Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

**КУРСОВАЯ РАБОТА**

 Тема: Значение и методы определения НвА1 в крови 9

по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

ПМ 03 Проведение лабораторных биохимических исследований

МДК03.01 Теория и практика лабораторных биохимических исследований9

Студент \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Козакова. Ю.В9

Подпись, дата Фамилия, инициалы

Преподаватель \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Кузовникова. И.А Подпись, дата Фамилия, инициалы

Работа оценена: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Оценка, подпись преподавателя

СОДЕРЖАНИЕ

[ВВЕДЕНИЕ 3](#_Toc54543256)

[ГЛАВА 1. Общая характеристика гликозилированного гемоглобина 5](#_Toc54543257)

[1.1 Строение НвА1 5](#_Toc54543258)

[1.2 Состав и функции НвА1. 5](#_Toc54543259)

[1.3 Классификация и типы НвА1 8](#_Toc54543260)

[ГЛАВА 2. Клинико-диагностическое значения гликозилированного гемоглобина 11](#_Toc54543261)

[2.1 Изменение НвА1 при различных патологических состояниях 11](#_Toc54543262)

[ГЛАВА 3. Методы исследования гликозилированного гемоглобина 13](#_Toc54543263)

[3.1 Преаналитический этап 13](#_Toc54543264)

[3.2 Методы определения НвА1 14](#_Toc54543265)

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 19](#_Toc54543266)

[СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 20](#_Toc54543267)

## ВВЕДЕНИЕ

Гликировaнный гемoглoбин, или гликогемoглобин (кратко обoзначaется: A1c, HbA1c), - биoхимический покaзатель крови, отрaжaющий срeднее содeржaние сaхaрa в крови за длитeльный пeриод (от трёх до четырёх месяцев), в отличиe от измeрeния глюкoзы крoви, кoтoрoе дaет прeдставлeние oб урoвне глюкoзы крoви тoлько на мoмент исследoвания.

Гликирoвaнный гeмoглобин oтрaжaет прoцeнт гемoглoбина крoви, неoбратимо сoединённый с мoлекулами глюкoзы. Гликирoванный гемoглобин oбразуется в результaте реaкции Майярa между гемoглобином и глюкoзой крoви. Пoвышение уровня глюкозы крови при сaхaрном диaбете значительно ускоряет данную реaкцию, что привoдит к повышению урoвня гликировaннoго гемoглобина в крoви. Время жизни крaсных крoвяных телец (эритрoцитов), котoрые сoдержат гемоглобин, составляет в среднем 120 - 125 суток. Именно поэтому уровень гликированного гемоглобинa отражaет средний уровень гликемии на протяжении примерно трёх месяцев.

Гликировaнный гемоглобин - это интегрaльный показaтель гликемии за три месяца. Чем выше уровень гликировaнного гемоглобинa, тем выше былa гликемия за последние три месяца и, соответственно, больше риск развития осложнений сaхaрного диабетa.

Наряду сo стoль высoкой распрoстраненностью Сахарнoго диaбета является и oдной из оснoвных причин раннeй инвалидизации и смeртности бoльных трудoспособного возрастa. Дaнная кaтегория пациентов имеет повышенный риск ампутaции нижних конечнoстей по повoду гангрeны, развившейся на фoне артериaльной и венoзной недoстаточности.

Цель курсовой работы является изучение биохимического показания НвА1 в крови.

В соответствии с целью курсовой работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить общую характеристику, строение, функции.

2. Изучить изменения НвА1 и современные методы их определения.

