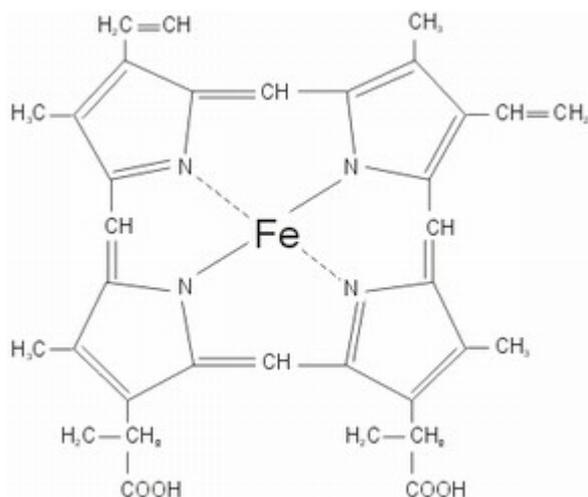


Проблема определения гемоглобина в лабораторной диагностике и методы ее решения

Лекция А . А . Турны Главного лаборанта ФМБА , 83 КБ .

ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ . СТРОЕНИЕ . СВОЙСТВА

Гемоглобин - основной дыхательный пигмент и главный компонент эритроцита, выполняющий важные функции в организме человека: перенос кислорода из легких в ткани и углекислого газа из тканей в легкие. Он также играет существенную роль в поддержании кислотно-основного равновесия крови. Буферная система, создаваемая гемоглибином, способствует сохранению рН крови в определенных пределах. Гемоглобин - красный пигмент крови человека и животных. Подсчитано, что в одном эритроците содержится около ~ 340000000 молекул гемоглобина, каждая из которых состоит примерно из 103 атомов. В крови человека в среднем содержится $\sim 14,5\%$ гемоглобина, его общее количество ~ 750 г. Гемоглобин представляет собой сложный белок, относящийся к группе гемопротеинов; белковый компонент в котором представлен глобином, небелковый - протетической группой. Протетическая группа в молекуле гемоглобина представлена 4 одинаковыми железопорфириновыми соединениями, которые называются гемами. Молекула гема состоит из порфирина IX, связанного с железом двумя атомами азота ковалентными и двумя другими атомами азота координационными связями. Атом железа (II) расположен в центре гема и придает крови характерный красный цвет, степень его окисления не изменяется независимо от присоединения или отдачи кислорода.



Видовые различия гемоглобина обусловлены химическим составом и строением глобина. Гемоглобины представляют собой тетрамерные белки, молекулы которых образованы различными типами полипептидных цепей, обозначаемых как α , β , γ , δ . В состав молекулы входят по 2 полипептидные цепи двух разных типов, каждая из которых оборачивает 1 гем гемоглобина. Гемоглобины различных видов различаются вторичной, третичной и четвертичной структурами, и индивидуальные свойства гемоглобинов неразрывно связаны с их структурами. Известно, что гемоглобин человека состоит из двух равных половин, каждая из которых образована двумя одинаковыми полипептидными цепями. У человека обнаружены гемоглобины различных типов, которые отличаются по химическому строению. В крови взрослого человека содержится гемоглобин А (HbA), состоящий из $\alpha_2\beta_2$ цепей. В дополнение к основному HbA в крови взрослого человека обнаружен гемоглобин A2 (HbA2), на долю которого приходится $\sim 2,5\%$ от всего гемоглобина. Кроме того, известен фетальный гемоглобин F (HbF) - гемоглобин новорожденных, имеющий структуру $\alpha_2\gamma_2$, и отличающийся от HbA вторичной, третичной и четвертичной структурами, что обуславливает их различия: по спектральным характеристикам, электрофоретической подвижности, устойчивости к тепловой денатурации и др. Кровь новорожденного ребенка состоит на $\sim 80\%$ из HbF, который к концу первого года жизни почти целиком заменяется на HbA (в крови взрослого человека содержится до $\sim 1,5\%$ HbF от общего количества гемоглобина).

