 — r между уровнем пре-Гл (черный), 5, 10, 15, 20 — r между уровнем постГл (пик) (белый) и уровнем HbA_{1c} при определении последних методами Диабет-тест (А), Lachema (Б), Abbott (В), ИЭФ+ФК (Г)

Гл21 (рис. 7). Тогда как вызывает сомнение наличие связи между указанными показателями при использовании тех методик, где фокусировка HbA_{1c} не проводилась, так как случайная гликемия отражает состояние углеводного обмена на момент обследования, а уровень HbA_{1c} — за длительный промежуток времени.

Сравнивали пять методов определения HbA_{1c} (Abbott, Диабет-тест, ИЭФ+ФК, Lachema, ИОХ). Для этого проверили закон распределения уровней HbA_{1c}, определенного этими способами. Мы применили тест Колмогорова–Смирнова (для методов аффинной хроматографии и ионообменной хроматографии был также применен тест Шапиро–Уилкса, более подходящий для малочисленных {до 50} выборок). Обнаружено нормальное распределение уровня данного параметра при использовании четырех (из пяти)

способов, потому что вероятность ошибки (p) для большинства методов значительно выше 0,05. В то же время распределение значений HbA_{1c} у больных СД, определенных методом ИЭФ в капиллярах, значимо отличалось от нормального, потому что критерий Колмогорова–Смирнова был равен 2,015, а вероятность ошибки (p), была значительно меньше 0,05 (в данном исследовании =0,001). Распределение значений HbA_{1c} также было проверено при помощи блочных диаграмм (рис. 8). Блочная диаграмма представляет собой прямоугольник, занимающий пространство наибольшего скопления значений HbA_{1c} (от 25 до 75 перцентилей). Эти значения отложены на оси ординат для каждого метода. Например, для метода аффинной хроматографии (рис. 8А) приблизительные границы диаграммы (то есть наиболее часто встречаемых значений HbA_{1c}) находятся в пределах от 6 до 9%. Кроме этого горизонтальными линиями обозначены максимальное и минимальное значения данного параметра (для метода аффинной хроматографии — от 5 до 11%). Линия внутри прямоугольника соответствует медиане, то есть среднему значению HbA_{1c}. На блочных диаграммах методов фотометрии с гидролизом HbA_{1c} щавелевой кислотой (рис. 8Б), ИЭФ в капиллярах (рис. 8В), фотометрии HbA_{1c} фосфорной кислотой (рис. 8Д) обнаруживаются экстремальные значения. Цифры уровня HbA_{1c}, удаленные от границ более чем на три длины построенного прямоугольника, помечены на диаграмме звездочками, а значения, удаленные более чем на полторы длины прямоугольника, помечены кружками. Цифры справа звездочек и кружков соответствуют номеру конкретного исследования. Наибольшее количество выбросов обнаружено у метода ИЭФ в капиллярах (рис. 8В), что и определяет атипичность распределения уровня HbA_{1c}, определенных методом ИЭФ в капиллярах.

Таким образом, данные по сравнению методов определения HbA_{1c} свидетельствуют о том, что разработанный нами способ ИЭФ в капиллярах отличается от других методов определения HbA_{1c}. Уровень HbA_{1c}, определенный ИЭФ, наиболее полно по сравнению с другими способами совпадает с основными контрольными параметрами СД. При этом имеет принципиально иную ассоциацию с состоянием углеводного обмена по показателям гликемического профиля и устанавливает более существенную связь с основными маркерами нарушенного метаболизма

