

*На правах рукописи*

**ФАТКУЛЛИН Ким Вилевич**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ДИСГЕМОГЛОБИНОВ В КРОВИ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Гильманов Александр Жанович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой лабораторной диагностики Института дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Официальные оппоненты:**

**Козлов Антон Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Башарин Вадим Александрович** – доктор медицинских наук, профессор, начальник кафедры военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно- исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Защита состоится «11» октября 2018 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, дом 54 и на сайте <https://nrcerm.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук

**Санников Максим Валерьевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Патологические состояния, сопровождающиеся повышением в крови уровня нефункциональных форм гемоглобина (дисгемоглобинов), наибольшей клинической значимостью среди которых обладают карбокси- и метгемоглобин (СОHb, MetHb), представляют собой значимую медицинскую проблему. Повышенная концентрация дисгемоглобинов рассматривается как наиболее точный индикатор действия на организм токсических агентов - окиси углерода и метгемоглобинообразователей. Помимо случаев хронического отравления, определение уровня карбокси- и метгемоглобина является важным диагностическим исследованием, необходимым как для постановки диагноза острого отравления, так и для мониторинга состояния пациентов в условиях токсико-реанимационных отделений. Уровень карбоксигемоглобина у городских жителей, не связанных с воздействием монооксида углерода (СО) на производстве, в соответствии с методическими рекомендациями «Методы лабораторных исследований, используемые при диспансеризации рабочих с вредными условиями труда» (утв. Минздравом РСФСР 20.02.1980), может составлять до 4-6 %; концентрация метгемоглобина у работников, имеющих контакт с окислителями, не должна превышать 1-3 %. Согласно Toxicological Profile for Carbon Monoxide (2012), у здоровых людей рекомендовано использовать пороговые пределы нормы СОHb в крови 3 % для некурящих и 10 % для курильщиков. Вместе с тем, соответствие измеренного уровня СОHb / MetHb и тяжести отравления (по клинической картине) не всегда может быть однозначным из-за многочисленных физиологических факторов, влияющих на поглощение и элиминацию токсических агентов, что может вести к недооценке тяжести состояния пациента и ошибкам в планировании лечебных мероприятий.

В соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями (2013), ошибка определения уровня карбоксигемоглобина в 3-4 % и выше может вести к неверной оценке степени тяжести отравления угарным газом, которая в настоящее время определяется в основном по клиническим признакам (возможно, из-за отсутствия надежной аналитической базы). Поскольку взятие крови для измерения уровня карбоксигемоглобина непосредственно в очаге воздействия СО почти всегда невозможно, а его концентрация при поступлении пациента в лечебное учреждение может существенно отличаться от исходной, то в тех случаях, когда транспортировка пациента заняла продолжительное время или на догоспитальном этапе проводилась оксигенотерапия, для расчета начального уровня СОHb может использоваться номограмма С.Ж. Clark et al. (1981), требующая, однако, точного определения уровня СОHb как можно быстрее после поступления пациента в медицинскую организацию.

Измерение концентрации дисгемоглобинов в крови имеет большое значение для судебно-медицинской экспертизы: определение карбоксигемоглобина необходимо для

установления причины смерти в соответствующих случаях, метгемоглобина - для непосредственного выявления отравления метгемоглобинообразователями и определения давности образования гематом. Считается, что содержание HbCO в крови более 10 % свидетельствует о прижизненном его образовании в результате отравления. В соответствии с методическими рекомендациями «Биохимические методы исследования в судебно-медицинской практике» (Москва 2008), при воздействии метгемоглобинообразующих веществ признаки интоксикации проявляются при концентрации MetHb более 3 %, явного отравления – более 10 %. При определении давности образования субдуральной гематомы уровень метгемоглобина в крови из венозных синусов может колебаться от 1,5 % до 47,5 %; соответственно, ошибка анализа не должна превышать 3-5 % от определяемого уровня..