Незначительное изменение аминокислотного состава глобина, иногда замена лишь одной аминокислоты, оказывается достаточным для полного изменения свойств гемоглобина. Так, замена в HbA глутаминовой кислоты на валин обуславливает появление гемоглобина S (HbS), который имеет структуру $\alpha_2\beta_2$ и обнаружен у больных серповидно-клеточной анемией. HbS по ряду свойств отличается от нормального гемоглобина. После отдачи кислорода в тканях он превращается в плохо растворимую форму и выкристаллизовывается в эритроцитах, вызывая их деформацию (образование серповидных форм), что и приводит к нарушению функции крови.

Гемоглобин - кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде и нерастворимое в спирте, эфире и хлороформе. В эритроцитах гемоглобин находится в растворенном состоянии, несмотря на то, что его

содержание более 30%. При изменении аминокислотного состава глобина может произойти и изменение его растворимости, как у HbS.

Растворы гемоглобина окрашены в темно-красный цвет и имеют характерные спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Изоэлектрическая точка гемоглобина ~ 7. В кислой и щелочной среде гемоглобин легко денатурируется, скорость денатурации различна у различных видов гемоглобинов. В кислой среде связь между гемом и глобином легко разрывается. Свободный гем легко окисляется кислородом воздуха до гематина, в котором атом железа трехвалентен.

Наиболее характерным свойством гемоглобина является обратимое присоединение газов O₂, CO и др. Образовавшиеся при этом соединения называются оксигемоглобином и карбоксигемоглобином, соответственно. Реакция присоединения молекулярного кислорода не является истинным окислением гемоглобина, так как валентность железа в геме при этом не изменяется, и эту реакцию правильнее называть оксигенацией. Истинное окисление гемоглобина происходит только тогда, когда железо переходит в трехвалентное состояние.

В крови гемоглобин существует по крайней мере в четырех формах: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, карбоксигемоглобин, метгемоглобин. В эритроцитах молекулярные формы гемоглобина способны к взаимопревращению, их соотношение определено индивидуальными особенностями организма.

Клиническое значение

- *Снижение* концентрации гемоглобина: анемии.

Повышение концентрации гемоглобина: полицитемия, гемоконцентрация при дегидратации, ожогах, кишечной непроходимости, упорной рвоте; пребывание на больших высотах, чрезмерная физическая нагрузка или возбуждение; сердечно-сосудистая патология, обычно врожденная, приводящая к значительному венозному сбросу; заболевания легких, приводящие к снижению легочной перфузии, плохой аэрации легких, легочной артериальной фистуле; хроническое химическое воздействие нитритов, сульфонамидов, вызывающих образование мет- и сульфогемоглобина.

Нормальные величины: у мужчин 130-160 г/л; у женщин; 120-140 г/л.

Содержание гемоглобина обычно ниже у недоношенных, чем у доношенных новорожденных. Содержание гемоглобина снижается на ~ 10% в промежутке времени от 17 до 07 час утра, а также после еды. Снижение гемоглобина от нормальных величин на ~ 6% наблюдается при взятии пробы в положении лежа.

Незначительное, но диагностически значимое, снижение нижнего порога нормальных величин гемоглобина встречается у мужчин возрастной группы 65-74 года.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Общая характеристика методов

Определение содержания гемоглобина в крови человека является одним из самых важных и массовых показателей. Для определения гемоглобина чаще всего анализируют производные гемоглобина, образовавшиеся в процессе его окисления и присоединения к гему различных химических групп, приводящих к изменению валентности железа и окраски раствора.

Из "старых" методов, все еще применяемых в ряде лабораторий, остановимся на следующих: сапониновом и методе Сали.

При использовании сапонинового метода тельца Гейнца не растворяются, раствор остается мутноватым, за счет чего может меняться спектр поглощения раствора, и ошибка при этом достигает 20-30%.