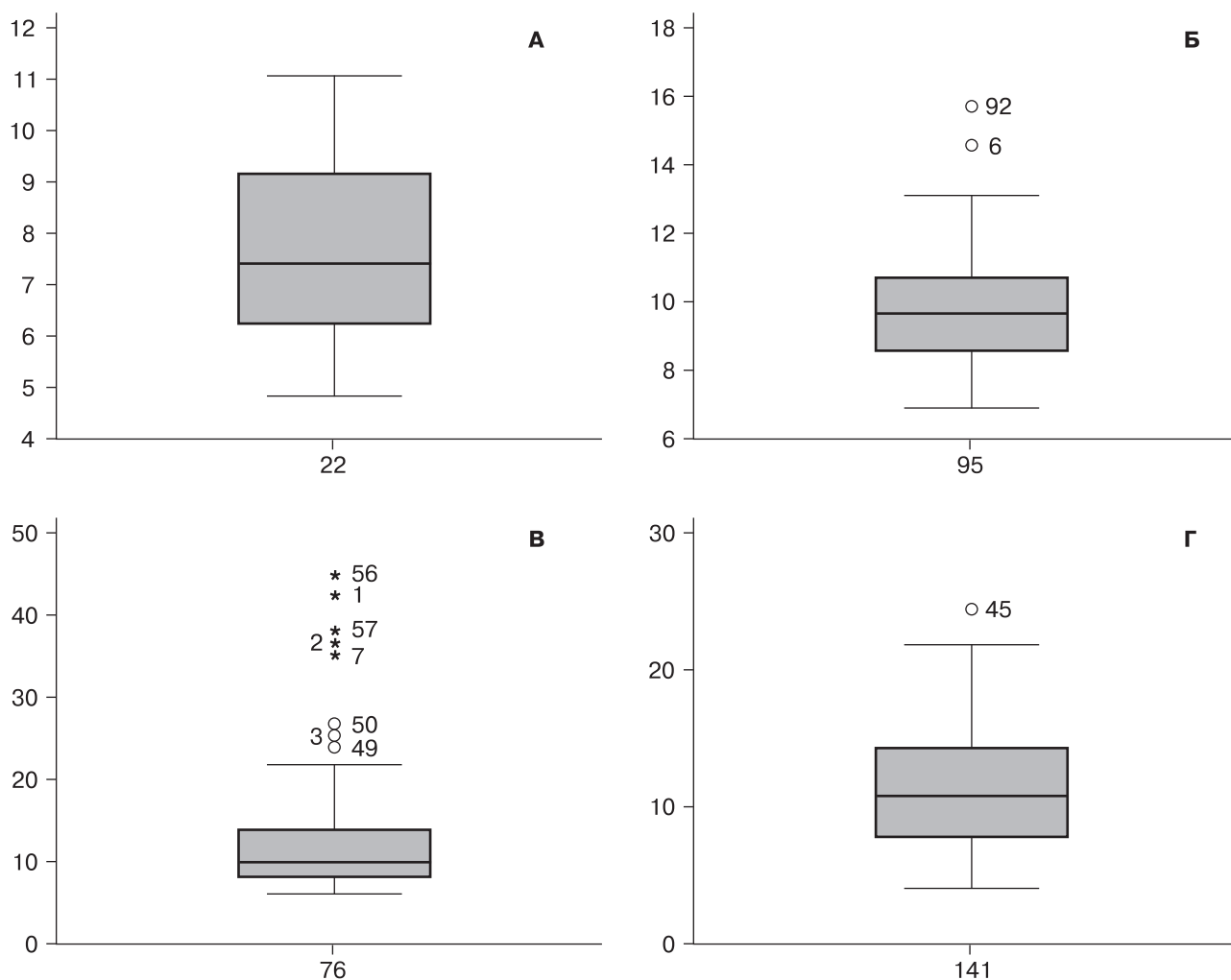


Рис. 8. Блочные диаграммы уровня HbA_{1c} у больных СД: А — метод аффинной хроматографии (%); Б — метод фотометрии с гидролизом HbA_{1c} шавелевой кислотой (%); В — метод ИЭФ в капиллярах (%); Д — метод фотометрии с гидролизом HbA_{1c} фосфорной кислотой (мкмоль фруктозы на 1 г гемоглобина); ось ординат — уровень HbA_{1c}, ось абсцисс — количество обследуемых

в организме у человека. Данные сравнительного анализа методов определения HbA_{1c} свидетельствуют о необходимости предварительного выделения фракции HbA_{1c} для более детального изучения клинко-патогенетической роли HbA_{1c} в развитии основных заболеваний внутренних органов.

Кроме больных СД уровень HbA_{1c} может повышаться и у больных с отсутствием СД.

Нами обнаружено повышение уровня HbA_{1c} у больных с ИБС и гипертонической болезнью. В стационаре уровень HbA_{1c} составил 12,1%, что существенно превышало норму (рис. 9). У этих обследуемых больных был повышен уровень преГл и ОХС. При этом обнаружена позитивная достоверная корреляционная зависимость между уровнем HbA_{1c} и ОХС ($R=0,56$, $p=0,05$), ПТИ ($R=0,80$, $p=0,05$) и ФВ ($R=0,65$, $p=0,05$), что свидетельствовало о роли гликирования в

развитии сердечной недостаточности. Уровень HbA_{1c} был повышен у 10 больных из 12 обследуемых (83,5%).

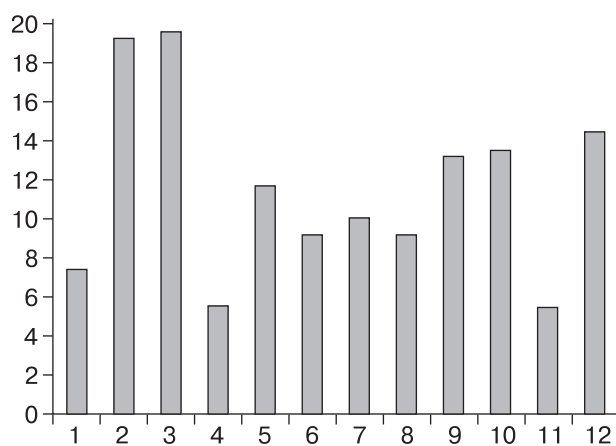


Рис. 9. Гистограмма уровня HbA_{1c} у больных с ИБС и гипертонической болезнью в стационаре: ось абсцисс — номер исследования; ось ординат — уровень HbA_{1c} (%)

Уровень HbA_{1c} и основных лабораторных данных у больных с болезнями печени

	HbA _{1c} , %	СА, %	АЛТ, ммоль/л	Билирубин, мкмоль/чл	ОХС, ммоль/л	ПТИ, %	ЩФ, ед./л
1	12,86	60	0,85	12,90	6,90	97,00	430,00
2	13,88	47	5,22	175,50	6,90	71,00	215,00
3	3,98	53,60	1,00	11,70	4,00	100,00	435,00
4	3,98	46,00	1,08	19,90	2,60	78,00	470,00
5	13,90	—	1,37	112,90	—	63,00	—
6	11,95	—	—	28,20	—	75,00	—
7	15,93	—	—	—	—	—	—
N	7	4	5	6	4	6	4
Средняя арифметическая	10,81	51,65	1,90	60,18	5,10	8,67	387,50