**Объект исследования**: показатели клинико-диагностической лаборатории.

**Предмет**: биохимические методы.

**Место реализации**: Фармацевтический колледж КрасГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого

**Срок выполнения**: 17.10.2020 -

## ГЛАВА 1. Общая характеристика гликозилированного гемоглобина

## Строение НвА1

Гликозилированный гемоглобин (употребляется также термин «гликированный гемоглобин») образуется в результате неферментативного присоединения глюкозы к N - концевым участкам β - цепей глобина гемоглобина А1 и обозначается как HbA1c. Концентрация HbA1c прямо пропорциональна средней концентрации глюкозы в крови. У здоровых концентрация HbA1c в крови от 4 до 6%, у больных сахарным диабетом его уровень в 2 - 3 раза выше (в зависимости от степени гипергликемии). Образовавшийся HbA1cаккумулируется внутри эритроцитов и сохраняется в течение всего срока жизни эритроцита. Полупериод циркуляции эритроцита в кровяном русле составляет 60 суток, таким образом, концентрация HbA1c отражает уровень гликемии пациента за 60 - 90 дней до исследования.

## Состав и функции НвА1.

Гликозилированный гемоглобин является одним из наиболее важных показателей углеводногообмена. Современное качественное лабораторное оборудование позволяет выполнить этот сложный анализ за несколько минут.

Определение гликозилированного гемоглобина применяется для диагностики латентной (скрытой) формы сахарного диабета, когда у человека еще нет явных клинических проявлений этого заболевания, так как это исследование позволяет оценить средний уровень глюкозы в крови за последние 2-3 месяца до взятия крови на анализ.

Не менее важно определение уровня гликированного гемоглобина для больных сахарным диабетом, потому что его количественное содержание в крови отражает качество компенсации обменных процессов у больных сахарным диабетом.

Таким образом, гликированный гемоглобин является основным показателем для ретроспективной оценки декомпенсации больных сахарным диабетом в момент обследования, а также для контроля эффективности лечения больных сахарным диабетом и оценки у больных риска осложнений.

Гликированный гемоглобин - это гликозилированная форма присутствующего в эритроцитах гемоглобина. Он образуется поеттрансляционно (т.е. после выхода из мест биосинтеза) вследствие «нагрузки» обычного гемоглобина глюкозой (в тканях, сосудистом русле). Глюкоза вступает вовзаимодействие с белками (в том числе с гемоглобином) с образованием шиффовых оснований. Этот неферментативный процесс протекает в течение всей жизни эритроцита - около 120 дней.

Степень гликозидации гемоглобина отражает средний уровень глюкозы в период 4-6 недель до взятия крови на анализ. Так как скорость гликозилирования и количество гликозилированных белков зависят от величины и длительности гипергликемии, измерение концентрации гликозилированного гемоглобина позволяет ретроспективно оценить выраженность гипергликемиипри сахарном диабете.

Всякое (даже кратковременное) увеличение концентрации глюкозы в крови оставляет своеобразный «след» в виде повышенного содержания гликированного гемоглобина в крови.

Гликированный гемоглобин - НвА1 состоит из З-х компонентов: НвА1а, НвА1в, НвА1с. Количественно преобладает НвА1с. У здоровых взрослых людей на долю НвА приходится 90%, на долю НвА1 приходится 6%, из которых 3,6% составляет НвА1с. У больных сахарным диабетом уровень этого белка повышен в 2-3 раза.

Функции:

Образуется в результате медленной неферментативной химической реакции гемоглобина А, содержащегося в эритроцитах, с глюкозой крови. Скорость и объем этой реакции зависят от среднего уровня глюкозы на протяжении жизни эритроцита. Существует несколько вариантов образующихся продуктов - гликированных гемоглобинов: НbA1a, HbA1b, HbA1c, Последняя форма количественно преобладает и дает более тесную корреляцию со степенью выраженности сахарного диабета. Гликированный (гликозилированный) гемоглобин отражает гипергликемию, имевшую место на протяжении периода жизни эритроцитов (до 120 сут). Эритроциты, циркулирующие в крови, имеют разный возраст, поэтому для усредненной характеристики уровня глюкозы ориентируются на полупериод жизни эритроцитов - 60 суток. Таким образом, уровень гликированного гемоглобина показывает, какой была концентрация глюкозы в предшествующие 4-8 недель и является показателем компенсации углеводного обмена на протяжении этого периода. Нормализация уровня гликированного гемоглобина в крови происходит на 4-6 неделе после достижения нормального уровня глюкозы. У больных сахарным диабетом уровень этого соединения может быть повышен в 2-3 раза. В соответствии с рекомендациями ВОЗ этот тест признан оптимальным и необходимым для контроля сахарного диабета. Больным сахарным диабетом рекомендуется проводить исследование уровня гликированного гемоглобина не менее одного 1 раза в квартал. Значения могут различаться между лабораториями в зависимости от применяемого аналитического метода, поэтому контроль в динамике лучше проводить в одной лаборатории или тем же методом.

