

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Гисич А.В., Ястребова Е.С.

Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: a.gisich@g.nsu.ru

Поступила в редакцию 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0612

Аннотация. В данной работе производится исследование возможности измерения гликированного гемоглобина в одиночных эритроцитах методом сканирующей проточной цитометрии. В работе были проведены расчеты зависимости интенсивности рассеянного излучения от эритроцита в широком угловом диапазоне (индикатрис светорассеяния) для длин волн, находящихся в максимуме полосы поглощения гликированного гемоглобина. Максимальная чувствительность по концентрации гликированного гемоглобина была установлена для длины волны 415 нм. Было показано, что на имеющейся практической реализации сканирующего проточного цитометра, которая включает в себя лазеры: 405 нм (30 мВт, Radius, Coherent Inc., Santa Clara, USA) и 660 нм (LM-660-20-S, 40 мВт) удастся достоверно разделять концентрации гликированного гемоглобина у донора и пациента с диагностированным диабетом при различии в концентрациях HbA1c более 5%. Для длины волны 415 нм теоретически было показано, что заметная разница в значении интенсивности рассеяния (более 10%) наблюдается только в случае разности концентраций гликированного гемоглобина не менее 3%. Таким образом, если на имеющейся практической реализации прибора установить лазер с длиной волны 415 нм, то определение гликированного гемоглобина станет возможным с точностью не более 3%.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, гликированный гемоглобин, сканирующая проточная цитометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Типы гемоглобина. Гемоглобин (Hb) (от греч. haemo – кровь и лат. globus – шар), красный железосодержащий пигмент крови человека, позвоночных и некоторых беспозвоночных животных, выполняющий транспортно-дыхательную и буферную функции в организме. Относится к сложным белкам – хромопротеинам.

В крови гемоглобин существует по крайней мере в четырех формах: дезоксигемоглобин, оксигемоглобин, карбгемоглобин и метгемоглобин. Дезоксигемоглобин – гемоглобин, отдавший кислород тканям. Оксигемоглобин – соединение гемоглобина с кислородом – образуется, преимущественно, в артериальной крови и придает ей алый цвет. Обе эти формы (дезоксигенированный и оксигенированный) являются двумя производными нормального Hb и легко переходят друг в друга. К функциональным формам гемоглобина относится также карбгемоглобин – соединение гемоглобина с углекислым газом, которое образуется, преимущественно, в венозной крови, которая вследствие этого приобретает темно-вишневый цвет. Выделяют еще несколько форм гемоглобина, такие как фетальный гемоглобин, метгемоглобин и другие, отличающиеся от нормального гемоглобина по строению и свойствам. Мы сфокусировали свое внимание на гликированном гемоглобине – форме гемоглобина, которая образуется в результате присоединения к белку гемоглобина (глобину) глюкозы. Рост уровня гликированного гемоглобина происходит при переизбытке глюкозы в крови, возникающем при сахарном диабете. Поэтому анализ на гликированный гемоглобин – самый эффективный и необходимый метод в диагностике сахарного диабета.

Гликированный гемоглобин (кратко обозначается: гемоглобин HbA1c) – это биохимический показатель крови, отражающий среднее содержание сахара в крови за длительный период (от трёх до четырёх месяцев), в отличие от измерения глюкозы крови, которое дает представление об уровне глюкозы крови только на момент

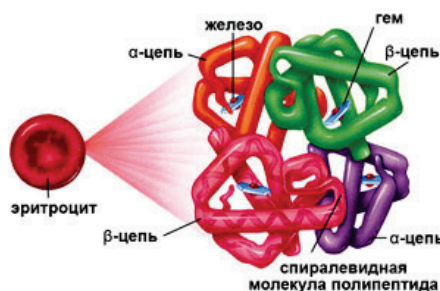


Рисунок 1. Модель третичной структуры гемоглобина

Таблица 1. Интерпретация результатов анализа на гликированный гемоглобин

Показатель гликированного гемоглобина	Значение	Определение
4-6,2 %	Отсутствие диабета	Донор
5,7-6,4 %	Преддиабет	Донор
6,5 % и больше	Наличие диабета	Пациент

исследования. Время жизни красных кровяных телец (эритроцитов), которые содержат гемоглобин, составляет в среднем 120 дней. Именно поэтому уровень гликированного гемоглобина отражает средний уровень гликемии на протяжении примерно трёх-четырёх месяцев.

