

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ
ПРАКТИКЕ БЕНЗИДИНОВОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СВОБОДНОГО ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ**

КОЗЛОВСКИЙ В.И.*, АКУЛЁНОК А.В.*[,], БЫКОВСКИЙ П.П.**,
НИКОЛАЙКИН С.В.*

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
УЗ ВГП № 6 г. Витебска***

Резюме. Внутрисосудистый гемолиз является осложнением целого ряда патологических состояний и приводит к развитию гиперкоагуляции с блокадой кровотока в мелких сосудах. Предложенная модификация бензидинового метода определения свободного гемоглобина с использованием спектрофотометра PV1251 C «СОЛАР» позволяет выявить наличие внутрисосудистого гемолиза и проводить мониторинг лечебных мероприятий.

Впервые выявлено наличие статистически значимого большего повреждения эритроцитов у больных артериальной гипертензией по сравнению с контрольной группой, отмечена тенденция к уменьшению содержания свободного гемоглобина на фоне проводимой терапии.

Ключевые слова: свободный гемоглобин, бензидиновый метод, артериальная гипертензия.

Abstract. Intravascular hemolysis is the complication of a whole series of pathologic states and leads to the development of hypercoagulation with the blockade of blood flow in the small vessels. The proposed modification of the benzidine method of determining free hemoglobin with the use of a spectrophotometer PV1251 C with «SOLAR» makes it possible to reveal the presence of intravascular hemolysis and to conduct monitoring therapeutic measures. The presence of the statistically significant larger damage of erythrocytes in the patients with arterial hypertension in comparison with the control group is for the first time revealed, tendency toward the decrease of the content of free hemoglobin of the against the background conducted therapy is noted.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный медицинский университет», кафедра факультетской терапии, - Козловский В.И.

Внутрисосудистый гемолиз эритроцитов является универсальным патофизиологическим феноменом, возникающим при различных патологических состояниях. Усиление процессов внутрисосудистого разрушения эритроцитов сопровождается рядом патогенетически неблагоприятных реакций, что приводит к нарушениям функционирования различных систем организма [1], развитию ДВС-синдрома и острой почечной недостаточности.

Оценка содержания маркёров внутрисосудистого гемолиза является весьма актуальной в диагностическом процессе и мониторинге проводимых лечебных мероприятий в клинической практике гематологов, инфекционистов, токсикологов, нефрологов, реаниматологов, кардиологов и врачей других специальностей. Однако методы и стандарты ранней диагностики внутрисосудистого гемолиза не разработаны.

Одним из маркёров внутрисосудистого гемолиза является повышение в крови содержания свободного гемоглобина (СГ). У практически здоровых людей содержание СГ в плазме крови составляет 10-40 мг/л, или 0,16-0,62 мкмоль/л [2]. После воздействия повреждающего эритроциты фактора уровень СГ повышается в течение часа и снижается до нормальных значений в течение 8 часов за счёт образования комплексов с гаптоглобином. Ёмкость гаптоглобина в отношении его способности к связыванию СГ составляет 1000 мг в 1л крови. Превышение этой концентрации СГ (до значений более 1,2 г/л крови) и/или снижение уровня гаптоглобина крови (например, при нарушении синтетической функции печени) сопровождается связыванием избыточного СГ с альбуминами. Комплексы «гемоглобин–гаптоглобин» не фильтруются в

клубочках почек, а поглощаются и разрушаются клетками системы фагоцитирующих мононуклеаров (ретикуло-эндотелиальной системы), в частности, в печени [3]. При усилении гемолиза эритроцитов СГ фильтруется почками в мочу, вследствие чего возникает гемоглобинурия; при этом часть гемоглобина адсорбируется клетками почечного эпителия, окисляется в гемосидерин, который обнаруживается в моче.

Для определения концентрации СГ в крови широкое применение нашли фотометрические методы, основанные на регистрации изменения окраски производных гемоглобина при взаимодействии гема с различными реагентами. Среди них:

1. Азопирамовый метод определения СГ [4], заключающийся в окислении амидопирина перекисью водорода с последующим взаимодействием продукта окисления с солянокислым анилином. Катализатором реакции служит гемоглобин. Участие анилина в реакции формирования окрашенного комплекса приводит к образованию стойкого красителя, позволяющего идентифицировать присутствие гемоглобина.