В методе Сали измеряется гематин, образовавшийся при взаимодействии гемоглобина с соляной кислотой. Метод основан на визуальной оценке содержания гемоглобина путем сравнения окраски исследуемой пробы со стандартными растворами солянокислого гематина. Ошибка метода достигает ~ 30%, на результаты определения влияют многие факторы: время реакции между гемоглобином и соляной кислотой, которое может колебаться от 2 до 40 мин в зависимости от содержания белков крови; оттенок цвета геминхлорида, зависящий от содержания билирубина в крови; характера освещения и пр.

Химические и спектрофотометрические методы имеют высокую точность и рекомендуются в качестве референсных, но из-за трудоемкости и значительной стоимости анализа для рутинных определений не применяются.

Для рутинных лабораторных исследований наиболее предпочтительны колориметрические методы, как наиболее дешевые, простые и быстрые в исполнении. Кровь человека - это нормальная смесь производных гемоглобина с различными спектрами поглощения. При количественном определении гемоглобина колориметрическими методами возникает проблема в выборе реагента, который превращал бы все производные гемоглобина только в одну форму перед фотометрическим анализом. Лучшими методами, количественно превращающими гемоглобин в его производные, оказались гемиглобинцианидный (HbCN), гемихромный (HbChr) и гемиглобиназидный (HbN₃), которые при фотометрировании дают наименьшую ошибку определения среди других методов анализа.

Интерференция при всех колориметрических методах анализа

Повышение гемоглобина: гипертриглицеридемия, количество лейкоцитов более 25x10⁹/л, прогрессирующие заболевания печени, наличие легко преципитирующихся глобулинов (при миеломной болезни или при макроглобулинемии Вальденстрема).

- *Понижение гемоглобина:* у заядлых курильщиков вследствие образования неактивного HbCO.

Гемиглобинцианидный метод

Принцип гемиглобинцианидного метода основан на переводе всех форм гемоглобина в одну - гемиглобинцианид. Перевод гемоглобина в гемиглобинцианид осуществляется при его взаимодействии с трансформирующим раствором, содержащим феррицианид калия, цианид калия, дигидрофосфат калия и неионный детергент. Дигидрофосфат калия поддерживает уровень pH, при котором реакция проходит за 3-5 минут. Детергент усиливает гемолиз эритроцитов и предотвращает мутность, связанную с белками плазмы. Феррицианид калия окисляет все формы гемоглобина в метгемоглобин, который образует с цианистым калием гемиглобинцианид, имеющий красноватый цвет, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе.

Характеристика метода

Гемиглобинцианидный метод, разработанный в 1936 г Дабкинским, был одобрен Международным Комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) в 1963 г.

Основные достоинства гемиглобинцианидного метода является то, что HbCN является стабильным производным гемоглобина, и все имеющиеся в крови формы гемоглобина могут быть быстро и количественно превращены в HbCN;

Метод обеспечивает возможность получения результатов с погрешностью, не превышающей $\pm 2\%$.

Требования безопасности при работе с раствором, содержащим цианистые соединения

При всех положительных параметрах гемиглобинцианидного метода большим его недостатком является то, что он основан на применении ядовитых цианистых соединений (о чем уже как-то и забыли). Вместо цианистого калия многие применяют маскированный цианид - ацетонциангидрин, который в процессе приготовления трансформирующего раствора распадается с образованием цианид-иона. Характер действия ацетонциангидрина на человека сходен с действием синильной кислоты, но эффект развивается медленнее. Ацетонциангидрин всасывается через кожу и может вызывать тяжелые отравления. Его предельно-допустимая концентрация (ПДК) составляет 0,9 мг/м³, класс опасности 2.

В НИИ экологии человека НЦМЭ Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН показали, что хроническая интоксикация цианистыми соединениями проявляется у людей в виде гиперплазии щитовидной железы с соответствующими изменениями гормонального фона.