Гемоглобин (Hb) состоит из 4 полипептидных цепей, каждая из которых связана с гемом (рис. 1). Более 90% Hb здорового взрослого человека представлена обычно аллельной формой A₀, имеющей 2 α и 2 β полипептидные цепи [1].

Формы гемоглобина, образованные гликированием, то есть присоединением какого-либо моносахарида к NH₂ группе концевой валина β -цепи, составляют в совокупности HbA₁ (HbA_{1a} + HbA_{1b} + HbA_{1c}), где HbA_{1a} имеет в составе фруктозу-1,6-дифосфат, HbA_{1b} содержит глюкозу-6-фосфат и HbA_{1c} содержит глюкозу [2]. Процесс гликирования необратим, и его скорость пропорциональна уровню гликемии.

В данной работе использовалась кровь условно здоровых доноров и пациентов с диагностированным сахарным диабетом.

Обзор существующих методов. Различают более 30 методов для определения гликированного гемоглобина (HbA_{1c}). Они включают в себя как лабораторные системы с низкой точностью определения концентраций и ручные микроколочные методы, так и высокоточные автоматизированные системы. Существующие способы определения HbA_{1c} могут быть разделены на три группы. Первая группа включает методы, основанные на различии электрического заряда молекул гликированного и негликированного гемоглобина. Например, ионообменная хроматография и хроматография под высоким давлением, электрофорез в агарозном геле. Вторая группа включает приемы, основанные на структурном различии между гликированными и негликированными компонентами. Например, аффинная хроматография и иммунологический способ. Третья группа включает методы, которые основаны на химической реактивности HbA_{1c}. Это фотоколориметрические методы [2].

Таблица 2. Достоинства и недостатки методов измерения гликированного гемоглобина

Название метода	Достоинства	Недостатки
Ионообменная хроматография	Высокая селективность определения ионов, возможность одновременного определения органических и неорганических ионов. Необходим обычный фотометр. Относительно недорогой метод.	Результат чрезвычайно зависит от температурных условий выполнения теста. Требуется больше времени, чем разделение другими хроматографическими методами. Нет надежного и недорогого прибора, который бы позволил сделать данный метод стандартным
Аффинная хроматография	На окончательный результат в значительно меньшей степени влияют температурные условия. Высокая точность метода.	Требуется достаточно большого количества мануальных операций и времени на анализ.
Высокоэффективная жидкостная хроматография	Возможность исследования практически любых объектов без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам. Высокая точность. Высокая скорость анализа.	Требуется специальная аппаратура. Высокая стоимость оборудования для выполнения метода.
Электрофорез	Одномоментно может быть проанализирована целая серия проб. Относительно низкая стоимость метода.	Для выполнения метода требуется специальная аппаратура. Для разделения требуется порядка 20-40 минут.
Колориметрический	Не требуется специального дорогостоящего оборудования. Возможность определения очень малых концентраций веществ, которые другими методами химического анализа вычислить сложно.	Метод имеет недостаточно высокую точность, довольно трудоемок, требует длительного кипячения проб.
Иммунохимический	Возможность автоматизации анализа, высокая скорость получения результата, высокая точность.	Более дорогой, чем миниколочные методы.

Хроматографические методы основаны на распределении компонентов между двумя фазами - неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную. В ионообменной хроматографии используются мини колонки с катионообменной смолой, которые поставляются фирмами производителями вместе с реактивами для элюирования. В зависимости от технологии, предложенной изготовителем, определяется количество HbA1 (HbA1a + HbA1b + HbA1c) или HbA1c. В Аффинной хроматографии метод основан на способности иммобилизованной на сорбенте 3-аминофенилборной кислоты специфично связывать цис-диольную углеводную часть гликированного гемоглобина. Негликированные гемоглобины элюируются первыми, затем из колонки вытесняется гликированный гемоглобин с помощью буфера, содержащего сорбитол, который конкурирует за места связывания с борной кислотой [3]. В высоко-эффективной жидкостной хроматографии обеспечивается хорошее отделение HbA1c от A1a, A1b, A0, A2 и F форм, а также от редко встречающихся, но мешающих во многих других методах определения форм S и C с точностью 2% [4].

