

# Сравнение методов определения гликозилированного гемоглобина

В.Л. Эмануэль, И.Ю. Карягина, Ю.В. Эмануэль

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова

**О**пределение гликозилированного гемоглобина в настоящее время завоевало заслуженную популярность у эндокринологов и специалистов по клинической лабораторной диагностике, так как:

1) отражает средний уровень концентрации глюкозы в крови пациента на протяжении 2-3 месяцев, предшествовавших исследованию;

2) позволяет в большинстве случаев обойтись без проведения теста с нагрузкой глюкозой, который не всегда безопасен для больного и не может быть выполнен, если уровень глюкозы в крови натощак превышает 6,0 ммоль/л.

Объединенная комиссия IUPAC по биохимической номенклатуре рекомендует использование термина «гликирование» (glycation) для обозначения присоединения моносахарида к белку. «Гликованный» гемоглобин предпочтительнее название «glycosylated» или «glucosylated» гемоглобин [20]. Все же в отечественной и зарубежной литературе более привычным остается написание «гликозилированный», поэтому в данной работе мы будем использовать этот термин.

В настоящее время существуют разные методические приемы, большое количество наборов химических реактивов различных фирм-производителей для определения гликозилированного гемоглобина. В зависимости от принципа определения и технологии выполнения анализа клинико-диагностические лаборатории получают информацию о нескольких различающихся по составу субфракциях, обобщая их термином «гликозилированный гемоглобин» и

опираются на различные границы референтных интервалов. Не ставя задачи выбора приоритетного метода определения в ходе сравнительного анализа предложенных технологий, авторы работы преследуют цель обобщения и систематизации накопленных в литературе и собственных данных. Это, вероятно, поможет клиницистам и специалистам лабораторий лучше ориентироваться в имеющихся и новоразрабатываемых вариантах выполнения такого необходимого теста как гликозилированный гемоглобин.

## Состав гемоглобинов взрослого человека

В табл. 1 приведен самый распространенный вариант качественного и количественного состава гемоглобинов взрослого человека. Гемоглобин (Hb) состоит из 4 полипептидных цепей, каждая из которых связана с гемом. Более 90% Hb здорового взрослого человека представлена обычно аллельной формой  $A_0$ , имеющей  $2\alpha$  и  $2\beta$  полипептидные цепи. Существует множество других аллельных форм этого полиморфного белка. О некоторых из них, особенно, S и C, придется вспомнить в разделе «влияние мешающих факторов». Гемоглобин  $A_2$  и F находятся в норме в небольших количествах. Формы гемоглобина, образованные гликозилированием, то есть присоединением какого-либо моносахарида к  $NH_2$  группе концевой валина  $\beta$ -цепи, составляют в совокупности  $HbA_1$  ( $HbA_{1a}$  +  $HbA_{1b}$  +  $HbA_{1c}$ ).

Возможно также существование «не  $A_1$  гликогемоглобинов», представленных, например, небольшим количеством форм, гликозилированных по

Таблица 1. Состав гемоглобинов взрослого человека

Фракция гемоглобина	Наличие моносахаридного остатка	Структура цепей	% содержание
HbA <sub>0</sub>	-	$\alpha_2\beta_2$	>90%
HbA <sub>2</sub>	-	$\alpha_2\delta_2$	<1,5%
HbF	-	$\alpha_2\gamma_2$	<1,0%
HbA <sub>1a</sub>	фруктозо-1,6-дифосфат	$\alpha_2(\beta\text{-ФДФ})_2$	<1,0%
HbA <sub>1b</sub>	глюкозо-6-фосфат	$\alpha_2(\beta\text{-Гл.-6Ф})_2$	<1,0%
HbA <sub>1c</sub>	глюкоза	$\alpha_2(\beta\text{-Гл.})_2$	4-6%

лизинам, а не по N-концевому валину β-цепи или гликозилированных по α-цепи. Эти формы вместе с HbA<sub>1</sub> представляют собой гликогемоглобин (GHb, или «total glycohemoglobins») [11].