Было обследовано 7 больных с болезнями печени — гепатитами и циррозами печени. Это были взрослые от 38 до 62 лет с длительностью заболевания от 1 года до 3 лет. У 3 больных был цирроз печени, у 2 — хронический персистирующий гепатит, у 2 — хронический активный гепатит. У больных с болезнями печени обна-

ружено увеличение содержания HbA_{1c}. В то же время уровень случайной преГл был преимущественно в пределах нормы ($4,7 \pm 1,8$ ммоль/л). У обследованных пациентов с болезнями печени обнаружено повышение уровня других параклинических показателей, особенно СА, АлАТ, общего билирубина крови, ЩФ (табл. 4). Кроме этого обнаружена однотипность распределения уровня HbA_{1c}, общего билирубина и активности ЩФ и (рис. 10).

У больных с болезнями печени обнаружена позитивная достоверная корреляционная зависимость между уровнем HbA_{1c} и уровнем сывороточного альбумина ($R=0,99$, $p<0,001$) и ЩФ ($R=0,89$, $p=0,05$).

Таким образом анализ полученных данных показал, что у больных с болезнями печени уровень HbA_{1c} был повышен в 70% случаев и имел достоверную корреляцию с важнейшей характеристикой — белково-образующей функцией печени — уровнем СА.

Были обследованы 9 больных, которые находились в критическом состоянии (средний возраст 50 лет) и длительностью заболеваний, приведших к неотложным состояниям. У большинства из обследованных больных уровень HbA_{1c} был выше общепринятых норм и составил $8,81 \pm 1,57\%$. У одного больного был даже выше 17%. Это могло свидетельствовать о развитии СД у обследованных больных. В то же время у некоторых больных уровень HbA_{1c} был довольно низким. В целом среднее значение HbA_{1c} у больных, которые находились в критических состояниях было выше нормы (табл. 5). Также обнаружено повышение основных показателей,

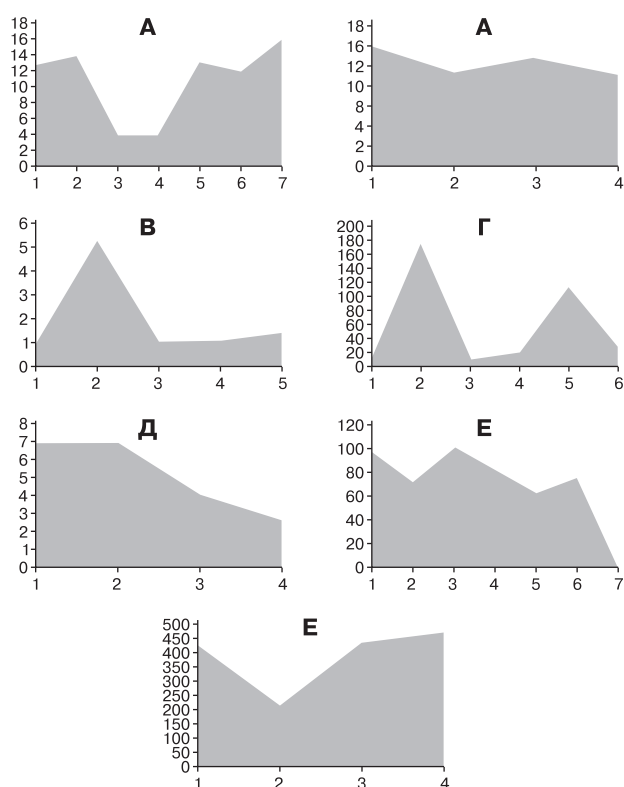


Рис. 10. Распределения уровня основных лабораторных показателей у больных с болезнями печени: А — уровень HbA_{1c} (%); Б — уровень СА (%); В — АЛТ (ммоль/л); Г — уровень общего билирубина (мкмоль/чл); Д — уровень ОХС (ммоль/л); Е — уровень ПТИ (%); Ж — уровень ЩФ (ед/л)

Таблица 5

Средние арифметические показатели у больных в отделении интенсивной терапии

Уровень	n	$\bar{X} \pm m$
HbA _{1c} (%)	9	8,81±1,57
МК (ммоль/л)	9	12,58±3,16
КК(ммоль/л)	9	0,14±0,05
К+ (ммоль/л)	9	3,76±0,24
Na+ (ммоль/л)	9	134,89±0,87
пре Гл (ммоль/л)	9	7,46±1,25
Ht	9	0,34±0,01
Cl ⁻ (ммоль/л)	9	96,40±3,91
Фн (г/л)	9	2,35±0,73
ПТИ (%)	9	74,17±9,44
ССЭ	9	81,16±7,93
ОБ (г/л)	9	59,19±3,85
N (г/сут)	9	5,88±1,47
Общий билирубин крови (мкмоль/ч·л)	9	39,94±16,82
Уровень амилазы крови (ед./л)	9	27,72±4,61
ВСК (мин)	9	5,90±0,10
ОП (мосм/кг)	9	289,40±4,51

n — количество обследованных больных; $\bar{X} \pm m$ — средние арифметические исследуемых показателей и стандартная ошибка.