2. Гемиглобинцианидный метод в модификации Савельева О.Н. [5], зарекомендовавший себя как сравнительно простой и доступный к использованию в работе любой экспресс-лаборатории. При окислении гемоглобина железосинеродистым калием образуется гемиглобин, который после взаимодействия с ацетонциангидрином дает окрашенное в красный цвет соединение – гемиглобинцианид.

3. Метод определения гемоглобина в плазме крови [6], основанный на реакции образования солянокислого гематина при добавлении к крови соляной кислоты: имеет невысокую чувствительность и позволяет выявить концентрации СГ порядка 0,1 г/л. С учетом того, что с течением времени окраска солянокислого гематина изменяется, при использовании данного метода рекомендуется придерживаться строго определенно срока проведения фотометрии раствора. Применение этого метода целесообразно для выявления

выраженного гемолиза, что может иметь место для оценки пригодности эритроцитарной массы для гемотрансфузии.

4. Иммунонефелометрический (турбидиметрический) метод [7], при котором концентрация СГ определяется по интенсивности рассеянного света. Он является высоко специфичным, но и более дорогим вследствие применения антител к гемоглобину.

5. Бензидиновый метод определения СГ, основанный на окислении бензидина свободным гемоглобином в присутствии перекиси водорода [8, 9, 10], зарекомендовал себя как более чувствительный и точный в сравнении с азопирамовым и гемоглобинцианидным методами. Этот метод также не требует применения дорогостоящего оборудования и реагентов, что делает его широко доступным для работы клинико-диагностических лабораторий. Однако применение оригинального метода в настоящее время ограничено вследствие следующих причин:

§ Использование устаревшего фотоэлектроколориметра ФЭК-М;

§ Измерение содержания СГ проводилось в плазме крови, требующей применения антикоагулянтов для стабилизации крови;

§ Для создания калибровочных кривых применялись растворы гемоглобина с известной концентрацией (гемолизаты), которые имели ограниченный срок хранения;

§ Регистрация величины оптической плотности исследуемой пробы осуществлялась путем выявления максимального показания после 3-5 кратного подряд измерения.

Для решения этих проблем нами предложена модификация бензидинового метода определения СГ в сыворотке крови, адаптированная к широко используемому в практике работы клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений спектрофотометру серии PV1251 С «СОЛАР».

Цель работы – модифицировать бензидиновый метод определения СГ в крови с использованием спектрофотометра PV1251 С «СОЛАР».

Реактивы и оборудование

Определение содержания СГ в сыворотке крови бензидиновым методом требует наличия следующих реагентов и оборудования:

1. 0,2 н. раствор уксуснокислого натрия. В мерной колбе емкостью 1 л растворяют 27,22 г уксуснокислого натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), доводят дистиллированной водой объем до метки.

2. 0,2 н. раствор уксусной кислоты. В мерную колбу емкостью 1 л вводят 11,3 мл 99% (ледяной) уксусной кислоты и доводят объем до метки дистиллированной водой.

3. Ацетатный буфер (рН 4,6). Смешивают 480 мл 0,2 н. раствора уксуснокислого натрия и 520 мл 0,2 н. раствора уксусной кислоты, проверяют рН.

4. 0,3% раствор перекиси водорода. Готовят непосредственно перед употреблением из пергидроля, разведенного в 100 раз.

5. 0,1% раствор бензидина. 50 мг солянокислого бензидина растворяют в мерной колбе емкостью 50 мл примерно в 35-40 мл ацетатного буфера при нагревании до 70-80°C на водяной бане. После растворения охлаждают до комнатной температуры и доводят объем до метки ацетатным буфером. Раствор фильтруют в темную склянку и хранят не более 7 суток, не охлаждая его ниже температуры 16°C для предупреждения кристаллизации бензидина.

6. Референтный раствор гемоглобина «Гемоконт» (изготовитель – ОО «Медлакор», Санкт-Петербург, Россия).