Предложенные в настоящее время методы определения «гликозилированного гемоглобина» выявляют разные субфракции: одни измеряют Hb<sub>1a</sub>, другие — HbA<sub>1c</sub>, третьи — общий гликогемоглобин (GHb) [17].

Необходимо отметить, что гемоглобин A<sub>1c</sub> образуется неферментативным гликозилированием в ходе двух стадий, первая из которых быстрая и обратимая, вторая — медленная, но дающая стабильный кетаминный продукт (рис. 1). Аналогично в две стадии образуются лабильные и стабильные формы других гликогемоглобинов [8].

Не все лабильные альдиминные продукты превращаются в стабильные кетоны. К тому же, их концентрация зависит от сиюминутной концентрации глюкозы [22]. Поэтому для доказательства стойкости гипергликемии желателно ориентироваться на содержание стабильного HbA<sub>1c</sub>, который постепенно накапливается в течение времени жизни эритроцита. Разработаны способы предварительного удаления лабильных форм в ходе приготовления гемолизата эритроцитов [5, 12]. При знакомстве с новым методом определения исследователю необходимо выяснить, предусмотрен ли этап устранения или от деления лабильных продуктов.

### Краткий обзор методологических подходов

Существует не менее 6 основных методологических принципов определения гликозилированного Hb. Хроматографические методы разделения минорных компонентов гемоглобина разрабатывались с середины 50-х годов XX века. В 70-е годы были предложены и модифицированы миниколоночные методы разделения гемоглобинов на ионообменных смолах, которые в конце 80-х годов получили выход в практические лаборатории лечебных учреждений наряду с миниколоночными методами, основанными на аффинной хроматографии. Все большее признание завоевывают методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и электрофореза, требующие, однако, специальной аппаратуры. Наряду с этими подходами, предусматривающими разделение субфракций гемоглобина, были разработаны колориметрические и иммунохимические методики.

### Ионообменная хроматография

Один из самых распространенных методов определения гликозилированного Hb в практических лабораториях лечебных учреждений, так как для его выполнения необходим обычный фотометр и не требуется специальная аппаратура. Миниколонки с катионообменной смолой поставляются фирмами-производителями вместе с реактивами для элюирования. В зависимости от технологии, предложенной