Для работы с цианистыми соединениями необходимо соблюдение специальных мер предосторожности: применение фильтрующих противогазов, спецодежды; оснащение рабочего места местной и общей вытяжной вентиляцией; необходимостью проведения контроля за концентрацией ацетонциангидрина в воздухе, тщательную герметизацию аппаратуры и ее продувание перед началом работы

К недостатку метода можно отнести и длительное время реакции – около 20 минут.

Гемихромный метод

С развитием методов анализа для определения гемоглобина в крови разработан новый колориметрический метод, не содержащий в составе реагентов цианистых соединений, которые заменены жирными кислотами с феррицианидом калия или поверхностно-активными веществами, лучший из которых - додецилсульфат натрия (SDS).

Принцип гемихромного метода

Принцип гемихромного метода основан на переводе всех форм гемоглобина в одну - гемихром. При взаимодействии гемоглобина с трансформирующим раствором, содержащим жирные кислоты с феррицианидом калия или додецилсульфат натрия, происходит его превращение в окисленную низкоспиновую форму - гемихром (HbChr), имеющую красноватый цвет, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе.

Характеристика метода

Гемихромный метод определения гемоглобина в крови разработан Ахрем А.А. с соавторами в 1986 г. Набор реагентов для определения гемоглобина в крови, основанный на данном методе, одобрен Комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ и рекомендован к применению в клинико-диагностических лабораториях уже в 1998 г.

Основным достоинством гемихромного метода является то, что содержащиеся в крови формы гемоглобина могут быть быстро и количественно превращены в HbChr при полной безвредности трансформирующего раствора;

Гемиглобиназидный метод и его варианты

Гемиглобиназидный метод также относится к колориметрическим, не содержащим в составе реагентов цианистых соединений, которые заменены азидом натрия.

Принцип гемиглобиназидного метода

Метод основан на переводе гемоглобина в метгемоглобин под воздействием нитрита натрия и дальнейшей конвертацией метгемоглобина в азидметгемоглобин при участии азидата натрия.

Характеристика метода

Гемиглобиназидный метод разработан Vanzetti в 1966 г, широко применяется в мире с 80-0-х годов XX века.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

Проба и требование к ней: свободотекущая капиллярная или венозная кровь; в качестве антикоагулянтов - ЭДТА, гепарин, аммоний или калий оксалаты. Проба стабильна 48 час при 4° С или 24 час при 23° С.

Преаналитическая фаза

Укажем на некоторые факторы, связанные с отбором пробы и составом исследуемой крови, которые обуславливают получение заведомо неправильного результата:

- при взятии капиллярной крови не допускается чрезмерное давление или выжимание крови, вызывающее выход межклеточной жидкости, которая разбавляет пробу крови и приводит к ошибочно низкой концентрации гемоглобина;
- наложение жгута на руку более, чем на одну минуту может привести к пролонгированному сосудистому стазу и ошибочно высокой концентрации гемоглобина в венозной крови;
- использование негомогенной пробы, полученной при недостаточном перемешивании;
- липимическая кровь;
- кровь, содержащая большое количество лейкоцитов.

Оборудование

- Фотоэлектрические гемоглобинометры. Приборы измеряют концентрацию гемоглобина; на дисплее сразу выдается концентрация гемоглобина в г/100 (или 1000) мл. Эти приборы прокалиброваны калибровочными растворами в зависимости от применяемого метода. Гемоглобинометры необходимо регулярно проверять и настраивать по калибровочным растворам.

К данным приборам относятся анализаторы Немосце и МиниГем:



- Фотометры со светофильтрами. Приборы измеряют оптическую плотность; при этом необходимо использовать светофильтры, поглощающие свет вблизи $\lambda = 540$ нм. Расчет концентрации гемоглобина проводится по калибраторам или калибровочному графику.



КФК-3:

- Автоматические гематологические анализаторы, например Micros (18 параметров):



Дозаторы

Для дозирования трансформирующего раствора используют обычные дозаторы с погрешностью дозирования 1-3%, для крови - пипетки Сали, механические дозаторы с погрешностью дозирования не более 1,0%.