таких как преГл, МК, КК и др. В то же время обнаружена нелинейная, преимущественно высокая корреляционная связь мочевины/HbA_{1c} ($R=0,63$, $p<0,05$), КК/HbA_{1c} ($R=0,84$, $p<0,05$), Фн/HbA_{1c} ($R=0,93$, $p<0,01$), ОБ/HbA_{1c} ($R=0,64$, $p<0,05$), Na⁺/HbA_{1c} ($R=0,73$, $p<0,05$). Особенно необходимо отметить тесную корреляционную зависимость с важнейшей функцией, определяющей прогноз реанимационных больных — с ССЭ 96%.

В целом уровень HbA_{1c} повышался при заболеваниях внутренних органов. У больных с гепатитами и циррозами печени он достоверно позитивно коррелировал с уровнем сывороточного альбумина и активностью ЩФ, у больных с артритами — с острофазовыми белками. У больных с ИБС и гипертонической болезнью уровень HbA_{1c} достоверно коррелировал с уровнем ПТИ, ОХС, а также ФВ. У больных ХГН позитивно достоверно зависел от содержания СП и длительности ХПН. Наиболее выраженные корреляционно-регрессионные зависимости между уровнем HbA_{1c} и клинико-биохимическими

показателями обнаружены нами у реанимационных больных. У этих пациентов уровень HbA_{1c} достоверно коррелировал с уровнем КК, Na⁺, Фн, СП, ССЭ, либо устанавливал регрессионную зависимость с этими показателями (рис. 11).

Таким образом диагностическое значение HbA_{1c} подтверждено повышением его уровня у больных с заболеваниями внутренних органов и повышением корреляционных и регрессионных связей с важнейшими параметрами, характеризующими тяжесть и прогноз изученных заболеваний.

Два крупных проспективных исследования “Исследование по контролю диабета и его осложнений” (The Diabetes Control and Complications Trial DCCT) [20] и “Великобританское проспективное исследование диабета” (United Kingdom Prospective Diabetes Study UKPDS) [22] подчеркнули необходимость измерения HbA_{1c} с высокой точностью, потому что результаты определения непосредственно связаны с появлением риска заболеваний. Уже в начале 1990-х ряд исследователей показали, что стандартизация технически выполнима, несмотря на широкое разнообразие методов определения HbA_{1c} [9,15]. В 1996 году была создана программа по стандартизации HbA_{1c} NGSP (National Glycohemoglobin Standardisation Program) [16] для того, чтобы стандартизовать тестовые результаты HbA_{1c} практических лабораторий к DCCT эквивалентным значениям [13, 21]. Используемые методы определения HbA_{1c} должны быть сравнены с референтным DCCT-методом — HPLC. Метод применяется с 1978 года и обладает высокой воспроизводимостью по коэффициенту вариации менее 3%. Разрабатываемые методы определения HbA_{1c} должны иметь воспроизводимость результатов исследования в течение года с коэффициентом вариации менее 4% и возможной вариацией в течение года ±1%. Однако Исследовательская группа ВОЗ по сахарному диабету еще в 1985–1987 гг. рекомендовала для определения HbA_{1c} одну из электрофоретических методик [8]. В свою очередь Международная Федерация клинической Химии (the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)) разработала свой референтный метод, основанный на капиллярном электрофорезе [14]. В то же время в 1978 году появились работы, посвященные изоэлектрическому фокусированию HbA_{1c} в амфолинах. При этом было показано, что изоточка pI HbA_{1c} находится в зоне 6,95–7,0. Минорная фракция гемоглобина