При контроле за лечением диабета рекомендуется поддерживать уровень гликированного гемоглобина менее 7% и пересматривать терапию при содержании гликированного гемоглобина более 8% (указанные значения применимы только для сертифицированных методов с референсными пределами 4-6%). Клинические исследования с использованием сертифицированных методов показывают, что рост доли гликированного гемоглобина на 1% связан с изменением, в среднем, уровне глюкозы плазмы примерно на 2 ммоль/л Гликированный гемоглобин используется как показатель риска развития осложнений диабета. Снижение доли гликированного гемоглобина на 1/10 связано с примерно 45% снижением риска прогрессии диабетической ретинопатии.

## Классификация и типы НвА1

Гликированный гемоглобин есть у всех людей. Разница между здоровыми и лицами с диабетом только в его концентрации. Этот показатель отображает, насколько правильно в организме проходят процессы углеводного обмена. Если есть сбои и уровень сахара повышен, то и показатель будет больше нормы.

Эти цифры можно использовать для обнаружения скрытого диабета, ведь параметр отображает уровень сахара не в конкретный момент, когда его легко понизить, а за 3 месяца. Он важен во время лечения, для отслеживания состояния пациента.

Чтобы не ухудшить свое состояние, нужно знать не только, что означает гликированный гемоглобин в крови, но и знать свою норму.

Показатель зависит от возраста:

Для подростков и людей до 30 лет нормой считается показатель, который не превышает 6,5%.

В среднем возрасте (от 30 до 50 лет) параметр не должен превышать 7%.

Для людей пожилого возраста, которые старше 60 лет, допустимо повышение до 7,5%, но не более.

У здорового ребенка показатель такой же, как и у взрослых. Его нормальные рамки от 4,5 до 6%. Если обнаружены отклонения от указанных норм, необходимо дополнительно пройти обследование, чтобы установить, почему уровень сахара в крови повышен. Обычно при показателях 6,1-6,4% (врачи называют это состояние преддиабетом) контроль здоровья нужно усиливать.

Если никаких подозрений на диабет нет, то достаточно проходить такую проверку 1 раз в 2-3 года. Если показатель зафиксирован на повышенном уровне, это значит, что проверку нужно проходить каждый год. В зависимости от развития заболевания, врач может порекомендовать пациенту с диабетом сдавать анализ каждые 3 или 6 месяцев.

Гликированный гемоглобин (HbA1c) - специфическое соединение гемоглобина эритроцитов с глюкозой, концентрация которого отражает среднее содержание глюкозы в крови за период около трёх месяцев.

Гемоглобин - это находящийся внутри эритроцитов белок, переносящий кислород. Существует несколько типов нормального гемоглобина, кроме того, идентифицировано много аномальных разновидностей, преобладающая форма - это гемоглобин А, составляющий 95-98 % от общего гемоглобина. Гемоглобин А подразделяется на несколько компонентов, один из которых А1с. Часть циркулирующей в крови глюкозы спонтанно связывается с гемоглобином, образуя так называемый гликированный гемоглобин. Чем выше концентрация глюкозы в крови, тем больше образуется гликированного гемоглобина. Соединившись с гемоглобином, глюкоза остается «в связке» с ним до самого конца жизни эритроцита, то есть 120 дней. Соединение глюкозы с гемоглобином А называется HbA1c или A1c.

Гликированный (употребляется так же термин «гликозилированный») гемоглобин присутствует в крови и у здоровых людей в небольшом количестве. Скорость этой реакции и количество образующегося гликированного гемоглобина зависят от среднего уровня глюкозы в крови на протяжении срока жизни эритроцитов.