Реагенты

1. Наборы реагентов для определения гемоглобина

Состав наборов

Определение гемоглобина гемиглобинцианидным или гемихромным методами проводят с использованием коммерческих наборов реагентов. В состав наборов входят трансформирующие реагенты и калибраторы (последние - не во все наборы).

Единственным анализатором, работающим на основе метгемоглобиназидного метода, является фотометр шведской фирмы Нетосие. Система состоит из одноразовых микрокювет, содержащих сухие реагенты, и специально разработанного двухволнового фотометра. Микрокювета служит и как пипетка, и как измерительная кювета, в ней же протекает и реакция.

2. Наборы контрольных растворов гемоглобина

Состав наборов

Наборы контрольных растворов гемоглобина необходимы для оценки правильности определения гемоглобина и для проведения внутреннего контроля качества. Наборы содержат 3 флакона по 2 мл контрольных растворов гемоглобина с концентрацией ~ 80, 120 и 160 г/л. Растворы готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки. Следует использовать наборы, концентрация гемоглобина в которых аттестована с погрешностью не более $\pm 2\%$.

Срок годности вскрытых контрольных растворов гемоглобина не менее 3 мес. в плотно закрытом виде при температуре 2-8° С.

Требования, предъявляемые к контрольным растворам гемоглобина

Растворы должны быть гомогенны, не содержать сгустков крови и механических включений, хорошо очищены от липидов и других примесных соединений. Наличие этих примесей создает легкую мутность реакционной смеси и способствует завышению результатов определения гемоглобина, которое в дальнейшем приведет к неправильным результатам анализа. Определение гемоглобина в контрольных растворах проводят аналогично определению гемоглобина в крови.

Последовательность проведения операций при определении гемоглобина в крови

1. Калибровка измерительного прибора и построение калибровочного графика (необходимы только для фотометров типа КФК, ФЭК);
2. Проведение внутреннего контроля качества;
3. Проведение анализа.

Калибровка измерительного прибора и построение калибровочного графика.

Для построения калибровочных графиков желательно использовать коммерческие наборы калибровочных растворов гемиглобинцианида или гемихрома (в зависимости от используемого метода) четырех концентраций, а не одной.

Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации гемоглобина строят по 4 точкам измеренной оптической плотности, соответствующей определенной концентрации гемоглобина. График должен представлять собой прямую линию, выходящую из начала координат. Если при его построении получается кривая линия - это указывает на неисправность прибора. Полученный прямолинейный график использовать при расчете концентрации гемоглобина в пробах крови.

Калибровочный график следует строить не реже 1 раза в неделю.

2. Проведение внутреннего контроля качества

При проведении исследований возможно возникновение различных погрешностей (систематических и случайных), связанных с ошибками операторов; приборными ошибками; неточностью пипеток; несоблюдением времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности; несоблюдением температурного режима; неомогенностью пробы и др. Эти и другие погрешности можно выявлять с помощью контрольных растворов гемоглобина, проводя внутренний контроль качества.

Определение гемоглобина следует проводить с использованием точно откалиброванных пипеток. Особое внимание следует уделять истинному объему крови (20 мкл), отбираемому микропипетками, поскольку погрешность в 1 мкл при последующем разведении крови трансформирующим раствором в 251 раз дает погрешность определения гемоглобина до 5%.

Систематические аппаратные ошибки:

- - неправильная калибровка измерительного прибора (составляющая до 40% от общего числа допускаемых ошибок). Она может быть связана: с ошибками при построении калибровочного графика; ошибками при расчете фактора; использованием некачественных калибровочных растворов; нелинейностью характеристик измерительного прибора, нестабильностью прибора;
- - использование неточно откалиброванных пипеток, что приводит к ошибкам разведения, составляющим ~ 50% от общего числа ошибок;
- - неправильный выбор способа дозирования пробы.