7. Центрифуга типа ОПН-3.

8. Микропипетки (объемом 0,1 мл, 0,2 мл).

9. Простые и центрифужные пробирки.

10. Спектрофотометр PV1251 С «СОЛАР» (Беларусь),
укомплектованный стандартными кюветами.

С целью оптимизации условий фотометрического определения СГ, а именно: установления максимума светопоглощения окрашенного комплекса (что необходимо для выбора длины волны монохроматического светового потока) и стандартизации периода времени, требуемого для осуществления фотометрии окрашенного раствора, – использовали спектрофотометр SPECORD-250 (Германия). Для выполнения процедуры фотометрии готовили компенсационный раствор, состоящий из 2 мл ацетатного буфера, 1 мл перекиси водорода, 1 мл раствора бензидина и 0,02 мл физиологического раствора. Одновременно готовили пробу, в состав которой входили 2 мл ацетатного буфера, 1 мл перекиси водорода, 1 мл раствора бензидина и 0,02 мл рабочего раствора гемоглобина с концентрацией 0,1 г/л, приготовленного из референтного раствора «Гемоконт».

Длина волны, при которой отмечался максимум поглощения окрашенного продукта реакции, составила 600 нм (рис. 1).

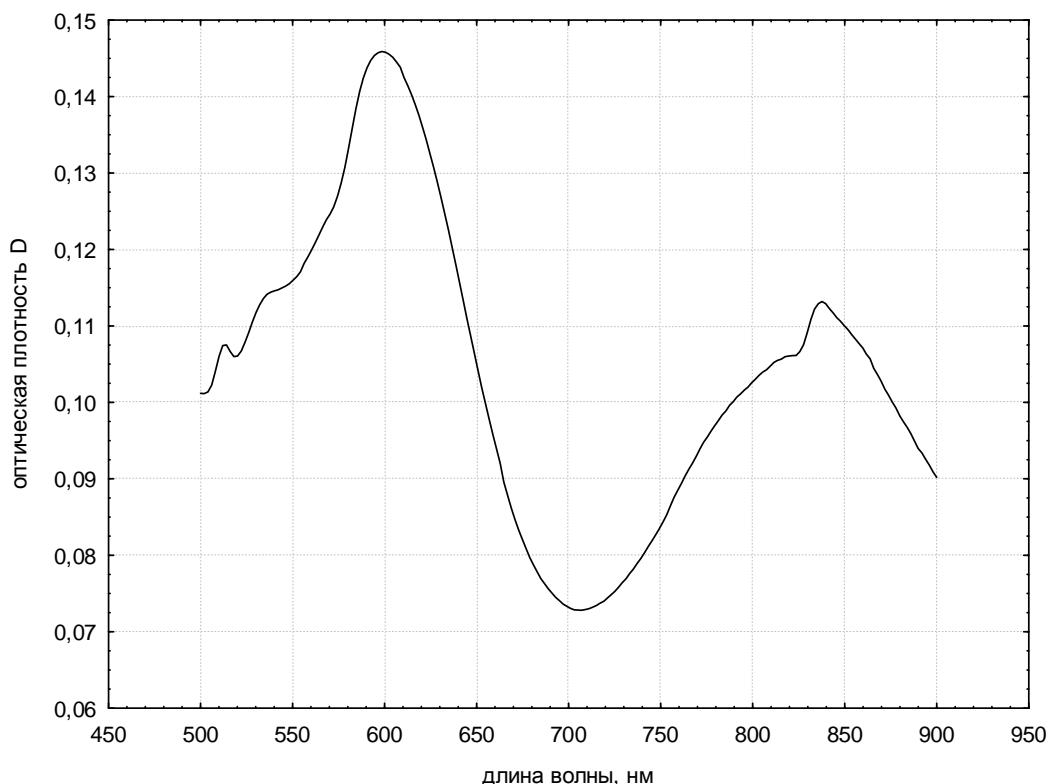


Рис. 1. Показатели оптической плотности (D) раствора при различных длинах волн.