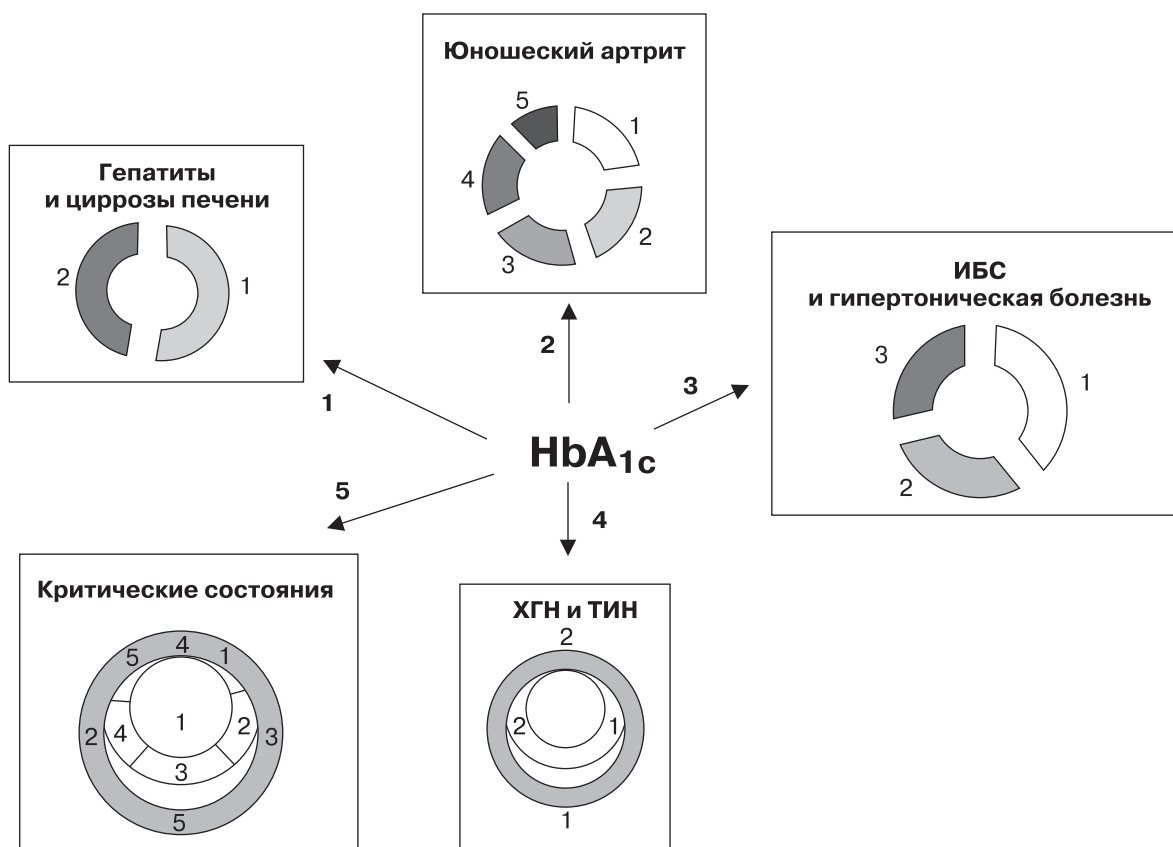


Рис. 11. Области применения HbA_{1c} (наличие штриховки — корреляционный анализ, отсутствие штриховки — регрессионный анализ): 1. Болезни печени (взаимоотношения HbA_{1c} (%) — СА (%); HbA_{1c} (%) — ЩФ (ед/л)); 2. Юношеский артрит (взаимоотношения: α_1 -гл (%) — HbA_{1c} (%); 2. α_2 -гл (%) — HbA_{1c} (%); 3. γ -гл (%) — HbA_{1c} (%); 4. С-рб- HbA_{1c} (%); 5. гаптоглобин — HbA_{1c} (%)); 3. ИБС и болезни, характеризующиеся повышенным кровяным давлением (взаимоотношения: 1. ПТИ (%) — HbA_{1c} (%); 2. HbA_{1c} (%) — ФВ (%); 3. ОХС (ммоль/л) — HbA_{1c} (%)); 4. Сахарный диабет (взаимоотношения: 1. СГ (г) — HbA_{1c} (%); 2. ОХС (ммоль/л) — HbA_{1c} (%); 3. ИМТ (кг/м²) — HbA_{1c} (%); 4. длительность СД (годы) — HbA_{1c} (%)). 5. ХГН и ТИН (взаимоотношения: 1. HbA_{1c} (%) — СП (г/л); 2. Длительность ХПН — HbA_{1c} (%)); 6. Критические состояния (взаимоотношения: 1. КК (моль/л) — HbA_{1c} (%); 2. Na^+ — HbA_{1c} (%); 3. Фн (г/л) — HbA_{1c} (%); 4. СП(г/л) — HbA_{1c} (%); 5. ССЭ — HbA_{1c} (%))

A_{1c} отделялась от HbA , в то время как другие минорные фракции A_{1a} и A_{1b} не отделялись [19]. Метод ИЭФ при определении гликированных белков рассматривается как специфический и применяется для повышения точности методов определения HbA_{1c} , например HPLC [23]. В предыдущих наших исследованиях было показано, что при ИЭФ гемоглобина в борат-полиольной системе, фракция HbA_{1c} более четко отделяется от HbA , чем при применении ИЭФ в амфолинах и находится в зоне рН 7,2–7,3 [5]. В связи с этим достаточно использования только двух градиентных растворов с рН, соответствующим верхним и нижним границам рI HbA_{1c} . Это необходимо для того, чтобы при ИЭФ выделялся HbA_{1c} , освободив исследуемый гемолитат от примеси других белков. В заданной зоне задержится только искомая фракция, а другие белки, имея иную рI (как правило в более “кислой” зоне)

электрофоретически минуют эту зону и уйдут в раствор. Преимущества такого способа исследования в следующем. Во-первых, представляется возможность использования микрообъёма капилляров, что позволяет уменьшить в 8,3 раза количество реактивов по сравнению с таковым для классического ИЭФ. Во-вторых, упрощается подготовка к проведению самого опыта. В предлагаемом способе достаточно иметь только те градиенты, которые соответствуют рI HbA_{1c} , а в методе-предшественнике необходимо чёткое отделение фракции HbA_{1c} от других фракций Hb для осуществления денситометрии, что возможно только при большом количестве градиентов (минимально 6). Следовательно упрощается и приготовление самих градиентных растворов. Нет необходимости построения графика для определения линейного или ступенчатого градиента (как это делалось ранее), длительной

