

ОЦЕНКА ГЛИКОГЕМОГЛОБИНА ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

**Акулич Н.В., *Сяхович В.Э., *Костин Д.Г., *Походня Ю.Г.,*

Прадун С.А., **Сорока А.В., *Зинчук В.В.*

**Национальная антидопинговая лаборатория,*

***УО «Белорусский государственный экономический университет»,*

****УО «Гродненский государственный медицинский университет»*

а/г Лесной, Минск, Гродно, Беларусь

Резюме. *Материал публикации касается разработки метода оценки уровня гликогемоглобина эритроцитов методом проточной цитометрии. Наш метод основан на внутриклеточном обнаружении антигена HbA_{1c}. Содержание гликогемоглобина в эритроцитах может использоваться как чувствительный и специфический индикатор избытка глюкозы во внутренней среде организма.*

THE EVALUATION OF ERYTHROCYTE GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN BY FLOW CYTOMETRY

**Akulich N.V., *Syakhovich V.E., *Kostsin D.G., *Pakhadnia Y.G., *Pradun*

*S.A., **Soroka A.V., ***Zinchuk V.V.*

**National Antidoping Laboratory,*

***Belarusian State Economic University,*

****Grodno State Medical University*

Lyasny, Minsk, Grodno Belarus

We propose the new flow cytometric method for the detection glycosylated hemoglobin. Our method was aimed to the cellular detection of HbA_{1c} antigen. The erythrocyte glycosylated hemoglobin content may be used as sensitive and specific indicators of glucose abuse in the internal environment.

Введение. Гемоглобин A_{1c} (HbA_{1c}) – один из специфических подтипов гликированного гемоглобина. Транспорт глюкозы в эритроциты не зависит от инсулина, и осуществляется при помощи переносчика глюкозы GLUT 1. В каждом эритроците гликированный гемоглобин образуется со скоростью, которая прямо пропорциональна окружающей концентрации глюкозы [4]. Минорная форма гемоглобина человека A_{1c} является продуктом посттрансляционной модификации гемоглобина A1 глюкозой по β и α-цепям, а также по ε-аминогруппам боковых цепей аминокислот. Данную модификацию можно рассматривать в качестве белка-маркера сахарного диабета [3]. В настоящее время HbA_{1c} используется как общепринятый показатель оценки состояния и степени компенсации углеводного обмена, поскольку позволяет проследивать уровень гликемии в широком временном диапазоне [1, 5, 6, 8]. Углеводная модификация HbA_{1c} изменяет способность гемоглобина связывать аллостерические эффекторы, и оказывает существенное влияние на функцию эритроцитов [6-7].

Определение концентрации HbA_{1c} в сочетании с оценкой глюкозы крови является золотым стандартом при диагностике сахарного диабета и мониторинга его течения [5, 8]. Существующие на сегодняшний день

стандартные методы анализа HbA_{1c} проводят оценку гликированного гемоглобина, полученного из эритроцитов периферической крови, без учета их зрелости [1-3, 6], что снижает ценность диагностики и не дает своевременной информации о реакции пациента на лечение. Следовательно, необходима методика, позволяющая оценить содержание HbA_{1c}, учитывающая продолжительность циркуляции эритроцитов. Целью исследования является разработка метода оценки содержания гликогемоглобина в эритроцитах методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. Исследования проводилось на базе Учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория». Проведено 14 серий исследований. Забор крови добровольцев производился с использованием ЭДТА K₂. Кровь была подвергнута лейкофильтрации при сборе, после чего были получены суспензии эритроцитов в соответствии со стандартными процедурами подготовки. Каждая доза эритроцитов (400 мл ± 5%) хранилась 4 недели в пластиковом пакете, предварительно заполненном PAGGSM, с концентрацией глюкозы: 100 и 260 мг/дл. В одной из групп наблюдения нами создавались условия, характеризующиеся высоким (260 мг/дл) уровнем глюкозы на начальном этапе эксперимента, который затем был снижен до 120 мг/дл на 3-4 неделях эксперимента. Необходимость моделирования разного содержания глюкозы в растворе для консервирования эритроцитов связана с приближением этой модели к физиологическим колебаниям уровня глюкозы крови.