Для изучения временных параметров изменения окраски пробы в результате окисления бензидина гемоглобином анализировали образцы стандартного калибровочного раствора с концентрацией 0,1 г/л. Выявлено, что интенсивность голубой окраски максимально увеличивается в первые 6 минут от начала реакции и выходит на плато на 10-12 минуте. Спустя 12 минут окраска приобретает лилово-бурый оттенок и величина оптической плотности начинает уменьшаться. Оптимальное время измерения максимальной величины оптической плотности составило 10-12 мин (рис. 2).

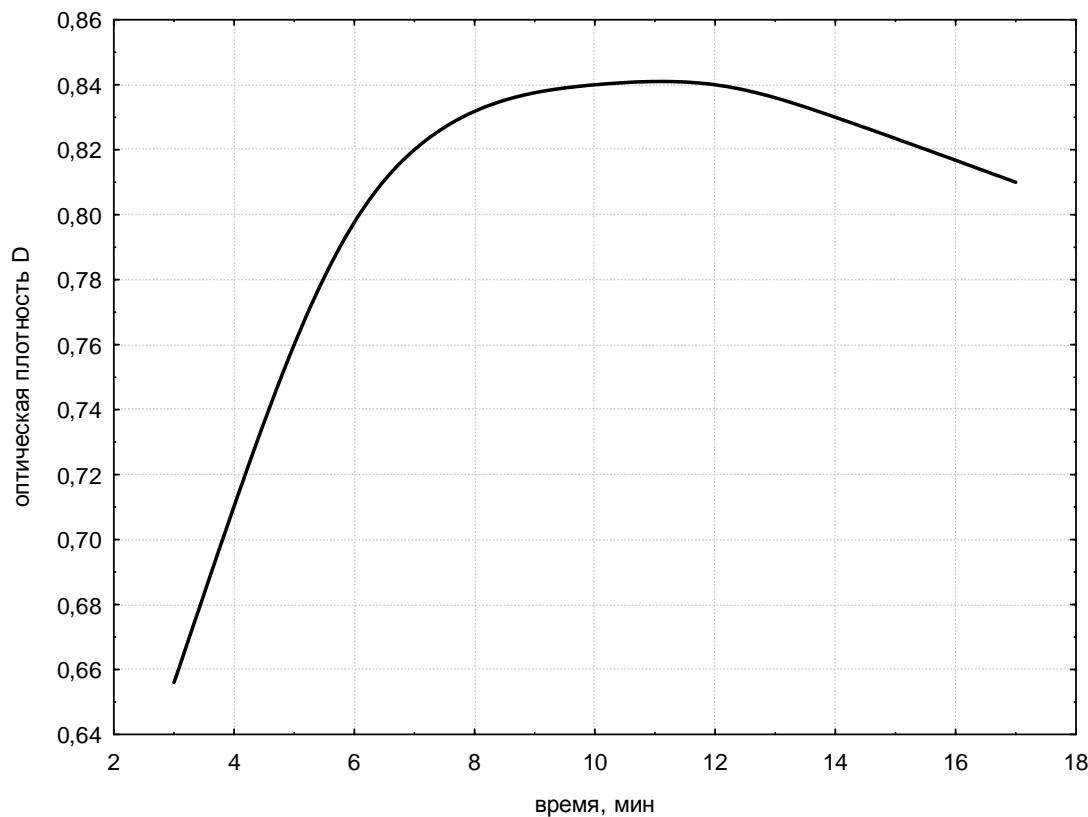


Рис. 2. Кинетика окисления бензидина гемоглобином в присутствии перекиси водорода на спектрофотометре SPECORD-250 ($\lambda=600$ нм).

Построение калибровочного графика

В качестве стандартного калибровочного раствора использовали референтный раствор гемоглобина «Гемоконт» с концентрацией 120 г/л. Из него готовили (путем разбавления дистиллированной водой) основной стандартный раствор с концентрацией 1 г/л. Этот раствор хранится при

температуре 4–8⁰С. Непосредственно перед измерением из основного раствора приготавляли серию рабочих растворов более низкой концентрации (0,2 – 0,1 – 0,05 – 0,025 – 0,01 – 0,005 г/л). В кюветы, содержащие 2 мл ацетатного буфера, 1 мл перекиси водорода и 1 мл раствора бензидина, помостью микропипетки переносили по 0,02 мл каждого рабочего раствора. Состав компенсационного раствора аналогичен тому, что был описан для опытных проб.

