

К вопросу о фотометрическом измерении концентрации гемоглобина
(модифицированный оксигемоглобиновый метод)

Давыдов В.М., Ованесов Е.Н., Сецко И.В

НПП "Техномедика", Москва

Введение

В клинической лабораторной диагностике используются несколько методов измерения концентрации гемоглобина крови. Основными и общепринятыми являются два из них: гемоглобинцианидный и оксигемоглобиновый. Эти методы, давно стали повседневными (рутинными) в лабораторной практике, но вопросы, касающиеся их достоинств и недостатков, остаются актуальными, несмотря на большое количество работ [1, 2, 3], написанных по этому поводу. Необходимость вновь обратиться к этой теме возникла в связи с появлением и использованием новых современных фотометрических гемоглобинометров, в том числе и портативных с автокалибровкой таких как МиниГЕМ⁵²³.

Среди наиболее часто задаваемых вопросов можно выделить следующие:

- 1) какие реагенты использовать,
- 2) как быстро после подготовки пробы крови и разведения можно производить измерения,
- 3) как соотношение производных гемоглобина влияет на результат?

В нашей статье показано, что для большинства клинических случаев погрешности измерения с помощью простого и быстрого модифицированного оксигемоглобинового методом с использованием фотометра с длиной волны излучения 523 нм не превышают погрешностей референтного гемоглобинцианидного метода [4].

Методы измерения

При использовании гемоглобинцианидного метода гемоглобин крови трансформируют с помощью раствора Драбкина в гемоглобинцианид (HiCN), имеющий максимум спектрального поглощения на длине волны 540 нм. Именно с привязкой к этой длине волны производится измерение поглощения света с последующим вычислением концентрации гемоглобина. Следует подчеркнуть, что в гемоглобинцианид преобразуются все основные производные гемоглобина - оксигемоглобин (HbO₂), дезоксигемоглобин (Hb), метгемоглобин (MetHb) и, в том числе, карбоксигемоглобин (HbCO). Этот метод является самым распространенным в настоящее время, и с учетом поправок на некоторые особенности оптических измерений, описанных в [5], безусловно соответствует требованиям по погрешностям измерения концентрации гемоглобина. К недостатку этого метода следует отнести то, что подготовка раствора для фотометрирования занимает не менее 20 минут, только после этого все производные гемоглобина трансформируются в устойчивую форму HiCN.

Простой и быстрый оксигемоглобиновый метод также является стандартным и рекомендованным Организацией всемирного здравоохранения. Однако у сторонников гемоглобинцианидного метода он вызывает справедливые замечания. Дело в том, что используемый для гемолиза эритроцитов 0,4% раствор аммиака позволяет быстро получить прозрачный раствор для фотометрирования, но этот раствор содержит смесь HbO₂, MetHbO и HbCO, причем MetHbO имеет не равный с другими производными гемоглобина молярный коэффициент экстинкции на длине волны 540 нм. Более того, на этой длине волны поглощение для MetHbO зависит от значения pH, а с течением времени производные гемоглобина в растворе трансформируются именно в MetHbO

Это можно избежать, используя модифицированный оксигемоглобиновый метод. Модификация метода [6], реализованная в приборе МиниГем⁵²³, заключается в использовании фотометра с длиной волны излучения 532 нм. Эта точка является изобестической для HbO₂ и MetHb, и тем самым устраняется вопрос о влиянии MetHb на результат измерения общего гемоглобина.

В количественном отношении остается открытым лишь вопрос о влиянии HbCO на результаты измерения.

Влияния HbCO на результаты измерения

Для проведения контрольных измерений нами были приготовлены три раствора:

1. раствор оксигемоглобина (HbO_2);
2. раствор карбоксигемоглобина (HbCO);
3. их смесь ($\text{HbCO} : \text{HbO}_2$) в соотношении 1:10.

В качестве исходного материала использовался препарат «Диagem - К» с паспортной концентрацией гемоглобина 159,4 г/л.

Первый раствор был получен разведением препарата «Диagem - К» в 0,4% растворе аммиака в соотношении 1:100. Второй раствор был получен путем пропускания газа CO в течение 30 мин. через первый раствор. В свою очередь, для получения газа CO использовался метод разложения муравьиной кислоты CH_2O_2 в присутствии концентрированной серной кислоты H_2SO_4 при нагревании. Кислоты были слиты в пробирку в пропорции 1:1, пробирка закрыта пробкой с трубкой. Выделяющийся при слабом нагревании газ CO пропускали через раствор гемоглобина.