Для фиксации и пермеабиллизации эритроцитов использовались растворы на основе глутарового альдегида и додецилсульфата натрия. Для оценки уровня HbA_{1c} использовали первичные мышинные антитела. Для выявления первичных антител к HbA_{1c} использовались вторичные козы антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488. Для статистического анализа использовались непараметрические методы. Изменения считались значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение. В качестве метода оценки содержания гемоглобина в эритроците, напрямую влияющего на количество гликированного гемоглобина, использовали величину прямого светорассеяния, которая тесно коррелирует со средним содержанием гемоглобина в эритроцитах (MCH), отражает степень насыщения эритроцита гемоглобином. MCH является переменным параметром, зависящим от размера эритроцита.

Самая низкая концентрация глюкозы крови консервирующего раствора вызывала наименьший рост (39 о.е.) интенсивности флуоресценции HbA_{1c}, при этом ширина полувысоты пика составила 83 о.е. Максимальная концентрация глюкозы крови консервирующего раствора, используемая в этой серии исследований, приводила к значительному росту интенсивности флуоресценции HbA_{1c} эритроцитов, достигая 227 о.е. ($p < 0,02$), при этом ширина полувысоты пика (RDW_Hb) была наименьшей – 74 о.е. Переменный уровень глюкозы консервирующего раствора сопровождался наибольшими различиями в содержании гликогемоглобина эритроцитов, значение RDW_HbA_{1c} составляло 115 о.е. При этом среднее значение интенсивности флуоресценции

HbA_{1c} эритроцитов не превышало 82 о.е., что было выше, чем в условиях инкубации крови с нормальным уровнем глюкозы ($p < 0,05$).

Таким образом, установленные в нашем исследовании закономерности увеличения HbA_{1c} при хранении крови в условиях гипергликемии позволяют использовать нашу методику не только для мониторинга средне-/ долгосрочных уровней глюкозы в крови, но и оценивать колебания ее уровня в течение предшествующих 15-30 дней, что существенно меньше, чем при использовании традиционных методик гликемического контроля у пациентов с сахарным диабетом [5, 7].

Список литературы

1. Candidate reference methods for hemoglobin Alc based on peptide mapping / U. Kobold [et al.] // Clin Chem. – 1997. – Vol. 43. – P. 1944–1951.
2. Correlation of glucose regulation and hemoglobin Alc in diabetes mellitus / R. Koenig [et al.] // N Engl J Med. – 1976 – Vol. 295. № 8. – P. 417–420.
3. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart. Association / S. M. Grundy [et al.] // Circulation. – 1999. – Vol. 100. – № 10. – P. 1134-1146.
4. Luthra, M., Balasubramanian D. Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins / M. Luthra, D. Balasubramanian // J Biol Chem. – 1993. – Vol. 268. – № 24. – P. 18119-18127.
5. Miedema, K. Standardization of HbAlc and Optimal Range of Monitoring / K. Miedema // Clin Lab Invest Scand. – 2005. Vol. – 240. – P. 61-72.
6. Reynolds, T., Smellie W., Twomey P. Glycated haemoglobin (HbAlc) monitoring / T. Reynolds, W. Smellie, P. Twomey // BM. – 2006. – Vol. 333. – № 7568. – P. 586-588.
7. Zannad, F. Diabetes clinical trials: helped or hindered by the current shift in regulatory requirements? / F. Zannad [et al.] // Eur. Heart J. – 2012. – Vol. 33. – P. 1049–1057.
8. Современные подходы к исследованию гликированного гемоглобина в клинической практике / А. П. Шепелькевич [и др.] – Здоровоохранение. – 2014. – № 11. – С. 11– 14.