процедуры титрования (даже при отсутствии рН-метра, возможно использование просто лакмусовой бумаги). В третьих, становится ненужным система окраски гелей. Таким образом, мы использовали преимущества электрофоретических методов — возможность получения фракции HbA_{1c} , несмотря на то, что они трудоёмки, требуют специального оборудования и дефицитных высококачественных реактивов, в основном дают качественную, а не количественную оценку [6]. Для решения вопроса как оценить выделенную фракцию HbA_{1c} мы применили фотоколориметрические методы. Они позволяют использовать простое оборудование, отличаются высокой воспроизводимостью, удобны для клиник [2], а коэффициент вариации сопоставим с HPLC. Особо нужно рассмотреть метод “Диабет-тест”. Его простота заключается в отсутствии необходимости построения и использования калибровочного графика по глюкозе, упрощается расчёт HbA_{1c} (так как принято, что 1% HbA_{1c} имеет оптическую плотность при длине волны 443 нм 0,029) [1]. Однако обнаруженное нами снижение корреляционной связи между уровнем HbA_{1c} и уровнем гликемии, глюкозурии, отсутствие связи с другими показателями, характеризующими степень тяжести диабета, прогрессированием поздних осложнений, возрастом пациентов, длительностью болезни позволяет предположить, что данный метод недостоверен. Поэтому для повышения точности метода Диабет-тест нами проводилось предварительное ИЭФ HbA_{1c} в капилляре. Таким образом нами были сопоставлены точность метода ИЭФ, простота и доступность фотоколориметрического метода.

Общеизвестно, что сравнение методов является наиболее информативным способом оценки правильности результатов [7]. Согласно Международным данным, сравнительным методом для HbA_{1c} является КОХ. Наши данные показали, что разработанный нами способ отличается от КОХ, 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 способами. Принципиальным отличием разработанного метода является предварительное выделение фракции HbA_{1c} (в данном случае при помощи ИЭФ A_{1c} от основной фракции HbA , тогда как другие фракции гемоглобинов при ИЭФ не отделяются

[19]. 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 рН белки, имеющие отличные рI от HbA_{1c} , не будут подвергаться фокусированию.

Клиническая оценка метода ИЭФ+ФК позволяет по другому взглянуть и на значение самого показателя HbA_{1c} . В научной литературе сложилось представление о двух процессах: гликозилирование и гликирование. Гликозилирование, а точнее трансгликозилирование, является ферментативным процессом и представляет собой реакцию переноса углеводного остатка субстрата на акцептор, в роли которого может выступать другая молекула олигосахарида. Объединенная комиссия IUPAC по биохимической номенклатуре рекомендует использовать термин “гликирование” “glycation” для обозначения неферментативного присоединения сахара к белку. Он предпочтительнее, чем название неферментативное гликозилирование “nonenzymatic glycosylation”. Однако в отечественной литературе более привычным остается написание “гликозилированный” гемоглобин [3]. Наши исследования показали, что HbA_{1c} можно представлять как гликоконъюгат гликирования, а повышение этого параметра у больных с отсутствием явного СД может свидетельствовать о наличии спорадической гипергликемии при избыточном гликировании при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, болезнях печени, почек, суставов [11]