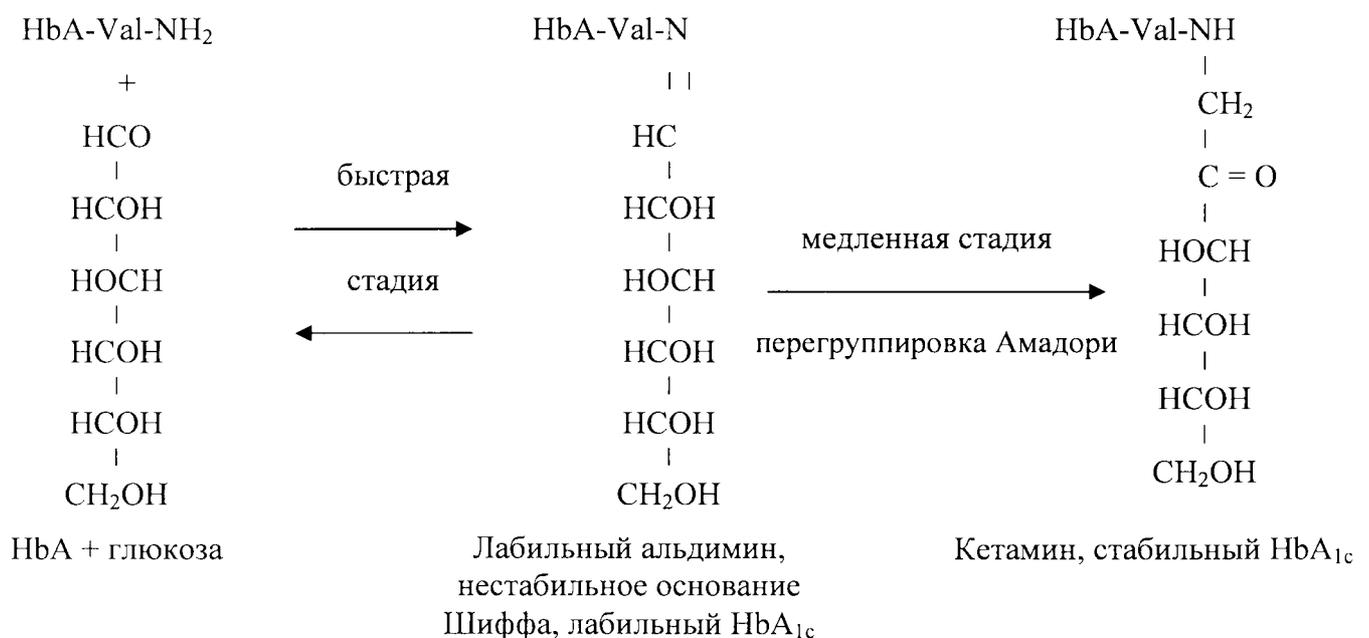


Рис. 1. Образование лабильной и стабильной форм HbA<sub>1c</sub>

изготовителем, определяется количество  $HbA_1$  ( $HbA_{1a} + HbA_{1b} + HbA_{1c}$ ) или  $HbA_{1c}$ .

Например, в микроколоночных тестах фирмы «BioRad» первый элюирующий буфер вымывает с колонки гемоглобины  $HbA_{1a}$  и  $HbA_{1b}$ . Второй буфер имеет более высокую ионную силу и элюирует с колонки  $HbA_{1c}$ . Абсорбция фракции  $HbA_{1c}$  при длине волны 415 нм сравнивается с абсорбцией общего содержания гемоглобина и выражается в процентном отношении от общего содержания [23].

Набор фирмы "Human" представляет возможность выполнить исследование намного быстрее, но в этом случае определяются суммарные фракции  $HbA_1$ . Подготовленный эритроцитарный гемолизат в течении 5 минут перемешивается с катионообменником, помещенным в обычные пластиковые пробирки. Затем используется специальный сепаратор для отделения смолы, связавшей  $HbA_0$ , от супернатанта, содержащего  $HbA_1$ .

Хотя миниколоночные ионообменные хроматографические методики относительно недороги, исследователи должны быть знакомы с рядом их особенностей. Окончательный результат чрезвычайно зависит от температурных условий выполнения теста. Наглядным примером может служить следующее распределение результатов значений  $HbA_1$  в зависимости от температуры [2]:

Температура °C	20°	21°	22°	23°	24°
$HbA_{1c}$ в %	8,9	8,0	7,2	6,5	5,9

Обычно предлагается корректировать результаты под температуру 24°C и в обязательном порядке исследовать параллельно 2-3 калибратора со стандартизованными значениями гликозилированного гемоглобина. В связи с тем, что в технологической цепи выполнения теста много ручных процедур, коэффициент вариации в таких методах колеблется в диапазоне от 3 до 14% [8]. Лабильные альдиминные продукты необходимо удалять до нанесения гемолизата на колонку, иначе они будут способствовать завышению окончательного результата. В редких случаях у пациентов с нестабильным метаболизмом глюкозы лабильный  $HbA_1$  может составлять до 30% от общего  $HbA_1$  [14]. Завышению данных способствуют также гиперлипидемия и высокая концентрация билирубина. В этих случаях рекомендуется трехкратное промывание эритроцитов изотоническим раствором хлорида натрия перед приготовлением гемолизата [7].

### Аффинная хроматография

Метод основан на способности иммобилизованной на сорбенте 3-аминофенилборной кислоты специфично связывать цис-диольную углеводную часть

гликозилированного гемоглобина. Негликозилированные гемоглобины элюируются первыми, затем из колонки вытесняется гликозилированный гемоглобин с помощью буфера, содержащего сорбитол, который конкурирует за места связывания с борной кислотой [8].