Метод электрофореза основан на разделении гликированных и негликированных форм Hb имеют разные электрофоретические подвижности. Свободные N-концы негликированного Hb взаимодействуют с сульфатными группами, что изменяет заряд молекул. Гемоглобины A1 не могут взаимодействовать с сульфатными группами, их заряд остается неизменным. Электрофорез проводится на таких поддерживающих средах как агар и агароза в течении 20-40 минут.

Сканирующая проточная цитометрия выгодно отличается от других методов измерения, позволяя исследовать свойства одиночных клеток. Данный метод позволяет проводить многопараметрические измерения частиц в потоке на высокой скорости. Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) позволяет измерять интенсивность рассеянного света от одиночной частицы в широких угловых диапазонах (индикатриса светорассеяния), а также рассеяние вперед и в бок под 90°, которое используется в качестве триггерного сигнала, сообщающего системе о пролете исследуемой частицы и запускающего запись её индикатрисы светорассеяния. Метод позволяет идентифицировать эритроциты и, благодаря информации, заключённой в индикатрисе светорассеяния, характеризовать их по размеру и показателю преломления, из которого в свою очередь представляется возможным выразить концентрацию гликированного гемоглобина.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Теоретический расчет индикатрис при изменении HbA1c. С учетом различия оптических свойств гликированного гемоглобина и его нормальной формы, имеют место формулы:

$$n_r = n_{0r} + \alpha_{r(\text{deoxyHb})}Hb_{\text{deoxy}} + \alpha_{r(\text{oxyHb})}Hb_{\text{oxy}} + \alpha_{r(\text{HbA1c})}HbA1c \quad (1)$$

$$n_b = n_{0b} + \alpha_{b(\text{deoxyHb})}Hb_{\text{deoxy}} + \alpha_{b(\text{oxyHb})}Hb_{\text{oxy}} + \alpha_{b(\text{HbA1c})}HbA1c, \quad (2)$$

где $n_r, n_b; n_{0b}, n_{0r}$, – показатели преломления эритроцита и среды на красной 660 нм (r) и синей 405 нм (b) длинах волн соответственно; $HbA1c, Hb_{\text{oxy}}, Hb_{\text{deoxy}}$ – концентрации гликированного, оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина соответственно; $\alpha_{b(\text{Hb})}, \alpha_{r(\text{Hb})}, \alpha_{b(\text{HbA1c})}, \alpha_{r(\text{HbA1c})}, \alpha_{b(\text{oxyHb})}, \alpha_{r(\text{oxyHb})}, \alpha_{b(\text{deoxyHb})}, \alpha_{r(\text{deoxyHb})}$ оптические константы на определенной длине волны и для соответствующего типа гемоглобина.

С помощью преобразований получим:

$$\frac{n_r - n_{0r}}{n_b - n_{0b}} = \frac{\alpha_{r(\text{deoxyHb})}Hb_{\text{deoxy}} + \alpha_{r(\text{oxyHb})}Hb_{\text{oxy}} + \alpha_{r(\text{HbA1c})} \frac{HbA1c}{Hb}}{\alpha_{b(\text{deoxyHb})}Hb_{\text{deoxy}} + \alpha_{b(\text{oxyHb})}Hb_{\text{oxy}} + \alpha_{b(\text{HbA1c})} \frac{HbA1c}{Hb}} \quad (3)$$