Таким образом, сравнительный анализ методов определения HbA_{1c} показал, что метод ИЭФ в капилляре обладает доказанной аналитической специфичностью. При этом HbA_{1c} , определенный методом ИЭФ в капилляре более соответствует клинике СД по сравнению с другими методами. Как временный вариант могут быть использованы фотоколориметрические методы, основанные на неполном гидролизе HbA_{1c} и устранении фона. При этом уровень HbA_{1c} является не только индексом длительного гликемического контроля, но и важным гликоконъюгатом в процессе гликирования. Поэтому определение этого параметра важно не только у больных СД, но и при заболеваниях внутренних органов с отсутствием СД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данилова Л.А. Колориметрический метод определения гликозилированного гемоглобина / Л.А. Данилова, Н.И. Лопатина // Лаб. дело. — 1986. — № 3. — С. 11–16.
2. Карпова Е.А. Колориметрический метод определения неферментативно гликозилированного гемоглобина в крови человека / Е.А. Карпова, В.К. Городецкий // *Вопр. мед. химии.* — 1989. — № 1. — С. 122–127.
3. Карягина И.Ю. Лабораторные технологии диагностики и мониторинга сахарного диабета / И.Ю. Карягина, Ю.В. Эммануэль // *Клин. лаб. диагностика* — 2002. — № 5. — С. 25–32.
4. Королёв В.А. Клиническая оценка фотоколориметрического способа определения гликированного гемоглобина / В.А. Королёв // *Врач. дело.* — 2008. — № 5–6. — С. 33–40.
5. Королев В.А. Метод изоэлектрического фокусирования в капиллярах + фотоколориметрия / В.А. Королев, В.И. Молчанов // *Биомедицинская химия.* — 2006. — Т. 52, выпуск 2. — С. 200–210.
6. Лукичева Т.И. Гликозилированный гемоглобин. Методы определения. Обзор литературы / Т.И. Лукичева // *МРЖ.* — 1988. — № 11. — С. 16–19.
7. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др.; Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 386 с.
8. Сахарный диабет: Доклад Исследовательской группы ВОЗ 11-16.02.1985 / Всемирная организация здравоохранения. — Женева, 1987. — 127 с.
9. Bodor G.S. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience / R.R. Little, N.Garrett, W.Brown et al. // *Clin. Chem.* — 1992. — Vol. 38. — P. 2414–2418.
10. Boz M. Rapid determination by immunoassay of glycosylated hemoglobin in capillary blood compared to an affinity method for boronate and ion capturing on venous blood / M. Boz, P. Gerard, A. Scheen et al. // *Ann. Biol. Clin.* — 1997. — Vol. 55 (2). — P. 183–194.
11. Chamman P. Non-diabetic hyperglycemia and cardiovascular risk: moving beyond categorisation to individual interpretation to individual interpretation of absolute risk / P. Chamman, R.K. Simmons, R. Jackson et al. // *Diabetologia.* — Vol. 54. — P. 291–299.
12. Dahl-Jorgensen K., Larsen A.E. HbA_{1c} determination by agar gel electrophoresis after elimination of labile HbA_{1c}: a comparison of ion-exchange chromatography / K. Dahl-Jorgensen, A.E. Larsen // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1982. — Vol. 42. — P. 27–33.
13. Goldstein D.E., Little R.R., Lorenz R.A. et al. Tests of glycemias in diabetes / D.E. Goldstein, R.R. Little, R.A. Lorenz et al. // *Diabetes care.* — 2004. — Vol. 27. — P. 1763–1773.
14. Jeppsson J.O. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood // J.O. Jeppsson, U. Kobold, J. Barr, A. Finke et al. // *Clin Chem Lab Med.* — 2002. — Vol. 40. — P. 78–89.
15. Kopp H.P. [Evaluation of a new method for determining glycosylated hemoglobin with monoclonal antibodies (DCA 2000)] Evaluation einer neuen Methode zur Bestimmung von glykiertem Hämoglobin mittels monoklonaler Antikörper (DCA 2000) / H.P. Kopp, A. Festa et al. // *Wien. Klin. Woch.* — 1996. — Vol. 108, № 1. — P. 16–19.
16. Little R.R. The National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP): a five-year progress report / R.R. Little, C.L. Rohlfing, H.M. Wiedmeyer et al. // *Clin. Chem.* — 2001. — Vol. 47. — P. 1985–1992.
17. Luraschil P., Brambillal S., Mozzil R., Cattozzo G., Franzinla C. Monitoring analytical quality in routine glycohemoglobin measurements / P. Luraschil, S. Brambillal, R. Mozzil et al. // *Clin. Chem.* — 2002. — Vol. 48. — P. 1594–1597.
18. Oremek G. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography / G. Oremek, U.B. Seiffert, G. Schmid // *Clin. Chim. Acta.* — 1987. — Vol. 168. — P. 81–86.
19. Spicer K.M. A simplified assay of hemoglobin A_{1c} in diabetic patients by use of isoelectric focussing and quantitative microdensitometry / K.M. Spicer, R.C. Allen, M.G. Buse // *Diabetes.* — 1978. — Vol. 27, № 4. — P. 384–388.
20. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus // *N. Engl. J. Med.* — 1993. — Vol. 329. — P. 977–986.
21. Twormey P.J., Different DCCT-aligned HbA_{1c} methods and the GMS contract / P.J. Twormey, D.R. Pledger // *Int. J. Clin. Pract.* — 2008. — Vol. 62. — P. 202–205.
22. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes / (UKPDS 33) // *Lancet.* — 1998. — Vol. 352. — P. 837–853.
23. Vidal P., Dechert T., Hansen B., Welinder B.S. High-performance liquid chromatofocusing and column affinity chromatography of in vitro C 14-glycosylated human serum albumin // *J. Chrom.* — 1989. — Vol. 476. — P. 467–475.
24. Vincenzi Jager A. Novel approach for the analysis of glycosylated hemoglobin using capillary focusing with chemical mobilization / A. Vincenzi Jager, M. Franco Maggi Tavares // *J. Chromatogr.* — 2003. — Vol. 785, № 2. — P. 285–292.
25. Wiedmeyer H.M., McKenzie E. Methods of glycosylated hemoglobins: high performance liquid chromatography and thiobarbituric acid colorimetric methods / H.M. Wiedmeyer, E. McKenzie // *Methods in Diabetes Research.* — New York. — 1986. — Vol. 2. — P. 475–504.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКОВАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ

В.А. Корольов

Метою цього дослідження було порівняння методів визначення глікованого гемоглобіну (HbA_{1c}). Для цього обстежено 731 хворий, серед котрих 442 хворих на цукровий діабет (ЦД) і 289 із захворюваннями внутрішніх органів за відсутності явного ЦД. Рівень HbA_{1c} визначали розробленим нами методом ізоелектричного фокусування (ІЕФ) в капілярі, а також способами, що ґрунтуються на катіоно-обмінній хроматографії, боронат-афінній хроматографії і фотоколориметрії після неповного гідролізу HbA_{1c}. Доведено, що метод ІЕФ в капілярі є специфічним способом для визначення глікованого гемоглобіну. Визначення цього параметра важливе як у хворих на ЦД, так і при захворюваннях внутрішніх органів за відсутності ЦД.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR DETERMINATION OF GLYCATED HAEMOGLOBIN

V.A. Koroliow

The purpose of the research was comparison of methods for determination of glycosylated haemoglobin (HbA_{1c}). For this purpose 731 patients with diabetes mellitus and 289 non-diabetic patients were inspected. The level of HbA_{1c}

was determined by the method of the isoelectric focusing (IEF) in a capillary, cation exchange chromatography, boronate affinity chromatography and photocolometry. IEF method carried out a test in the polyacrilamide gel in the narrow pH — gradient, which proper for isoelectrical point of HbA_{1c}. It was proved that the method of IEF in a capillary is a specific way for determination of glycated hemoglobin. Definition of it is important both patients of DM and at the diseases with absence of DM.