Эти методы завоевали признание в силу того, что на их окончательный результат в значительно меньшей степени влияют температурные условия. Кроме того, с борной кислотой не связываются лабильные альдиминные формы. Подобный подход используется, например, в наборе миниколоночных тестов «Фосфорсорб» (Россия).

Однако определению подлежат все стабильные гликированные формы, то есть тотальный гликогемоглобин (GHb). Поэтому референтный интервал и абсолютные окончательные результаты исследований при применении этого метода обычно выше, чем в методах, использующих разделение субфракций Hb по зарядам [15]. Миниколоночная аффинная хроматография также требует достаточно большого количества мануальных операций и относительно затратна по времени.

### Высоко-эффективная жидкостная хроматография

Референтный метод определения гликозилированного гемоглобина, обеспечивающий великолепное отделение  $HbA_{1c}$  от  $A_{1a}$ ,  $A_{1b}$ ,  $A_0$ ,  $A_2$  и F форм, а также от редко встречающихся, но мешающих во многих других методах определения) форм S и C [6]. Основным фактором, ограничивающим внедрение этого метода в практику клинико-диагностических лабораторий, является высокая стоимость оборудования для его выполнения.

### Электрофорез

Основу разделения гликозилированных и негликозилированных форм Hb составляет их разная электрофоретическая подвижность [21]. Свободные N-концы негликозилированных Hb взаимодействуют с сульфатными группами, что изменяет заряд молекул. Гемоглобины  $A_1$  не могут взаимодействовать с сульфатными группами, их заряд остается неизменным.

Электрофорез проводится на таких поддерживающих средах как агар, агароза, декстрансульфат и ацетатцеллюлоза в течении 20-40 минут [8]. Одновременно может быть проанализирована целая серия проб. Денситометрическая оценка позволяет вычислить % содержание гликозилированного  $HbA_1$ .

До недавнего времени технологические особенности выполнения электрофоретических процедур не давали возможности определять отдельно  $HbA_{1c}$ ,

а присутствие повышенного количества Hb F существенно изменяло картину разделения. Этих недостатков удалось избежать фирме «Beckman», предложившей готовые агарозные гели и реактивы для электрофоретической системы Paragon «Diatrac HbA<sub>1c</sub>» [10]. Чтобы воспользоваться данной технологией, необходимо иметь также хороший денситометр типа Apprise (США).

### Колориметрические методы

Принципиальным отличием методов является отсутствие разделения (хроматографического или электрофоретического) субфракций Hb. Количество общего GHb определяется после гидролитического отщепления моносахаридов, превращения их в 5-гидросиметилфурфурол, реагирующий с тиобарбитуровой кислотой. Продукт реакции фотометрируется при длине волны 443 нм [18].

Лабильные формы не вступают в химическую реакцию и не могут завязать результаты определения в отличие от свободной глюкозы, сахарозы и фруктозы, которые приходится удалять из образцов с помощью предварительного диализа [8, 18].

Метод довольно трудоемок, требует длительно кипячения проб, коэффициент вариации существенно зависит от навыков исследователя и тщательности соблюдения технологической цепи.

### Иммунохимические методы

Одним из самых широко распространенных иммунохимических методов определения HbA<sub>1c</sub> является метод иммуноингибирования латексной агглютинации [9]. В отсутствие HbA<sub>1c</sub> частицы латекса, покрытые моноклональными антителами к HbA<sub>1c</sub>, подвергаются агглютинации под воздействием синтетического полимера (агглютинатора). Такая среда обладает довольно высокой абсорбцией при турбидиметрическом исследовании. HbA<sub>1c</sub> конкурирует с агглютинатором за места связывания (антитела) на латексных частицах, уменьшая агглютинацию и, следовательно, абсорбцию. Степень снижения абсорбции коррелирует с уровнем HbA<sub>1c</sub>. Количественная оценка фракции производится по калибровочной кривой, построенной с помощью стандартного калибратора HbA<sub>1c</sub>. Оценка общего содержания гемоглобина, необходимая для расчета процентного содержания гликозилированного гемоглобина, выполняется колориметрическим методом по образованию основного гематина Д-575 [25].