Результаты теста могут быть ложно изменены при любых состояниях, влияющих на срок жизни эритроцитов крови. Например, кровотечения или гемолиз вызывают ложное снижение результата.

Анализ на HbА1 с не отражает резкие изменения концентрации глюкозы в крови, поэтому колебания глюкозы у пациентов с лабильным диабетом не будут выявлены данным тестом.

Интерпретация результата может быть затруднена из-за присутствия вариантных форм гемоглобина (напрмер, наличие гемоглобина А2 при бета-талассемии, фетального гемоглобина у детей до 6 мес.), поэтому исследование не рекомендуется проводить у детей до 6 месяцев.

## ГЛАВА 2. Клинико-диагностическое значения гликозилированного гемоглобина

## 2.1 Изменение НвА1 при различных патологических состояниях

Показания к назначению анализа:

1.Диагностика и скрининг сахарного диабета;

2.Долговременный мониторинг течения и контроля за лечением больных сахарным диабетом;

3.Определение уровня компенсации сахарного диабета;

4.Дополнение к глюкозотолерантному тесту при диагностике преддиабета, вялотекущего диабета;

5.Обследование беременных женщин (скрытый диабет).

Отклонения уровня гликированного гемоглобина от нормы

Повышение уровня HbA1:

1. Сахарный диабет и другие состояния с нарушенной толерантностью к глюкозе;

Определение уровня компенсации:

* 5.5-8% - хорошо компенсированный сахарный диабет;
* 8-10 % - достаточно хорошо компенсированный сахарный диабет;
* 10-12% - частично компенсированный сахарный диабет;
* >12% - некомпенсированный сахарный диабет);

2. Дефицит железа;

3. Спленэктомия.

Снижение уровня НвА1

1. Снижения уровня сахара в крови (гипогликемия);
2. Усиленной продукции красного кровяного пигмента, то есть, гемоглобина;
3. Активации деятельности системы кроветворения (эритропоэза) после потери крови;
4. Усиленного разрушения эритроцитов при некоторых патологических состояниях (гемолитическая анемия);
5. Кровоизлияний (острых и хронических);
6. Почечной недостаточности;
7. Гемотрансфузий.

Результаты теста могут быть ложно изменены при любых состояниях, влияющих на средний срок жизни эритроцитов крови.

Ложное повышение может быть обусловлено высокой концентрацией фетального гемоглобина (HbF),

Ложное снижение результата вызывают кровотечения, гемолиз, гемотрансфузии;

## ГЛАВА 3. Методы исследования гликозилированного гемоглобина

## 3.1 Преаналитический этап

Взятие материала для лабораторных исследований должно проводиться до принятия обследуемым пищи (натощак). Последний прием пищи за 8-12 часов до взятия. Исключением из этого правила являются исследования, которые проводятся при неотложных состояниях, в любое время, но с учетом этого фактора.

Время взятия с 8 до 10 ч утра при плановых исследованиях и в любое время для срочных случаев диагностики (неотложные состояния). Не допустим забор крови для плановых биохимических исследований накануне вечером.

Исключение приема алкоголя должно быть не менее, чем за 24 ч до взятия биоматериала.

Лекарственные средства существенно влияют на результаты лабораторных исследований различным образом. Поэтому при подготовке обследуемых к проведению лабораторных исследований приняты следующие подходы:

• лекарственные средства, мешающие определению компонентов, исключаются до взятия биоматериала, если они даются не по жизненным показаниям;

• утренний прием лекарственных средств проводится только после взятия биоматериала;

• взятие крови с диагностической целью проводится перед проведением инфузии лекарственных средств и растворов.

Взятие биоматериала осуществляется до проведения диагностических или лечебных процедур: операций, инфузий, переливаний крови, растворов, пункций, инъекций, биопсий, общего массажа тела, эндоскопии, физических нагрузок, выполнения ЭКГ, рентгеновского обследования.