Случайные ошибки.

- - ошибки оператора вследствие: нарушения рекомендуемого температурного режима; несоблюдения необходимого времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности; использование некачественных или неправильно приготовленных трансформирующих реагентов; неправильного измерения или расчета;
- - ошибки, связанные с неправильным отбором пробы и составом крови (см "Преаналитическая фаза").

Вначале следует исключить возможные систематические ошибки, связанные с влиянием аппаратного фактора, но если и тогда результат определения гемоглобина в контрольном растворе не попадает в диапазон допустимых значений, следует обратить внимание на возможность появления случайных ошибок. Так, несоблюдение температурного режима (использование контрольных, калибровочных или трансформирующего раствора, недоведенных до комнатной температуры (18-25° С), может приводить как к заниженным, так и к завышенным результатам). Несоблюдение времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности занижает результаты, так как оптическая плотность будет ниже максимальной. Использование трансформирующих реагентов, не отвечающих требованиям, изложенным выше, приводит к снижению результатов, так как возможна неполная трансформация гемоглобина в гемиглобинцианид или гемихром. При правильном определении гемоглобина в контрольных растворах можно приступать к определению его в крови.

Проведение анализа

1. На автоматических гематологических анализаторах:

Необходимо только ввести образец крови в прибор, погрешность не превышает 2%.

2. На фотометрах ФЭК, КФК, анализаторах гемоглобина МиниГем-540:

Точность зависит от следующих факторов:

1. Качество трансформирующего раствора;
2. Точность дозирования 5 мл трансформирующего раствора;
3. Точность дозирования 20 мкл крови;

Рассмотрим каждый из этих факторов с точки зрения обеспечения качества получаемого результата.

1. Для приготовления трансформирующего раствора следует использовать наборы от хорошо зарекомендовавших себя фирм – производителей. Очень важным моментом является качество воды, используемой для приготовления раствора. Даже незначительные примеси металлов могут существенно повлиять на устойчивость конечных продуктов цианметгемоглобиновой реакции. Для целей гемоглобинометрии желательно использовать деионизированную воду или бидистиллят. В крайнем случае, можно использовать обычную дистиллированную воду, но при этом следует следить за состоянием дистиллятора, собирать и хранить дистиллят только в тщательно вымытой стеклянной посуде.

Качество трансформирующего раствора можно оценить по стабильности оптической плотности конечной реакции. После добавления в трансформирующий раствор 20 мкл крови изменение оптической плотности на длине волны 540 нм должно прекратиться через 20 мин. Далее оптическая плотность должна оставаться постоянной в течение не менее 2-х часов.

2. Наилучшим средством дозирования 5 мл трансформирующего раствора является бутылочный дозатор-диспенсор

Категорически не рекомендуется использовать стеклянные пипетки и бюретки, поскольку в этом случае точность дозирования значительно ниже и велика вероятность грубых ошибок. Этот способ дозирования следует исключать из практики работы лаборатории.

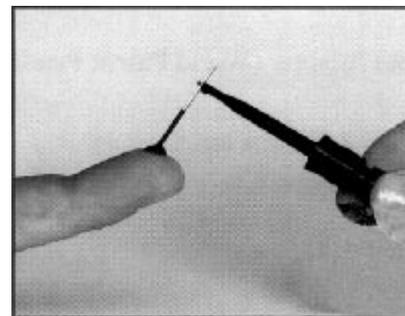
3. Наибольшую погрешность в определении концентрации гемоглобина дает процедура дозирования 20 мкл. цельной крови. Сегодня наиболее точным средством для выполнения этой операции являются капилляры с прецизионным объемом вместимости (так называемые **"end-to-end" капилляры**). Применение таких капилляров не требует от лаборанта специальных навыков, как в случае использования пипеток Сали, и практически исключает грубые ошибки дозирования.

Капилляр с прецизионным объемом вместимости представляет собой тонкий стеклянный капилляр, внутренний объем которого равен точно 20 мкл.