Указанный подход используется, например, в реагентных картриджах прибора DCA 2000 фирмы «Baueg» и наборах реактивов фирмы «Roche» для биохимических анализаторов. Лабильный HbA<sub>1c</sub> не участвует в реакции, так как удаляется в ходе предварительной подготовки образца. Использование

реактивов Roche Diagnostica и программного обеспечения для выполнения методики на анализаторах предусматривает введение формулы, позволяющей пересчитать результаты анализа в строгом соответствии с данными, которые были бы получены с помощью референтного метода ВЭЖХ.

Возможность автоматизации анализа, получения результата через 6-8 минут, высокая специфичность иммунохимического метода определения HbA<sub>1c</sub> делают этот способ определения весьма привлекательным, но более дорогим, чем миниколоночные методы.

Табл. 2 содержит данные [8], которые помогают сравнить и систематизировать вышеизложенный материал по нескольким основным параметрам. Табл. 2 дает представление о том, какую неоднозначную картину результатов можно было бы получить, если воспользоваться различными вариантами анализа гликозилированного Hb в одном и том же образце.

### Сравнение результатов определения, полученных иммунохимическим и хроматографическим методом

Для примера приведем сопоставление данных, полученных нами в 51 образце крови здоровых людей, пациентов с сахарным диабетом и в контрольных материалах.

Для сравнительного анализа одного и того же образца мы использовали иммунохимический турбидиметрический метод (реактивы Roche Diagnostica, автоматический анализатор Cobas MIRA (Roche)) и хроматографический ионообменный метод, реактивы, катионообменная смола, ручная технология которого предложена фирмой «Human» (Германия). Коэффициент вариации теста составил в первом случае 3,2%, во втором — 7,8%.

При тщательном температурном контроле (24°C) выполнения хроматографического метода окончательные результаты оказались также зависимыми от типа фотометра, используемого на последней стадии анализа, и от интенсивности 5-минутного смешивания образца со смолой, возрастающая в последовательности: гематологическая мешалка, шуттель-аппарат, дозированное ручное встряхивание. При проведении многоцентрового исследования на это необходимо обращать особенное внимание, точно оговаривая каждый этап выполнения технологической цепи. Мы остановились на использовании гематологической мешалки и фотометра типа КФК-3.

Табл. 3 представляет некоторые конкретные результаты исследований (n = 20), полученные при использовании образцов с разным содержанием гликозилированного гемоглобина.

**Таблица 2.** Сравнение методов анализа гликозилированного гемоглобина

Метод	Коэфф. вариации в %	Зависимость метода от t°	Принцип разделения Hb	Тип определяемого Hb	Вмешательство лабильных форм (завышение)
ВЭЖХ	1-3	Значительная	Ионообменная хроматография	HbA <sub>1c</sub>	Только лабильный HbA <sub>1c</sub> , если не удален предварительно
Миниколоночная ионообменная хроматография	3-14	Значительная	Ионообменная хроматография	*HbA <sub>1c</sub> или HbA <sub>1</sub>	Лабильный HbA <sub>1</sub> , если не удален предварительно
Миниколоночная аффинная хроматография	1-3	Небольшая	Аффинная хроматография	Тотальный GНb	Лабильные формы не связываются
Электрофорез	4-10	Небольшая	Различие по заряду	*HbA <sub>1c</sub> или HbA <sub>1</sub>	Лабильный HbA <sub>1</sub> , если не удален предварительно
Колориметрический	4-18	—	Разделение Hb не требуется. GНb реагирует с ТБК	Тотальный GНb	Лабильные формы не реагируют
Иммунохимический турбидиметрический	3-4	—	Разделение Hb не требуется. HbA <sub>1c</sub> образует комплекс со специфическими антителами	HbA <sub>1c</sub>	Только лабильный HbA <sub>1c</sub> , если не удален предварительно