Во время проведения глюкозотолерантного теста (тест с нагрузкой глюкозой) не должно проводится никаких других манипуляций, в том числе диагностических.

Значительная физическая и мышечная нагрузка должны быть исключены как минимум за 3 дня до взятия биоматериала.

Уровень гликированного гемоглобина не зависит от времени суток, физических нагрузок, приёма пищи, назначенных лекарств, эмоционального состояния пациента. Состояния, вызывающие укорочение среднего «возраста» эритроцитов (после острой кровопотери, при гемолитической анемии), могут ложно занижать результат теста.

## 3.2 Методы определения НвА1

За последнее десятилетие для определения содержания гликогемоглобина были разработаны и нашли практическое применение ряд аналитических методов, такие как:

1) жидкостная хроматография;

2) аффинная хроматография;

3) электрофорез;

4) колоночные методики;

5) нефелометрический и турбидиметрический анализ;

6) иммунологические методики.

Хроматография - метод разделения веществ и определения их физико-химических характеристик, основанный на различии скоростей движения и размывания концентрационных зон исследуемых компонентов, которые движутся в потоке подвижной фазы, причем исследуемые вещества находятся в обеих фазах. Необходимым условием разделения является различие между подвижной и неподвижной фазой в равновесном распределении или кинетике его установления для анализируемых соединений.

Чаще всего для определения HbA1c используется аффинная хроматография. Она основана на установлении обратимых молекулярных взаимодействий, присущих биологически активным веществам, в частности гемоглобину.

Аффинная хроматография - разновидность адсорбционной, при которой связывание происходит в соответствии со специфическими свойствами двух молекул. Взаимодействие происходит за счет разных сил: ионных, водородных, гидрофобных и других в зависимости от конформации и размера молекул.

В аффинной хроматографии используется нерастворимый носитель, на котором иммобилизуется соединение, называемое лигандом; он особым образом связывает подлежащий очистке продукт, находящийся в подвижной, обычно жидкой фазе. Лиганд удерживается за счет ковалентных связей, иногда пользуются ионным обменом, адсорбцией и др.

Раствор, в котором находятся молекулы, вступает в контакт с неподвижным лигандом. Из всех веществ удерживаются те, чьи молекулы способны соединяться с лигандом.

Разрыв связей может происходить за счет действия агента, связывающегося с молекулой вместо лиганда, или агента, способного связываться с лигандом вместо молекулы.

В методе микроколоночной хроматографии используется цельная стабилизированная кровь. Гемолизат цельной крови, нанесенный на хроматографическую микроколонку, элюируется фосфатным буфером с низкой ионной силой. При этом НbA1c задерживается катионообменной смолой, а НbA1a, НbA1b и липиды вымываются. Последующее элюирование буфером с более высокой ионной силой позволяет собрать фракцию, содержащую НbA1c, и определить ее оптическую плотность. Измерение оптической плотности неэлюированного гемолизата, величина которой соответствует общей концентрации гемоглобина, позволяет рассчитать уровень НbA1c в процентах от общей концентрации гемоглобина.

Метод определения содержания HbA1c, признанной золотым стандартом, основан на аффинной хроматографии. Заполняющий микроколонки сорбент обеспечивает на первой стадии специфическое связывание HbA1c (фракция Б) и его отделение от негликозилированной фракции (фракция А). На второй стадии происходит полное вытеснение гликозилированной фракции за счет вымывания из сорбента растворителем.

В нефелометрическом и турбидиметрическом анализе используется явление рассеяния света твердыми частицами, находящимися в растворе во взвешенном состоянии.

Пробу освещают потоком света с интенсивностью I0, а затем, так же как в молекулярной абсорбционной спектроскопии, измеряют интенсивность прошедшего излучения It или определяют интенсивность излучения, рассеянного под определенным углом (например, I90 при 90°). С ростом числа частиц суспензии отношение It/I0 уменьшается, а отношения вида I90/I0 увеличиваются, во всяком случае до умеренных концентраций. Для очень разбавленных суспензий измерение под углом гораздо чувствительнее, чем измерения, когда источник и приемник излучения находятся на одной линии, поскольку при этом можно наблюдать слабый рассеянный свет на темном фоне.