На рис.1 представлены спектры поглощения (оптическая плотность, **D**) полученных растворов. Измеренные проводились на спектрофотометре Beckman для 10 мм кюветы в диапазоне длин волн 450 - 650 нм (λ).

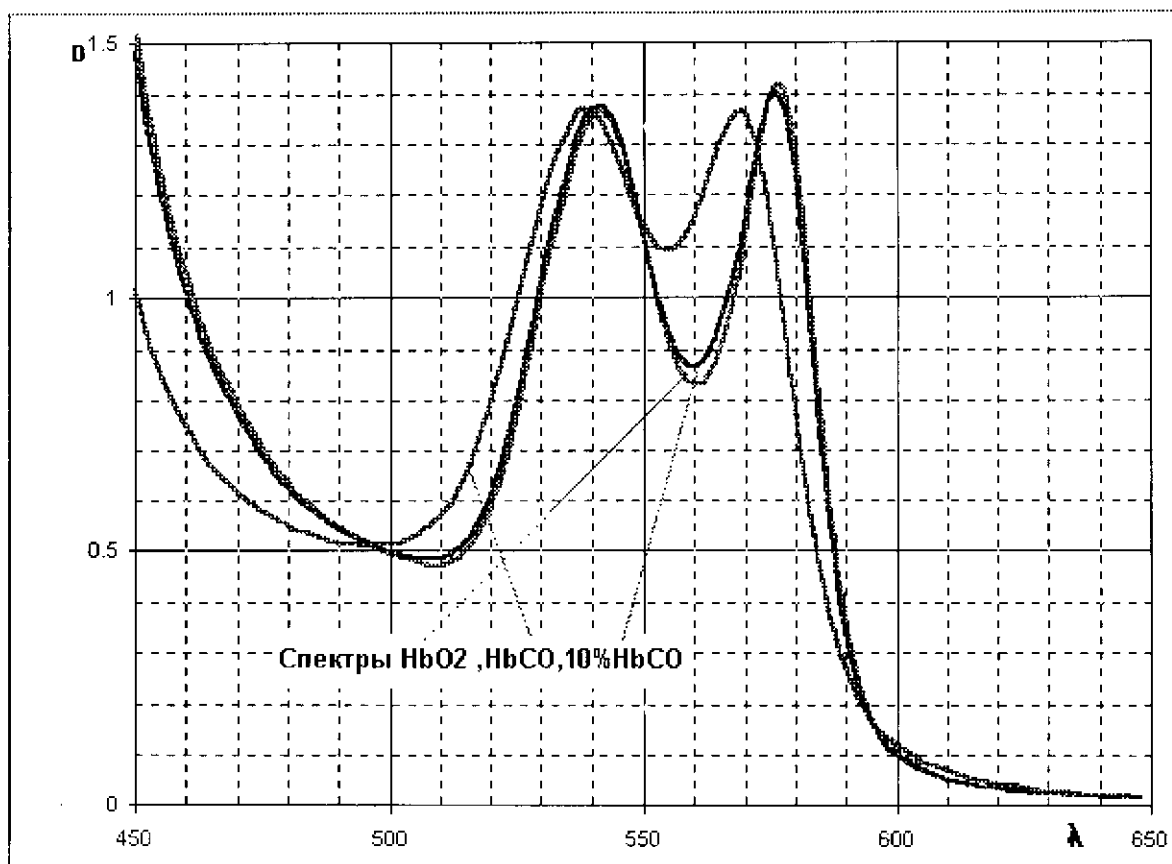


Рис. 1. Спектры поглощения растворов HbO_2 , HbCO и их смеси

Как видно из рисунка, на длине волна 540 нм растворы имеют одинаковые коэффициенты поглощения, что подтверждает правильность разведения приготовленных растворов, т.к. эта точка является, как известно, изобестической для HbO_2 и HbCO . На длине волны 523 нм, не являющейся изобестической точкой для HbO_2 и HbCO , наблюдается завышенное поглощение для HbCO по отношению к HbO_2 . Согласно данным работы [6] миллимолярной коэффициент поглощения на волны 523 нм для HbO_2 равен 7.12, а для HbCO - 10,3 (по данным работы [1]).

Рассмотрим более подробно насколько результаты измерения общего гемоглобина с использованием модифицированного оксигемоглобинового метода могут реально быть завышены при наличии НbCO в крови.