Для каждой известной концентрации С (калибровочной точки) согласно вышеописанной методики проводили три параллельных исследования на спектрофотометрах SPECORD-250 и PV1251 С «СОЛАР», определяли оптическую плотность D в каждой калибровочной пробе, вычисляли средние значения, с использованием которых строили калибровочные графики (рис. 3).

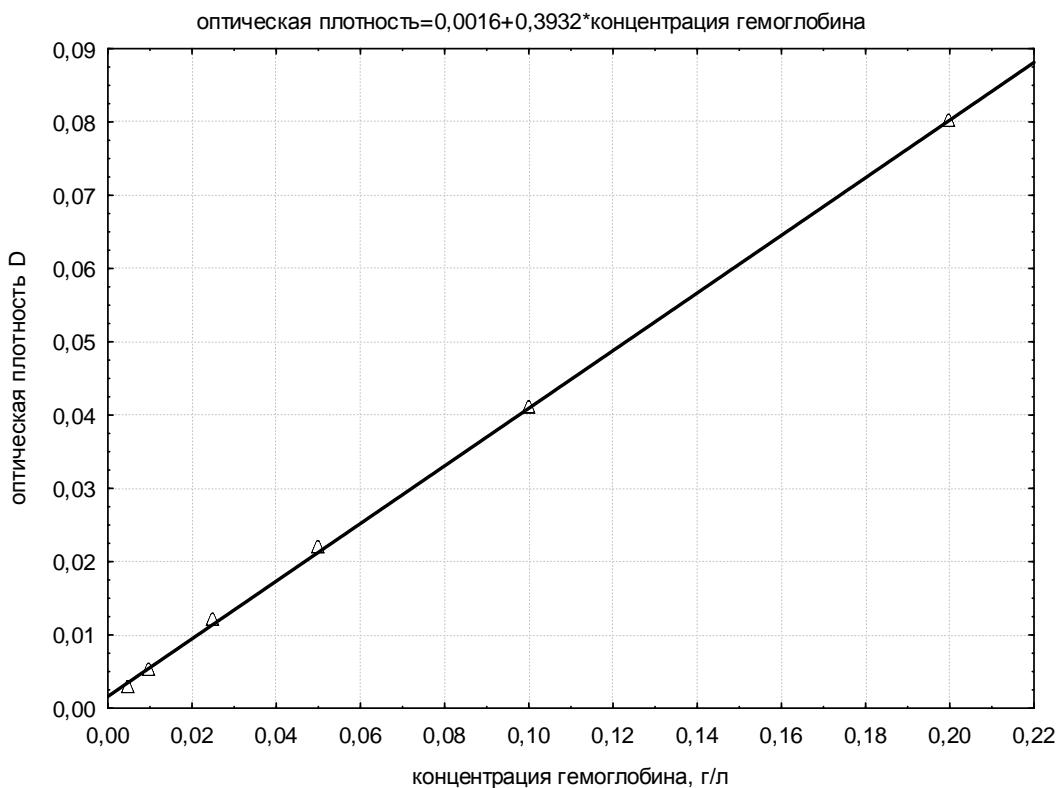


Рис. 3. Значения оптической плотности D растворов с разной концентрацией СГ при длине волны монохроматического светового потока 600 нм (спектрофотометр PV1251 С «СОЛАР»).

Судя по приведенному калибровочному графику, линейная функция сохраняется в пределах измеряемых концентраций 0,005-0,2 г/л.

Подготовка пациента

Исследовали содержание СГ в крови 23 здоровых человек (средний возраст 50 ± 6 лет) и 37 больных артериальной гипертензией (АГ) II степени (средний возраст $62\pm9,7$ лет). У больных АГ исследования проводили при поступлении в стационар (во время острого повышения артериального давления) и в конце стационарного лечения.