и, обозначив $Hb\% \equiv \frac{HbA1c}{Hb}$, можно выразить долю гликированного гемоглобина через измеряемые с помощью цитометра показатели преломления и оптические константы – которые неизменны для всех доноров:

$$Hb\% = \frac{\alpha_{r(\text{deoxyHb})}Hb_{\text{deoxy}} + \alpha_{r(\text{oxyHb})}Hb_{\text{oxy}} - (\alpha_{b(\text{deoxyHb})}Hb_{\text{deoxy}} + \alpha_{b(\text{oxyHb})}Hb_{\text{oxy}}) \frac{n_r - n_{0r}}{n_b - n_{0b}}}{(\alpha_{b(\text{deoxyHb})}Hb_{\text{deoxy}} + \alpha_{b(\text{oxyHb})}Hb_{\text{oxy}}) \frac{n_r - n_{0r}}{n_b - n_{0b}} - \alpha_{r(\text{HbA1c})}} \quad (4)$$

Линии максимального поглощения HbA1c находятся на длинах волн 415 нм и 540 нм (рис. 2), следовательно, для этих значений необходимо рассчитать индикатрисы светорассеяния. Обнаруженные оптические особенности гемоглобина позволяют теоретически найти различие в регистрируемых сигналах на СПЦ для эритроцитов с варьируемой концентрацией HbA1c.

Обоснование выбора оптических констант. Значения коэффициентов экстинкции e_λ оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина известны. Для гликированного гемоглобина существуют различия значений коэффициента экстинкции в разных источниках, но, зная значение $e_{\lambda(\text{HbA1c})}$ для 540 нм $101342,13 \pm 15316,8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [6] и график абсорбции (рис. 2), можно рассчитать значения экстинкции для других длин волн.

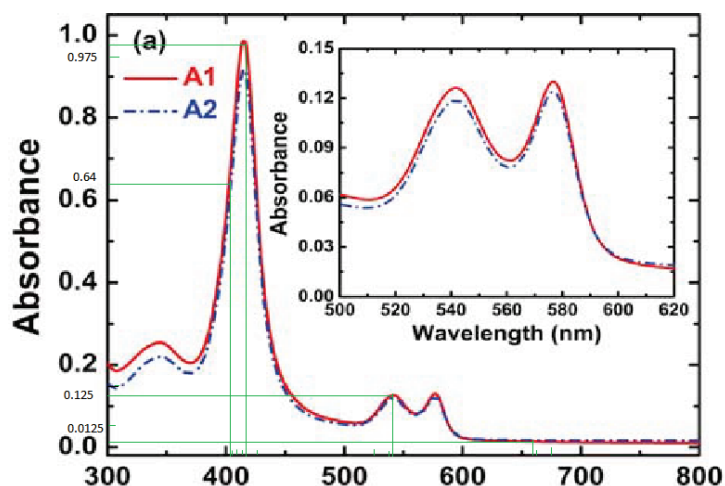


Рисунок 2. Спектр поглощения гликированного гемоглобина. Кривые A1 и A2 соответствуют образцам с 7,9% и 6% HbA1c, соответственно (измерено методом иммунотурбидиметрии в Национальном совете по аккредитации испытательных и калибровочных лабораторий, Бангалор, Индия) [5]

Для обоснования корректности использования единого значения удельной рефракции гемоглобина $\alpha = 0,18$ мл/г [7], для расчета показателя преломления было проведено следующее исследование. При фиксированной концентрации гликированного гемоглобина (5%), варьировались концентрации оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина для расчета общего показателя преломления клеток. После чего происходило моделирование индикатрис светорассеяния, на основе которых показано, что при варьировании дезоксигенированного гемоглобина в диапазонах от 20% до 40% относительная разница в интенсивности индикатрис составляет порядка 5%, в диапазонах от 20% до 75% порядка 10%, в диапазонах от 20% до 25% менее 1%. В таблице 3 приведены соответствующие коэффициенты для разных длин волн.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Схема установки. Сканирующий проточный цитометр имеет оптическую систему (рис. 3), в которой свет, рассеянный одиночной частицей, сканируется по апертуре фотоприемника во время ее движения в потоке внутри капилляра измерительной кюветы. Таким образом можно измерять угловую зависимость (индикатрису) светорассеяния от одиночной частицы в полярных углах, в частности в нашей работе от 5° до 70° , с интегрированием по азимутальному углу от 0° до 360° . В данной работе основное излучение (La2 на рис. 3), которое распространяется вдоль оси канала с движущимися частицами и используется для измерения индикатрисы светорассеяния. Помимо индикатрисы светорассеяния СПЦ позволяет так же измерять и стандартное для проточных цитометров рассеяние вбок, создаваемое с помощью лазера La1 (488 нм, JDSU FCD488, 20 мВт) и регистрируемое на фотоприемнике (PMT1 на рис. 3). В нашей системе боковое рассеяние используется в качестве триггерного сигнала, сообщающего системе о пролете частицы и запускающего запись ее индикатрисы светорассеяния.