Во-первых, следует учесть, что при высоком парциальном давлении кислорода происходит его присоединение к гемоглобину, и в процессе разведения в растворе аммиака при подготовке пробы крови к измерению происходит эффективное замещение CO кислородом с образованием оксигемоглобина.

Во-вторых, следует подчеркнуть, что в физиологических условиях в крови и в растворе, подготовленном для измерений оксигемоглобиновым методом, содержание НbCO невелико. Если принят во внимание описание симптомов, приведенных в [7] (см. табл. 1), то, естественно, что в практике клинической лабораторной диагностики содержание НbCO в крови обычно не превышает 10%, а в исключительных случаях - 40%.

Таблица 1

Влияние концентрации НbCO в крови на состояние больного по данным работы [7]

НbCO (%)	Симптомы
0-10	Нет
10-20	Напряжение во лбу, расширение кожных сосудов
20-30	Головная боль и пульс в висках
30-40	Резкая головная боль, усталость, головокружение, ослабленное зрение, тошнота, рвота, упадок сил
40-50	Тоже, что и выше плюс учащенный темп дыхание и удушье
50-60	Тоже, что и выше плюс кома, конвульсии, дыхание Cheyne-Stokes
60-70	Кома, конвульсии, слабые дыхание и пульс, возможна смерть
70-80	Замедление и остановка дыхания, смерть через несколько часов

В какой-то мере рассматриваемый вопрос влияние НbCO на погрешность измерения оксигемоглобиновым методом схож с влиянием сульфогемоглобина, который не трансформируется в NiCN при измерении гемоглобинцианидным методом. Несмотря на то, что при ряде заболеваний и особенно при отравлении анилином и его производными сульфогемоглобин может накапливаться в крови [1], его влияние на результаты измерения гемоглобинцианидным методом считается незначительным.

Обсуждение результатов и выводы

Полученные результаты спектрофотометрических исследований могут быть полностью применены к оценке погрешности измерения с помощью прибора МиниГЕМ⁵²³, который представляет собой специализированный портативный фотометр с узкополосным интерференционным светофильтром с полосой пропускания около 15 нм на длине волны 523 нм. Для фотометрирования приготавливается разведение крови в слабом щелочном растворе (0,04% раствор аммиака). Эта методика отличается от унифицированного гемоглобинцианидного метода быстротой приготовления пробы, доступностью и дешевизной реактива. Время лизирования составляет примерно 2 сек., после чего проба может фотометрироваться.

При концентрации НbCO менее 10% результаты измерения общего гемоглобина аммиачным методом при использовании прибора МиниГЕМ⁵²³ окажутся завышенными, но не более, чем на 1,5 %.

Благодарности

Пользуясь случаем, авторы считают своим приятным долгом поблагодарить заслуженного деятеля науки России, заведующего лабораторией гемоцитологии Гематологического НИЦ РАМН, руководителя экспертной группы МЗ РФ по внешнему контролю качества гематологических исследований, профессора Г.И. Козинца, заведующего клинико-диагностической лабораторией Республиканской клинической больницы №2 доктора В.М. Розенталя, а также сотрудников Центральной клинико-

диагностической лаборатории больницы им. С.П. Боткина и лаборатории Главного военного клинического госпиталя им. академика Н.Н. Бурденко за высокую оценку, данную прибору МиниГЕМ⁵²³ по результатам клинических испытаний в 1994 - 1998 гг.

Литература

1. М.С.Кушаковский. Клинические формы повреждения гемоглобина (эриология, патогенез, спектрофотометрические и биохимические методы исследования, диагностика, лечение). - Л.: Медицина, 1968.
2. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник под ред. В.В.Меньшикова. - М.: Медицина, 1987.
3. J.V.Dacie, S.M.Leis. Estimation of haemoglobin concentration (Hb). In book *Practical Haematology*. Churchill Livingstone, 1995, p. 50-54.
4. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *J. Clin. Pathol* 1996; 49: p.271-274.
5. К.А.Захаров, Е.Н.Ованесов, И.В.Сецко. Особенности оптических измерений при определении гемоглобина. *Лабораторная медицина*. 1998, №1.
6. S.M.Snell, M.A.Marini. A convenient spectroscopic method for the estimation of hemoglobin concentrations in cell-free solutions. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1988, 17, p.25-34.
7. Gordon E. Hartzell, Ed., *Advances in Combustion Toxicology*, Volume One, Technomic Publishing, Inc., 1989, p. 23.