УДК 616.617-007.272-078.839-053.2

Л.Я. Мигаль, Г.Г. Нікуліна, І.Є. Сербіна,
Д.А. Сеймівський, В.Ф. Петербургський

ДІАГНОСТИЧНА ІНФОРМАТИВНІСТЬ ЕНЗИМОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ЛІЗОСОМНОГО ПОХОДЖЕННЯ У СЕЧІ ДІТЕЙ З ВРОДЖЕНОЮ ОБСТРУКЦІЄЮ ВЕРХНІХ СЕЧОВИХ ШЛЯХІВ

ДУ "Інститут урології НАМН України", м. Київ,
ДУ "Інститут нефрології НАМН України", м. Київ

Вроджені вади розвитку (ВВР) верхніх сечових шляхів (ВСШ), до яких переважно відносяться гідронефроз (ГН) та обструктивний мегауретер (ОМУ), на сьогодні займають одне з провідних місць в структурі всіх ВВР [7, 10]. Виникнення та прогресування обструктивного процесу у ВСШ внаслідок розладу уродинаміки та гемодинаміки супроводжується розвитком гіпоксії [4, 7], виявити яку можна при дослідженні у сечі активності ензимів каналцевого нефротелію [3, 11–13]. Найбільш діагностично значущим є дослідження у сечі активності N-ацетил-β-D-глюкозамінази (НАГ) та β-галактозидази (β-ГАЛ) лізосомного походження (НАГ — частково пов'язана з мембраною лізосом, β-ГАЛ — розчинена у матриксі цієї органели), які мають певні реноспецифічні властивості, що підтверджено високим вмістом цих ензимів у нирках — переважно у тубулярно-му епітелії, високою молекулярною масою, що набагато перевищує нирковий поріг, подібністю співвідношення ізоферментів НАГ у сечі здорових осіб із їх співвідношенням у тканині нирок, а не у сироватці крові тощо [5, 9, 11–13].

Мета роботи — оцінити за математичними розрахунками діагностичну інформативність визначення НАГ та β-ГАЛ у сечі дітей з ГН та ОМУ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежено 115 дітей (від 3 міс. до 16 років): 74 дитини з ГН, з них 56 хворих з одnobічною та 18 хворих з двобічною патологією, 24 дитини з ОМУ, з них з 13 хворих з одnobічною та 11 хворих з двобічною патологією, 17 дітей з вродженою одnobічною уропатією ВСШ, у яких пренатально була діагностована уретеропієлокалікоектазія, та 20 практично здорових дітей того ж віку з нормальними аналізами крові та сечі та без захворювань нирок і сечовивідних шляхів в анамнезі (контроль). Сечу для аналізу брали з сечового міхура (до операції) та з ниркової миски або сечоводу (під час операції). Пацієнтів було поділено на групи залежно від особливостей діагнозу (ГН чи ОМУ), розповсюдженості патологічного процесу (одно- або двобічного) та залежно від рівня забору сечі (з сечового міхура чи з ниркової миски або сечоводу).

Активність ферментів, що досліджувалися, визначали у разовій порції ранкової сечі. За основу визначення активності НАГ та β-ГАЛ взято колориметричний метод О.О.окровського зі співавт. (1971 р.), адаптований нами для визначення у сечі [4]. Активність ферментів виражали у відносних одиницях — у мкмольх р-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години інкубації при 37°C, із розрахунку на 1 ммоль креатиніну сечі (мкмоль/год/ммоль креатиніну).

За загальноприйнятими формулами розраховували такі показники:

- *діагностичну чутливість* (ДЧ, %) — вірогідність того, що у хворої особи буде одержано позитивний результат тесту,

$$ДЧ = \frac{ІП}{(ІП + ХН)} \cdot 100\%$$

де ІП — істинно позитивні результати, ХН — хибно негативні результати;

- *діагностичну специфічність* (ДС, %) — вірогідність того, що у здорових осіб буде одержано негативний результат тесту:

$$ДС = \frac{ІН}{(ІН + ХП)} \cdot 100\%$$

де ІН — істинно негативні результати, ХП — хибно позитивні результати;

- поєднуючи ці показники, розраховували *діагностичну ефективність* (ДЕ, %), або точність методу — вірогідність правильного виявлення хворих та здорових осіб:

$$ДЕ = \frac{(ІП + ІН)}{(ІП + ХП + ІН + ХН)} \cdot 100\%$$

Крім того, розраховували такі допоміжні критерії, що характеризують надійність, з якою результати дослідження можуть бути оцінені як