Измеряемые индикатриса светорассеяния $I^{LSP}(\theta)$ и сигнал рассеяния вбок $I^{SSC}(\theta)$ могут быть представлены следующим образом [8]:

$$I^{LSP}(\theta) = k_1 \int_0^{2\pi} [S_{11}(\theta, \varphi) + S_{14}(\theta, \varphi)] d\varphi \tag{5}$$

$$I^{SSC}(\theta) = k_2 \iint_{\Omega} d\theta d\varphi \sin\theta [S_{11}(\theta, \varphi) - S_{12}(\theta, \varphi) \cos(2\varphi) - S_{13}(\theta, \varphi) \sin(2\varphi)], \tag{6}$$

где S_{ij} – элементы матрицы Мюллера [9], θ и φ – полярные и азимутальные углы рассеяния соответственно,

Таблица 3. Оптические константы и коэффициенты экстинкции для гемоглобина и гликированного гемоглобина

	Оху Hb		Деoxy Hb		Gly Hb	
	$e_\lambda, M^{-1}cm^{-1}$	$\alpha_\lambda, мл/г$	$e_\lambda, M^{-1}cm^{-1}$	$\alpha_\lambda, мл/г$	$e_\lambda, M^{-1}cm^{-1}$	$\alpha_\lambda, мл/г$
660 нм	319,6	0,22577	3226,56	0,20973	10134,2	0,18
540 нм	53236	0,22628	46592	0,20942	101342	0,18
415 нм	524280	0,22269	342596	0,18431	790467,6	0,18
405 нм	308716	0,19604	253368	0,18229	526978,4	0,18

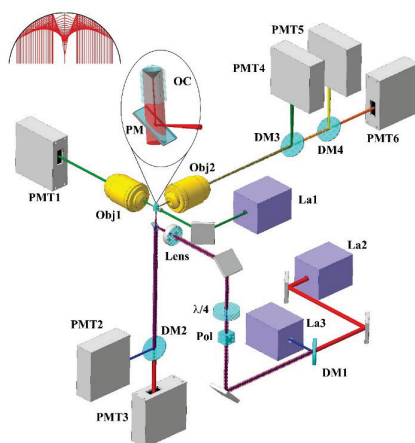


Рисунок 3. Оптическая схема сканирующего проточного цитометра. LA – лазер, PMT – ФЭУ, Obj – объектив, DM- дихроичное зеркало, Pol – поляризатор, Lens – линза, OC – оптическая кювета, PM – зеркало на пластине

Ω – круговая апертура объектива, составляющая $90 \pm 17,5^\circ$. Причем для сферически симметричных частиц $S_{14} = S_{13} = 0$. Коэффициенты k_1 и k_2 определяются в результате процесса инициализации прибора по полистирольным микросферам и связывают интенсивности экспериментальных сигналов с теоретически рассчитываемыми. В данной работе использовались 4 мкм (CML latex, 4%, w/v, Molecular probes, Life technologies, USA).

Подготовка пробы. Образцы крови были получены из цельной периферической крови доноров и пациентов с диагностированным диабетом. Пробы были собраны в одноразовые пластиковые пробирки с антикоагулянтом EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) в соотношении 9:1 (кровь:EDTA). Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Национального центра медицинских исследований им. Е. Мешалкина. Письменное информированное согласие было получено от всех участников в соответствии с Хельсинкской декларацией. Эксперименты проводились при комнатной температуре около 22°C в течение 4 часов после забора крови. Происходило разбавление 10 мкл крови в 100 мкл физраствора NaCl 0,9 %. После чего 4 мкл раствора добавлялось в 500 мкл NH_4Cl 150 мМ для запуска изотонического гемолиза. В ходе которого образуются сферизованные эритроциты, которые мы идентифицировали и использовали для анализа в данной работе. Цель сферизации эритроцитов – упрощение анализа данных СПЦ [10]. Двойное разбавление проводилось для того, чтобы уменьшить концентрацию белковых структур и форм их агрегатов. На последнем этапе в каждую пробу были добавлены 4 мкм полистирольные микросферы для инициализации СПЦ [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были измерены сферизованные эритроциты одновременно на двух длинах волн. Полученные данные были обработаны с помощью теории Ми с учетом поглощения на длине волны 405 нм, что позволило составить следующую таблицу (табл. 4):