Перед выполнением теста обследуемые избегали тяжёлых физических упражнений (за сутки), не принимали пищу (в течение 3 часов до исследования).

Получение материала для исследования

Взятие крови производили утром натощак путём пункции локтевой вены с минимальной травматизацией при наложении жгута на плечо. Удалив первые 2 мл крови, брали в стеклянную пробирку 5 мл крови и центрифугировали так, чтобы не повредить эритроциты, в течение 10 мин при 1500-2000 об/мин на центрифуге типа ОПН-3. После получения 1 мл сыворотки ее подвергали повторному центрифугированию при 3000 об/мин в течение 15 мин для полного избавления ее от могущих оказаться в ней фрагментов клеток, и прежде всего – лейкоцитов, обладающих пероксидазной активностью.

В случае возникновения гемолиза при венепункции или получения иктерической (богатой билирубином) или липемической сыворотки повторяли процедуру взятия крови.

Ход определения

В пробирку отмеряли 2 мл ацетатного буфера, 1 мл перекиси водорода, 1 мл раствора бензидина, 0,02 мл испытуемой сыворотки. Компенсационный раствор, состоящий из 2 мл ацетатного буфера, 1 мл перекиси водорода, 1 мл раствора бензидина и 0,02 мл физиологического раствора, готовили одновременно с пробой. Фотометрию проб осуществляли в кювете с толщиной

оптического слоя 10 мм относительно компенсационного раствора при длине волны $\lambda=600$ нм. Регистрировали первоначальное показание величины оптической плотности $D_{\text{начальн.}}$ (при установке кюветы) и после 10-12 минут экспозиции ($D_{\text{конечн.}}$) в двух параллельных пробах. Все измерения проводили при температуре 18-21°C.

Концентрации СГ в сыворотке крови вычисляли по ниже приводимым формулам:

$$C_{\text{опыт}} = (\Delta D_{\text{опыт}} * C_{\text{станд}}) / \Delta D_{\text{станд}},$$

где: $\Delta D_{\text{опыт}} = (D_{\text{конечн.}} - D_{\text{начальн.}})_{\text{опыт}}$ – изменение оптической плотности исследуемого раствора за время экспозиции;

$\Delta D_{\text{станд}} = (D_{\text{конечн.}} - D_{\text{начальн.}})_{\text{станд}}$ – изменение оптической плотности стандартного раствора за время экспозиции;

$C_{\text{станд}}$ – концентрация стандартного раствора.

Результаты апробации предложенного метода в клинической практике

При обследовании 23 практически здоровых людей (11 (47,8%) мужчин, 12 (52,2%) женщин) установлено, что концентрация свободного гемоглобина в сыворотке крови варьирует в пределах от 17 до 45 мг/л СГ (в среднем 31 ± 9 мг/л). Различия концентрации СГ в крови в зависимости от пола оказались статистически недостоверны (32 ± 11 мг/л у мужчин vs. 29 ± 8 мг/л у женщин, $p > 0,05$). Интервалы и средние значения концентрации СГ в крови в зависимости от возраста представлены в таблице.

Таблица
**Интервалы и средние значения концентрации свободного гемоглобина СГ (мг/л)
в крови здоровых людей в зависимости от возраста**

Интервал	Возраст, лет	
	40-50 (n=11)	50-60 (n=12)
25 процентиль	21	23
75 процентиль	34	43
Среднее значение \pm стандартное отклонение, мг/л	29 ± 8	33 ± 11

Содержание СГ у больных АГ II степени при поступлении в стационар составило 90 ± 41 мг/л, в конце стационарного лечения оно достоверно

снизилось до 57 ± 24 мг/л ($p < 0,05$). Эти показатели были выше, чем в группе здоровых людей ($p < 0,01$).

Правильность и воспроизводимость результатов

Правильность результатов оценивали путём сравнения результатов параллельных (на спектрофотометрах PV1251 С «СОЛАР» и SPECORD-250) определений $\Delta D_{\text{станд}}$ в рабочих растворах гемоглобина с концентрацией 0,2 – 0,05 – 0,01 г/л, приготовленных из референтного раствора «Гемоконт» (рис. 4).

