

GLIKOZILÁLT HEMOGLOBIN MEGHATÁROZÁS

A normál felnőtt hemoglobin 90 %-a a hemoglobin A (HbA), amely két α -globin és β -globin lánc tetramerje. Mindegyik alegység tartalmaz egy hem prosztetikus csoportot. A minor hemoglobinok között található a glikohemoglobin (HbA₁). Ezek a HbA glikozilált származékai. A leggyakoribb formája a HbA_{1c}, melyben a β -globin lánc N-terminális valin amino csoportjához kapcsolva glukóz egységet találunk. A HbA glikozilálása az eritrociták teljes élettartama alatt folyamatosan végbemenő nem-enzimatis reakció.

Normál esetben a hemoglobin mintegy 7 %-a van glikozilálva, de cukorbetegekben a normál érték 2-3-szorosa is lehet.

Bár a glikohemoglobinok pontos klinikai jelentősége még mindig nem tisztázott, a HbA₁ szint mérése mégis lényeges, mert mennyisége arányos a hosszabb idő alatti átlagos vércukor koncentrációval, és gyakorlatilag nem befolyásolják a mintavételt megelőző étkezés, a fizikai aktivitás, illetve a mintavételt megelőzően közvetlenül bevett anti-diabetikus gyógyszerek.

A módszer elve:

A gyakorlaton a glikozilált hemoglobin meghatározásra Flückiger és Winterhalter módszerének módosított változatát használjuk.

A hemoglobin primer amino-csoportjaihoz kötött glukóz savas katalitikus hőkezeléssel 5-hidroximetil-furfural alakban lehasítható. Ez a vegyület jól értékelhető színreakciót ad tiobarbitursavval.

Reagensek:

- 1.) Hemolizáló oldat: 1 %-os detergens oldat
- 2.) Kénsav-arsenát oldat: 0,3 N kénsavban oldott 0,01 M dinátriumhidrogén-arsenát
- 3.) Triklórecetsav oldat: triklór-ecetsav 40 %-os desztillált vizes oldata
- 4.) Tiobarbitursav oldat: 0,025 M tiobarbitursav 0,01 M nátriumhidroxidban oldva

A hemolizáló oldatot (1) 10-szeresre hígítjuk a mérés napján desztillált vízzel.

Eszközök:

kémcsövek, pipetták, küvetták

A gyakorlat kivitelezése:

A minta előkészítése:

5,0 ml EDTA-val vagy heparinnal alvadásgátolt vért lecentrifugálunk, majd a plazma leszívása után a sejtüledéket háromszor mossuk 10 ml fiziológias sóoldattal. A vörösvérsejt üledéket másfél térfogat előzőleg tízszeresére hígított hemolizáló oldattal összerázva hemolizáljuk. Egy órai állás után a hemoglobin koncentrációt meghatározzuk és 0,1 %-os hemolizáló oldattal történő hígítással beállítjuk a megfelelő hemoglobin koncentrációt. A hemolizálás után a minták 3 napig 4 °C-on tarthatók.

A gyakorlaton a standard (normál és patológiás) savókkal dolgozunk.

A vizsgálat menete:

Hosszú számozott kémcsövekbe mérjük az alábbi oldatokat:

Anyagok	1	2	3
Normál minta	-	1 ml	-
Patológias minta	-	-	1 ml
Desztillált víz	1 ml	-	-
Kénsav-arzenát	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Összerázzuk és 50 percen át forrásban levő vízfürdőben inkubáljuk a hosszú kémcsöveket. Inkubálás után 30-40°C-ra hűtjük az oldatot, majd

Triklór-ecetsav oldat	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
-----------------------	--------	--------	--------

A triklór-ecetsav oldatot cseppenként adjuk az elegyhez, miközben a szuszpenziót kevertetjük. A mintát tartalmazó oldatokat Eppendorf csövekben centrifugáljuk (10000 rpm, 5 perc). A felülúszóból újabb számozott kémcsövekbe mérünk:

	1.	2.	3.
Felülúszó	1 ml	1 ml	1ml
Tiobarbitursav oldat	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml

Összekeverjük, és 35 percig 40^o-on inkubáljuk az elegyeket, majd szobahőmérsékletre hűtjük.

A minták fényelnyelését 443 nm-en vakkal szemben olvassuk le szűkített küvettában 30 percen belül.

Számolás:

$$GHb\% = \frac{E}{0,006 \times Hb\%}$$

Normál érték: kb.7 % (Kittől függően más érték is lehet)

Értékelés:

Minta	GHb %
normál szérum	
patológias szérum	