Наблюдаемое различие в отношении показателей преломления доноров и пациентов на разных длинах волн $\frac{n_r - n_{or}}{n_b - n_{ob}}$ оказалось равным по порядку получаемым погрешностям определения параметра показателя преломления на СПЦ.

Чтобы оценить влияния различных концентраций гликированного гемоглобина на оптические характеристики клеток были рассчитаны индикатрисы светорассеяния на длинах волн 415 и 540 нм (рис. 3).

Таблица 4. Средние значения мнимых и реальных показателей преломления для экспериментов с одновременным измерением эритроцитов на 405 и 660 нм

	$\langle n - n_0 \rangle_{\text{blue}}$	$\langle n - n_0 \rangle_{\text{red}}$	$\langle n - n_0 \rangle_{\text{blue}} / \langle n - n_0 \rangle_{\text{red}}$	$\langle (n - n_0)_{\text{blue}} / (n - n_0)_{\text{red}} \rangle$
Донор 21.09.18	$0,0375 \pm 0,0003$	$0,0449 \pm 0,0005$	$0,84 \pm 0,02$	$0,853 \pm 0,008$
Пациент 14.11.18	$0,0385 \pm 0,0004$	$0,0443 \pm 0,0005$	$0,87 \pm 0,02$	$0,868 \pm 0,004$
Донор 28.03.17	$0,0320 \pm 0,0001$	$0,0456 \pm 0,0002$	$0,701 \pm 0,005$	$0,698 \pm 0,005$
Пациент 28.08.18	$0,0405 \pm 0,0002$	$0,0361 \pm 0,0002$	$0,891 \pm 0,009$	$0,893 \pm 0,009$

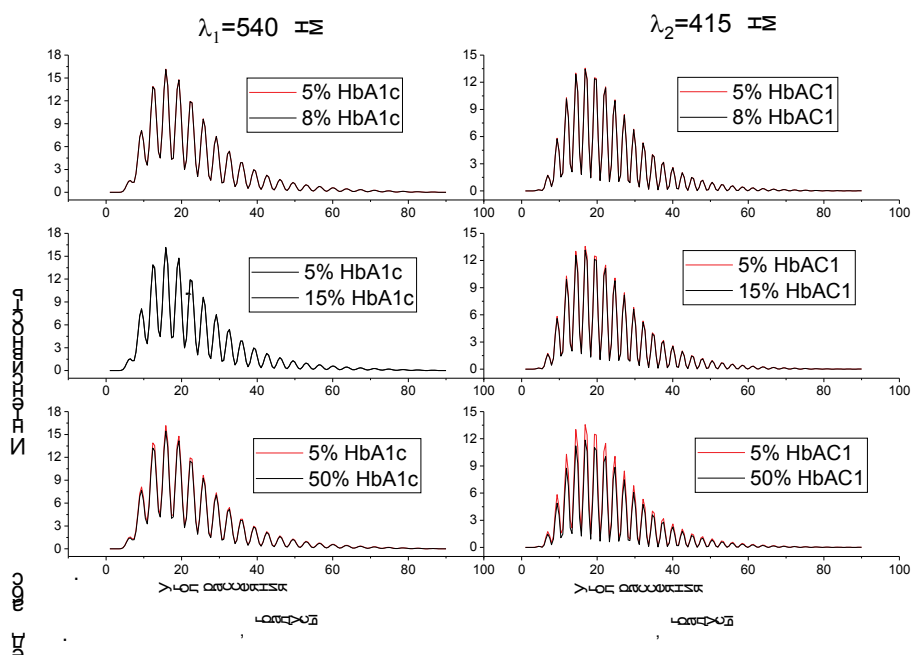


Рисунок 4. Индикатрисы светорассеяния для длины волны 540 нм (левая колонка) и для 415 нм (правая колонка). Наглядно представлены различия профиля рассеяния для различных концентраций гликированного гемоглобина (5/8 % HbA1c, 5/15 % HbA1c, 5/50 % HbA1c)