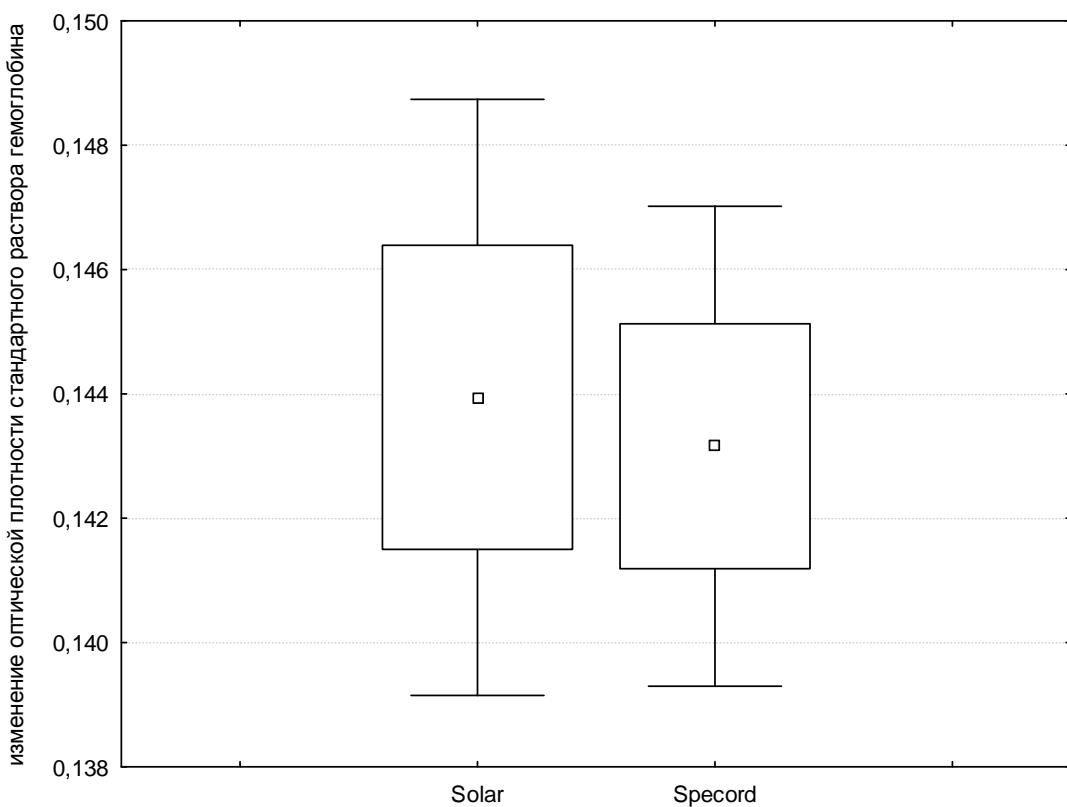


Рис. 4. Результаты сравнительных измерений оптической плотности ΔD рабочего раствора гемоглобина (0,2 г/л), полученные с использованием спектрофотометров PV1251 «СОЛАР» и SPECORD-250 ($\lambda=600$ нм).

Различия средних значений полученных результатов и средних квадратических отклонений оказались статистически не значимы ($p > 0,05$) для диапазона исследованных концентраций. Коэффициент корреляции Спирмена

полученных результатов составил 0,97, 0,95, 0,94 соответственно для концентраций 0,2 – 0,05 – 0,01 г/л ($p<0,01$).

Воспроизводимость рассчитывали по результатам повторных определений $\Delta D_{\text{станд}}$ (изменения оптической плотности рабочего раствора гемоглобина концентрацией 0,2 г/л за время экспозиции), в течение 20 суток на спектрофотометре PV1251 С «СОЛАР». $\Delta D_{\text{станд}}$ составила $0,143 \pm 0,009$, коэффициент вариации 5,3%, F-тест 1,66.

Нижний предел чувствительности метода, рассчитанный на основании сравнения результатов измерения на спектрофотометре PV1251 С «СОЛАР» холостой пробы и рабочего раствора гемоглобина низкой концентрации ($p<0,05$), составил 0,005 г/л.