\* — в зависимости от технологии фирмы-производителя

**Таблица 3.** Сравнение результатов определения, полученных иммунохимическим и хроматографическим методами

Образец №	Содержание гликозилированного Hb, %		Достоверность различий
	Иммунохимический метод (Roche)	Хроматографический ионообменный метод (Human)	
1.	4,81 ± 0,15	5,95 ± 0,46	p < 0,01
2.	6,32 ± 0,20	7,75 ± 0,57	p < 0,01
3.	10,70 ± 0,26	13,11 ± 0,63	p < 0,01

Вне зависимости от высокого или низкого содержания гликозилированного гемоглобина в образце в среднем его цифры при использовании хроматографического метода были в 1,23 раза выше по сравнению с иммунохимическим. Это не удивительно, так как при выполнении хроматографического метода определяется HbA<sub>1</sub> (референтный интервал метода в соответствии с инструкцией составляет величину до 7%), а в иммунохимическом определении представлен HbA<sub>1c</sub> (референтный интервал до 5,7%).

**Референтные интервалы**

Референтные интервалы гликозилированного гемоглобина, приведенные в литературе и разнообразных инструкциях, варьируют в зависимости от типа метода. Количество HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>1c</sub>, измеренное с помощью ионообменной хроматографии, колеблется в пределах 4,5 — 7,5% [2,8]. Общий гликозилированный гемоглобин, оцененный аффинной хроматографией, составляет 5,3 — 8,5% [8, 15]. Электрофорез дает результаты порядка 5,0 — 7,6% [8, 21], ВЭЖХ — от 4,5 до 5,7% [6]. Иммунохимическое оп-

ределение HbA<sub>1c</sub> с реактивами фирмы Roche предусматривает колебание от 4,5 до 5,7% у здоровых людей, от 6 до 9% у больных с хорошо контролируемым и компенсированным диабетом и > 9% в случае плохого контроля лечения [12].

**Рекомендации по выбору метода**

В связи с тем, что лаборатории мира используют различные методы определения гликозилированного гемоглобина в зависимости от собственной оснащенности, объема необходимых исследований, их стоимости и т.д., рабочая группа по изучению гликозилированного гемоглобина Национального института США и американская ассоциация диабетологов предприняли попытки суммировать некоторые рекомендации [3] по выбору подходящего метода исследования:

1. Желательно определение % содержания HbA<sub>1c</sub>.
2. Удаление лабильных продуктов до начала анализа.
3. Внутри- и межлабораторный коэффициент вариации не должен превышать 5%.

4. Референтный интервал не должен превышать 2%. (Например, от 4 до 6%).

5. Метод должен учитывать наличие гемоглинопатий.

Похожие рекомендации представлены в итогах работы исследователей США и Великобритании «Diabetes Control and Complications Trial» (DCCT). Они учитываются при разработке нового лабораторного оборудования для быстрого выполнения теста «гликозилированный гемоглобин»: прибора, предложенного фирмой Provalis Diagnostics (U.K.) [24], приборов Micromat II, DiaSTAT, Variant II фирмы Bio Rad (США) [16] и др.

### Влияние мешающих факторов

Повышение концентрации билирубина, глюкозы, липидов, как уже упоминалось, могут оказывать влияние на точность определения гликозилированного гемоглобина. В инструкциях к тщательно разработанным методикам должна быть указана концентрация этих веществ, выше которой страдает точность определения  $HbA_{1c}$ . В отдельных случаях необходимо принимать определенные меры: освобождение образца от глюкозы с помощью диализа, отмывание эритроцитов, что зависит также от принципиальных возможностей метода. Важность предварительного удаления лабильных альдиминных продуктов уже обсуждалась.

Необычное время жизни эритроцитов сказывается на определении концентрации гликозилированного Hb. Пациенты с анемией, гемолизом имеют уменьшенные значения  $HbA_{1c}$  из-за короткой продолжительности существования эритроцитов. Возможно занижение  $HbA_{1c}$  у людей с недавней значительной потерей крови или с постоянной небольшой хронической кровопотерей. Описаны случаи снижения результатов у больных с выраженной хронической потерей белка через почки и у беременных в связи с изменением характера гидрирования [14]. Противоположным образом пациенты после удаления селезенки или с полицитемией могут давать завышенные величины  $HbA_{1c}$  [12].