Мнимый показатель преломления эритроцита варьировался в диапазоне от 0% до 50% с шагом 1% по HbA1c. Расчитанные значения показателей преломления были получены с использованием формул:

$$Re[n_\lambda] = n_{0(\lambda)} + \alpha_{\lambda(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{\lambda(oxyHb)}Hb_{oxy} + \alpha_{\lambda(HbA1c)}HbA1c \tag{7}$$

$$Im[n_\lambda] = \frac{m_{10}}{4\pi m} \lambda [e_{\lambda(deoxy)}Hb_{deoxy} + e_{\lambda(oxy)}Hb_{oxy} + e_{\lambda(HbA1c)}HbA1c], \tag{8}$$

где $Re[n_\lambda]$, $Im[n_\lambda]$ реальный и мнимый показатели преломления, $\alpha_{\lambda(HbA1c)}$, $\alpha_{\lambda(deoxyHb)}$, $\alpha_{\lambda(oxyHb)}$ [л/г] – удельная рефракция для гликированного, дезоксигенированного и оксигенированного гемоглобина соответственно, e_λ , $e_{\lambda(HbA1c)}$, $e_{\lambda(deoxy)}$, $e_{\lambda(oxy)}$ [М⁻¹см⁻¹] – коэффициенты экстинкции для гликированного, дезоксигенированного и оксигенированного гемоглобина соответственно.

Более выраженное отличие проявляется на длине волны 415 нм (рис. 4), но заметная разница в значении интенсивности рассеяния (более 10%) имеется только в случае разности концентраций гликированного гемоглобина не менее 3%. Данные приведены в таблице 5.

Это говорит о том, что в данной реализации прибора точность определения HbA1c в одиночном эритроците будет ниже метода жидкостной хроматографии, где, однако, определение концентрации идет по всей лизированной смеси эритроцитов, а не по индивидуальным клеткам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы было решено три задачи: проверена чувствительность текущей конфигурации прибора к содержанию гликированного гемоглобина в эритроцитах доноров и пациентов; проведен теоретический расчет точности измерения концентраций HbA1c на оптимальных длинах волн; рассчитана оценка погрешностей,

Таблица 5. Теоретически рассчитанные различия между индикатрисами с различными концентрациями HbA1C на длине волны 415 нм и на длине волны 540 нм

		(5-8) % HbA1C	(5-10) % HbA1C	(5-15) % HbA1C	(5-50) % HbA1C
415 нм	<Rel MSE>, %	1,55 ± 0,08	2,55 ± 0,13	4,9 ± 0,2	18 ± 0,8
540 нм	<Rel MSE>, %	0,60 ± 0,02	1 ± 0,04	2 ± 0,08	8,5 ± 0,3

где $\langle \text{Rel MSE} \rangle = \frac{\sqrt{(I_{i(x\%HbA1c)} - I_{i(y\%HbA1c)})^2}}{\max(I_{i(x\%HbA1c)}, I_{i(y\%HbA1c)})} \times 100$ это усреднённое значение относительной разницы между двумя индикатрисами.

вносимых предположением, что для всех доноров и пациентов в каждом эритроците 25% и 75% дезоксигенированного и оксигенированного гемоглобина, соответственно.

Было показано, что на имеющейся практической реализации сканирующего проточного цитометра, которая включает в себя лазеры: 405 нм (30 mW, Radius, Coherent Inc., Santa Clara, USA) и 660 нм (LM-660-20-S, 40 мВт) удастся достоверно разделять концентрации гликированного гемоглобина у донора и пациента при различии в концентрациях HbA1c более 5%. Теоретически показано, что на длине волны 415 нм можно достичь точности определения гликированного гемоглобина равной не более 3%.