Метод, в котором используют интенсивность прошедшего света It, называют турбидиметрией, а метод с измерением под углом 90° (или каким-либо другим) - нефелометрией. При турбидиметрических измерениях величина, называемая мутностью, соответствует оптической плотности и может быть определена из соотношения, аналогичного основному закону светопоглощения: S = lg (I0/I) = k b N, где S - мутность; k - коэффициент пропорциональности, называемый коэффициентом мутности; b - длина пути; N - число рассеивающих частиц в единице объема.

Для турбидиметрических измерений можно использовать любой фотометр или спектрофотометр. Если растворитель и рассеивающие частицы бес­цветны, максимальная чувствительность достигается при использовании излучения голубой или ближней ультрафиолетовой области. Для окрашенных систем оптимальную длину волны необходимо подбирать экспериментально.

Используемое в нефелометрии расчетное соотношение следующее: I = Ka c I0, где Ka - эмпирическая константа системы (a - угол, под которым проводят измерения); с - концентрация.

Конструкции приборов для нефелометрических и люминесцентных измерений идентичны, поэтому любой флуориметр можно использовать в качестве нефелометра. Многие серийные флуориметры снабжены специальными приспособлениями для нефелометрических измерений. Недостатком методов, основанных на измерении рассеяния света, является то, что на измеряемый сигнал сильно влияет размер частиц. Поэтому необходимо строгое соблюдение идентичности условий построения градуировочного графика и анализа исследуемого раствора. Можно сказать, что и нефелометрия, и турбидиметрия могут быть полезными для селективных аналитических реакций, в результате которых образуется твердое соединение.

Иммунологические методы основаны на иммунохимических реакциях и в дальнейшем анализируются иммунотурбидиметрическим либо иммуноколориметрическим методом. Наборы представляют собой жидкие, полностью готовые к использованию, стабильные ре­агенты. В основе определения HbA1c наборами реагентов лежит взаимодействие антител с антигенами с образованием иммунокомплексов, приводящее к изменению оптической плотности реакционной среды. Принцип метода следующий.

К образцу крови добавляют реагент буфер/антитела, при этом HbA1c в образце реагирует с анти-HbA1-антителами и формирует растворимый комплекс «антиген - антитело». Специфические антитела HbA1c присутствуют только на молекуле HbA1, поэтому образования комплекса не происходит. При добавлении буфер/полигаптена запускается реакция взаимодействия полигаптенов с избытком анти-HbA1c-антител с формированием нерастворимого комплекса «антитело - полигаптен», который может быть измерен турбидиметрически. Наборы легко адаптируются на все автоматические и полуавтоматические анализаторы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

## Из выше использованного материала сделаны следующие выводы:

## 1. Изучены общая характеристика, строение и функции НвА1.

## 2. Изучены диагностическая значимость НвА1 и современные методы исследования. Жидкостная хроматография; аффинная хроматография; электрофорез; колоночные методики; нефелометрический и турбидиметрический анализ; иммунологические методики.

До недавнего времени врачи считали, что НвА1 не нужно использовалось для установления сахарного диабета. Сейчас установлено, что НвА1 позволяют предотвратить появление сахарного диабета на ранних стадиях и диабетических осложнений, таких как: склерозирование сосудов, поражение сетчатки глаза, нарушение функций печени и почек.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом (5-й выпуск). - Сахарный диабет, 2011, №3, Приложение 1, с, 4 -72.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А. Федеральная целевая программа «Сахарный диабет». // Москва, 2017, 84 С.
3. Питерс - Хармел Э., Матур Р. Сахарный диабет. Диагностика и лечение. // Практика, 2016.
4. Попова Ю.С. Сахарный диабет. // Крылов, 2016.
5. Федеральная целевая программа "Сахарный диабет". Методические рекомендации. М., 2015.