Присутствие повышенного количества формы HbF несколько завышает результаты анализа  $HbA_{1c}$  при использовании метода ионообменной хроматографии [2] и занижает их при выполнении иммунохимического метода [9]. Повышение уровня HbF может быть у новорожденных, некоторых детей до 12 месяцев, беременных, а также у пациентов с  $\beta$ -талассемией и наследственной устойчивостью HbF.

Наличие необычных аллельных форм HbS и HbC проявляется в оценке количества  $HbA_{1c}$  ниже ожидаемой при выполнении метода ионообменной хроматографии и выше ожидаемой при использо-

вании турбидиметрического иммунохимического метода Roche Diagnostica [6, 12, 19].

Все перечисленные факторы необходимо учитывать с целью корректной интерпретации результатов анализа.

### Клиническое значение определения гликозилированного гемоглобина

Повышение уровня гликозилированного гемоглобина отражает гипергликемию, которая имела место в период времени, равный продолжительности жизни эритроцита (от 30 до 120 суток; в среднем 60 дней для большей части эритроцитов). Доказательство перманентной гипергликемии необходимо для постановки диагноза сахарный диабет, поэтому тест  $HbA_{1c}$  с успехом введен во многие современные алгоритмы первичной диагностики заболевания. Оценка % содержания  $HbA_{1c}$  помогает в контроле лечения и определения степени компенсации сахарного диабета [1]. Референтные величины, зависящие от используемого метода, приведены в разделе «Референтные интервалы».

При всей ценности и привлекательности определения  $HbA_{1c}$ , его следует сочетать с проведением периодического контроля уровня глюкозы, а также методом определения фруктозамина. Содержание фруктозамина сыворотки крови отражает степень гипергликемии, которая была у пациента в течении последних 2-3 недель, так как скорость обмена гликозилированных белков сыворотки гораздо больше, чем гемоглобина. Период полужизни альбумина, гликозилированная форма которого составляет основную долю фруктозамина, равен 19 дням. Поэтому определение фруктозамина может играть важную роль для более быстрой ориентации лечащих врачей в успешности проводимого лечения больного, страдающего диабетом, подборе диеты или дозы препарата, снижающего уровень глюкозы.

Если у пациента произошло снижение среднего содержания глюкозы крови в период предыдущих 3-4 недель до взятия пробы, то оно еще не отразится на результате определения  $HbA_{1c}$ . Уровень фруктозамина может успеть отреагировать на это снижение. Некоторые исследователи считают фруктозамин более быстрым и удобным маркером среднего уровня глюкозы, чем гликозилированный Hb [6]. Определение фруктозамина намного дешевле и не зависит от вариантов аллелей гемоглобинов пациента. Однако на концентрацию фруктозамина влияет уровень альбумина сыворотки, характер диспротеинемии, а также большее число лекарственных препаратов и эндогенных субстратов крови [6].

Целесообразным является комбинированное использование тестов в зависимости от конкретных

задач: постановка диагноза, кратко- или долгосрочное наблюдение за лечением, учет существования аллельных форм гемоглобина у больного и т.д. При длительном наблюдении за лечением нет необходимости выполнять метод определения фруктозамина чаще, чем 1 раз в 2-3 недели, а HbA<sub>1c</sub> — чаще, чем 1 раз в 6-8 недель. Частота исследования концентрации глюкозы определяется лечащим врачом.