Список литературы / References:

1. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Система красной крови: Сравнительная физиология. Монография. Белгород: Изд-во БелГУ, 2004, 216 с. [Lipunova E.A., Skorkina M.U. *The Red Blood System: Comparative Physiology*. Monograph. Belgorod: Publishing House of BelSU, 2004, 216 p. (In Russ.)].
2. Эммануэль В.Л., Карягина И.Ю., Эммануэль Ю.В. Сравнение методов определения гликозилированного гемоглобина. *Лабораторная медицина*, 2002, т. 5, с. 99-104 [Emmanuel V.L., Karyagina I.U., Emmanuel U.V. Comparison of methods for determining glycosylated hemoglobin. *Laboratory medicine*, 2002, vol. 5, pp. 99-104 (In Russ.)].
3. Kaplan L.A., Pesce A.J. *Clinical Chemistry*. 2nd edition. St. Louis: CRC Press, 1989, 63 p.
4. Bodor G.S. et al. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. *Clin. Chem.*, 1992, vol. 38, no. 12, pp. 2414-2418.
5. Sridevi S. et al. Optical detection of glucose and glycated hemoglobin using etched fiber Bragg gratings coated with functionalized reduced graphene oxide. *J. Biophotonics*, 2016, vol. 9, no. 7, pp. 760-769.
6. Mandal S., Manasreh M.O. An In-Vitro Optical Sensor Designed to Estimate Glycated Hemoglobin Levels. *Sensors*, 2018, vol. 18, no. 4.
7. Park Y. et al. Spectroscopic phase microscopy for quantifying hemoglobin concentrations in intact red blood cells. *Opt. Lett.*, 2009, vol. 34, no. 23, p. 3668.
8. Strokotov D.I. et al. Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry: Polarized Light Scattering. *Cytometry A*, 2011, vol. 79A, no. 7, pp. 570-579.
9. Борен К.Ф., Хафмен Д.Р. *Поглощение и рассеяние света малыми частицами*. Москва: Мир, 1986, 660 p. [Boren K.F., Huffman D.R. *Absorption and scattering of light by small particles*. Moscow: Mir, 1986, 660 p. (In Russ.)].
10. Yastrebova E.S. et al. Erythrocyte lysis and angle-resolved light scattering measured by scanning flow cytometry result to 48 indices quantifying a gas exchange function of the human organism. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.*, 2023, vol. 103, no. 1, pp. 39-53.
11. Cohen R.M. et al. Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 10, pp. 4284-4291.

INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF MEASURING GLYCATED HEMOGLOBIN BY SCANNING FLOW CYTOMETRY

Gisich A.V., Yastrebova E.S.

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS
 Institutskaya str., 3, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: a.gisich@g.nsu.ru

Received 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpcc.2023.0612

Abstract. The article explores the possibility of measuring glycated hemoglobin in single erythrocytes using scanning flow cytometry. Calculations of the intensity of scattered radiation from an erythrocyte in a wide angular range (light scattering indicatrix) were carried out for wavelengths at the maximum of the absorption band of glycated hemoglobin. The maximum sensitivity for the concentration of glycated hemoglobin was set at a wavelength of 415 nm. As a result, it is possible to reliably separate the concentrations of glycated hemoglobin in donors and patients with diagnosed diabetes with a difference in HbA1c concentrations of more than 5% on the existing practical implementation of a scanning flow cytometer, which includes lasers: 405 nm (30 mW, Radius, Coherent Inc., Santa Clara, USA) and 660 nm (LM-660-20-S, 40 mW). A theoretical calculation for a wavelength of 415 nm showed that a noticeable difference in the value of the scattering intensity (more than 10%) is observed only in the case of a difference in the concentrations of glycated hemoglobin of at least 3%. Thus, if a laser with a wavelength of 415 nm is installed on the existing practical implementation of the device, then the determination of glycated hemoglobin will become possible with an accuracy of no more than 3%.

Key words: erythrocytes, hemoglobin, glycated hemoglobin, scanning flow cytometry.