Специфичность метода

Установлено, что ложное завышение показателей СГ в крови может наблюдаться при:

1. Повышении уровня билирубина в крови (гемолитические анемии с повышением внутриклеточного разрушения эритроцитов, острые и хронические гепатиты, циррозы печени, отравление хлороформом, четыреххлористым углеродом, ацетаминофеном, наследственные пигментные гепатозы, холангит, обтурация общего желчного протока камнем или опухолью, приём препаратов, вызывающих холестаз).

2. Метгемоглобинемии (токсическом действии различных химических веществ – нитратов и нитритов, анилина, пиридина и др.).

3. Повышении содержания липидов в крови (постпрандиальная триглицеридемия и хиломикронемия, острые и хронические гепатиты, механическая желтуха, сахарный диабет, нефротический синдром).

Преимущества метода

Предложенная модификация бензидинового метода определения свободного гемоглобина в крови позволяет:

1. Использовать отечественный прибор – спектрофотометр PV1251 С «СОЛАР», позволяющий осуществлять фотометрию окрашенного комплекса при длине волны, соответствующей максимуму его поглощения.
2. В два раза снизить расход реагентов (по сравнению с таковым при использовании оригинального метода).
3. Определять содержание свободного гемоглобина не в плазме, а в сыворотке крови, что позволяет отказаться от применения антикоагулянтов для стабилизации крови.
4. Для построения калибровочного графика в качестве стандартного калибровочного раствора вместо крови с определённым на фотометре содержанием гемоглобина использовать референтный раствор гемоглобина «Гемоконт», характеризующийся высокой стабильностью при хранении (срок годности после вскрытия флакона не менее 3 мес. в плотно закрытом виде при температуре 2-8° С), стандартной концентрацией (погрешность $\pm 2\%$).
5. Регистрировать величины оптической плотности исследуемой пробы через 10-12 минут экспозиции вместо 3-5 кратного подряд измерения величины оптической плотности и выявления максимального показания, что позволяет существенно упростить работу лаборанта.
6. Проводить измерения концентраций свободного гемоглобина в большом диапазоне.

Заключение

Таким образом, предлагаемая модификация бензидинового метода определения свободного гемоглобина в сыворотке крови с помощью спектрофотометра PV1251 С «СОЛАР» не требует дефицитного оборудования и реагентов, больших количеств исследуемых образцов, отличается быстрой выполнения анализа, высокой чувствительностью и точностью, что позволяет рекомендовать более широкое применение этого метода в клинической практике.

Литература

1. Rother R.P., Bell L., Hillmen P. et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease // JAMA. – 2005. – Vol. 293. – № 13. – P. 1653-1662.
2. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – М, 2002. – С. 271.
3. Faivre-Fiorina B., Caron A., Fassot C. et al. Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 276 (2 Pt 2). – P. H766-770.
4. Иоганнсен М.Г., Звягина Ф.Э. Безбензидиновый метод определения степени гемолиза // Лаб. дело. – 1987. – № 7. – С. 488-491.
5. Савельев О.Н., Сухоруков В.П., Киселева А.В. и соавт. Определение свободного гемоглобина плазмы крови гемиглобинцианидным методом // Лаб. дело. – 1990. – № 10. – С. 45-47.
6. Мосиенко В.С., Безвершенко И.А. Определение гемоглобина в плазме крови // Лаб. дело. – 1964. – № 8. – С. 479-480.
7. Lammers M., Gressner A.M. Immunonephelometric quantification of free haemoglobin // J. Clin. Chem Clin Biochem. – 1987. – Vol. 25. – P. 363-367.
8. Дервиз Г.В. // Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. А.А. Покровского. – М., 1969. – С. 349-353.
9. Дервиз Г.В., Бялко Н.К. Уточнение метода определения гемоглобина, растворённого в плазме крови // Лаб. дело. – 1966. – №8. – С. 461-464.
10. Standefer J.C., Vanderjagt D. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay // Clin Chem. – 1977. – Vol. 23. – P. 749-751.