## Литература

1. Астахов Ю.С., Благодосклонная Я.В., Панов А.В. и др. Поздние осложнения сахарного диабета второго типа. Клиника, диагностика, врачебная тактика.— СПб., 1999.
2. Acharya A.S., Manning J.M. Amadori rearrangement of glyceraldehyde-hemoglobin Schiff base adducts, a new procedure for the determination of ketoamine adducts in protein. // *J. Biol.Chem.*— 1980.— Vol.255.— P.7218-7224.
3. American Diabetes Association. Clinical practice recommendations: standards of medical care for patients with diabetes mellitus. // *Diab.Care.*— 1992.— Vol.14 — №2.— P.10-13.
4. Armbruster D.A. Fructosamine: structure, analysis and clinical usefulness. // *Clin.Chem.*— 1987.— Vol.33 — №12.— P.2153-2163.
5. Bisse G.S., Berger W., Fluckiger R.D. Effects of Hb variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. // *Clin.Chem.*— 2001.— Vol.47.— №2. P.153-164.
6. Bodor G.S., Little R.R., Garret N.E. et al. Standardization of glycohemoglobin determination in the clinical laboratory: three years of experience. // *Clin.Chem.*— 1992.— Vol.38.— P.2414-2418.
7. Botterman P. The interpretation of glycated hemoglobin test. // *Diabetologia.*— 1981.— Vol.20.— P.159-167.
8. Clinical Chemistry. ed. Kaplan L.A., Pesce A.J.— New York., 1986.
9. Craine J.E. Sensitivity of isoelectric focusing, ion exchange, affinity chromatography and immunochemical method to labile glycated hemoglobin. // *American Laboratory.*— 1987.— Vol.34 — №3.— P.63-71.
10. Diatrac Glycated Hemoglobin A1c Test. Beckman Electrophoresis System.— Fullerton, 1997.
11. Finot P.A. Identification of a new lysine derivative obtained upon acid hydrolysis. // *Experientia.*— 1968.— Vol.24 — №11.— P.1097-1099.
12. Goldstein D.E., Little R.R., Wiedmeyer H.M. et al. Glycated hemoglobin : methodologies and clinical application. // *Clin.Chem.*— 1986.— Vol.32.— P.364-370.
13. Guillausseau P.J. Comparison of fructosamine with glycated hemoglobin as an index of glycemic control in diabetes patients. // *Diabetes Res.*— 1990.— Vol.13 — №1.— P.127-131.
14. Javanovic L.D., Peterson C.M. Is glycosylated hemoglobin clinically useful ? // *Am.J.Med.*— 1981.— Vol. 70.— P.325-330.
15. Klenk D.C., Hermanson G.T., Krohn R.T. et.al. Clinic use and time relationship of changes in affinity measurement of glycosylated albumin and hemoglobin. // *Clin.Chem.*— 1982.— Vol.28.— P.2088-2094.
16. Multi-Message Advertisement // *Clin.Lab.Intern.*— 2000.— Vol.24 — №7.— P.33.
17. Nathan D.M. The glycosylated hemoglobin — infatuation or the real thing ? // *Engl.J.Med.*— 1990.— Vol.323 — №4.— P.1062-1063
18. Parker K.M., Da Costa J. The colorimetric method of glycosylated hemoglobin. // *Clin.Chem.*— 1981.— Vol.27.— P.669-672.
19. Roberts W.D. Effects of nine Hb variants on five methods of glycosylated hemoglobin. // *Clin.Chem.*— 2000.— Vol.46.— №4 — P.569-571.
20. Roth V. Glycated Hb, not glycosylated or glucosylated. // *Clin.Chem.*— 1983.— Vol.29.— P.1991-1996.
21. Simon M., Cuan J. The assay of glycosylated hemoglobin with electroforesis method. // *Clin.Chem.*— 1982.— Vol.28.— P.9-12.
22. Svendsen P.A., Christiansen J.S., Soegaard U.D. et al. Glucose and lactate concentration determination on single sample. // *Diabetologia.*— 1980.— Vol.19.— P.130-136.
23. Technology for tomorrow. Bio Rad catalog.— New York., 1999.
24. Test System for HbA<sub>1c</sub>. // *Clin.Lab.Intern.*— 2000.— Vol.24, №2 — P.28
25. Zander R., Lang W., Wolf H. Alkaline haematin D-575, a new tool in the determination of hemoglobin as an alternative to the cyanhemoglobin method. // *Clin.Chim.Acta.*— 1984.— Vol.136.— P.83-93.