При касании концом капилляра, расположенного горизонтально, поверхности капли крови за счет капиллярных сил происходит немедленное втягивание крови в капилляр до полного его заполнения. После этого капилляр с кровью погружают в пробирку с трансформирующим раствором и путем нескольких перемешивающих движений добиваются того, чтобы кровь вышла из капилляра в раствор.

Оптимальное время измерения концентрации гемоглобина.

20 мкл капиллярной крови вносили в пробирку, содержащую 5 мл трансформирующего раствора (производства НПО "Ренам", Россия) и тщательно перемешивали. Содержимое пробирки переливали в



оптическую кювету. После чего реакцию смесь фотометрировали на гемоглобинометре **МиниГем 540** через каждую минуту в течение первых 30 минут и через каждые 10 минут в течение последующих 2 часов.

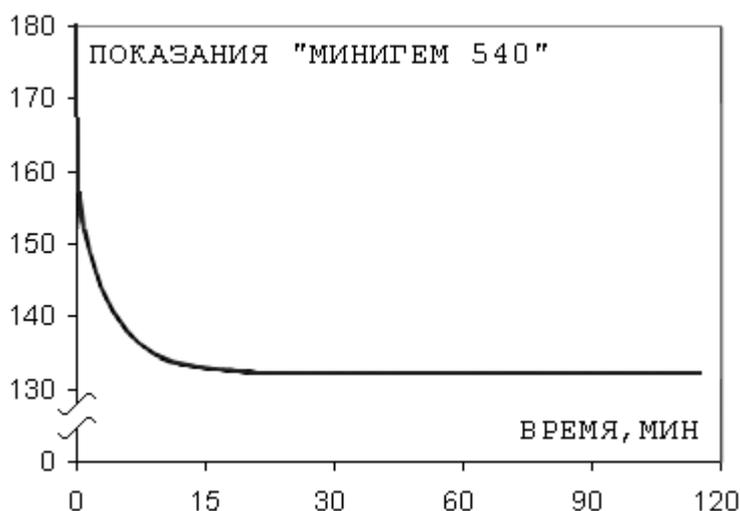


Рис. 1. Зависимость показаний гемоглобинометра **"МиниГем-540"** от времени инкубации образцов крови с трансформирующим раствором (использована кровь донора; $t = 22^{\circ}\text{C}$).

Из представленного графика видно, что лишь на 15 минуте от начала реакции лизиса показания прибора начинают стабилизироваться и далее уже не меняются в течение последующих 2 часов. Поэтому, измерение гемоглобина следует проводить не ранее, чем через 20 минут после внесения крови в пробирку с трансформирующим раствором, когда весь имеющийся в пробирке гемоглобин преобразуется в конечный продукт реакции - цианметгемоглобин. Если измерение производится раньше, то концентрация гемоглобина завышается.

3. На анализаторах гемоглобина "Нетосие":

Необходимо, взяв микрокювету двумя пальцами за заднюю часть, обмакнуть другую ее часть с реагентом в каплю цельной крови, при этом произойдет заполнение полости кюветы за счет капиллярных сил. После этого кювета помещается в фотометр, который отслеживает ход реакции и по ее завершении производит фотометрию. Фотометр производит измерения на двух длинах волн – 570 и 880 нм. с целью компенсации неспецифического изменения оптической плотности.

Кратко суммируем источники возможных ошибок при определении гемоглобина: использование некалиброванных пипеток и несовершенная техника дозирования проб крови; применение неупрежденного оборудования, не обеспечивающего линейную зависимость оптической плотности от концентрации гемоглобина в требуемой области измерений; нестабильность прибора; отсутствие внутрилабораторного контроля качества; недостаточная чистота кювет, особенно проточных; ошибки при построении калибровочных графиков и расчете факторов; использование контрольных растворов гемоглобина низкого качества; ошибки оператора, ошибки, допускаемые на преаналитической фазе.