До недавнего времени наиболее распространенным было определение производных гемоглобина в крови фотометрическими методами на 1-2 фиксированных длинах волн. Методы требовали точной настройки спектрофотометра, применения точно выверенных коэффициентов в расчетных формулах, строгого соблюдения pH реакционной среды, а также значительного времени анализа и тщательности его выполнения. В последние 10-20 лет все большее распространение приобретают методы многоволнового мультикомпонентного анализа (МКА), предполагающие одновременное измерение экстинкции пробы на многих длинах волн (от 5 до 128) с последующим решением переопределенной n-мерной системы уравнений. Эти методы реализованы в блоках ко-оксиметрии анализаторов неотложных состояний, гораздо реже - в виде самостоятельных приборов. Они имеют значительные преимущества перед спектрофотометрией: меньшее время анализа, меньшая трудоемкость, возможность одновременного измерения концентрации нескольких аналитов (Hb, O<sub>2</sub>Hb, COHb, MetHb и др.). Вместе с тем, оснащение реальных клинико-диагностических и судебно-медицинских лабораторий приборами, реализующими принцип МКА, может быть проблематично вследствие финансовых затруднений. Аналитические характеристики методов МКА несколько отличаются от классических фотометрических (прецизионность, чувствительность, интерферирующее влияние ряда веществ), что требует их детального сопоставления и определения наиболее важных аналитических и преаналитических факторов, влияющих на результаты исследований.

**Степень разработанности темы исследования.** В работах М.С. Кушаковского (1968), WHO Environmental Health Criteria 213 (1999), W.G. Zijlstra (2000) и V.A. Voumba (2005) присутствуют сведения об аналитических характеристиках различных методов определения уровня карбокси- и метгемоглобина в экспериментальном и клиническом материале. Однако, имеющиеся данные в основном касаются методов, реализованных в приборах «предыдущего» поколения (2-3-волновой фотометрии), и оценка исследуемых методов проводилась в основном по критериям прецизионности (CV) и корреляции результатов (r) с методом, принимаемым в

качестве опорного, в то время как для клинических специалистов более значима правильность и точность метода. Вместе с тем, измерение уровня дисгемоглобинов с точностью порядка  $\pm 1\%$  не имеет большого значения – скорее необходимо дифференцировать низкие уровни СОНб от значительно более высоких, то есть важно быстро отличить 1 % от 10 %, а не 1 % от 2 % (Wilbur S. et al., 2012).

В работах Г.В. Дервиза (1966), О. Suzuki (2005), N.B. Hampson (2008), F. Shihana (2011), A. Ghanem et al. (2012) содержится информация о влиянии условий взятия и хранения биоматериала на стабильность дисгемоглобинов, но подавляющее большинство исследований посвящено только карбоксигемоглобину. До настоящего времени имелись лишь единичные работы по оценке влияния условий хранения, используемых вакуумных систем и антикоагулянтов, действию ряда факторов (липемия, иктеричность) на определяемый уровень карбокси- и метгемоглобина в клиническом материале, а также не проводилось сравнение аналитических параметров методов. Детальное исследование отмеченных аспектов позволит решить вопросы, связанные со стандартизацией преаналитического этапа определения уровня карбокси- и метгемоглобина, а также с выбором наиболее целесообразных методик их определения (точность, продолжительность анализа, стоимость). Это важно для объективной оценки тяжести интоксикации у лиц, поступающих в медицинские организации с отравлением угарным газом и метгемоглобинообразователями, своевременного назначения адекватного лечения, а также в судебно-медицинской практике, где лаборатории редко оснащены современными газоанализаторами крови с определением дериватов гемоглобина. Указанные аспекты явились основанием для настоящего диссертационного исследования.

**Цель исследования:** определение влияния факторов преаналитического и аналитического этапов лабораторного исследования на достоверность измерения уровня дисгемоглобинов в крови.

**Задачи исследования:**

1. Определение аналитических характеристик (точность, прецизионность) одно-, двухволновых и многоволновых мультикомпонентных фотометрических методов измерения уровня карбокси- и метгемоглобина при их различной концентрации в крови.

2. Оценка интерферирующего влияния билирубина, триглицеридов и метиленового синего на уровень дисгемоглобинов в крови, определяемый различными методами.

3. Оценка влияния вида крови и типа вакуумных систем на определяемый уровень карбокси- и метгемоглобина в клиническом материале.

4. Оценка стабильности карбокси- и метгемоглобина в крови в зависимости от условий хранения биоматериала и используемого антикоагулянта.

### **Научная новизна исследования.**

Впервые проведена комплексная сравнительная оценка различных методов определения производных гемоглобина в клиническом материале современными методами мультикомпонентного анализа в сравнении с классическими спектрофотометрическими методиками. Установлено, что методы мультикомпонентного анализа дают достоверные, точные и близкие между собой результаты при измерении уровней карбокси- и метгемоглобина, превышающих физиологическую норму. Охарактеризована аналитическая интерференция билирубина и триглицеридов в отношении определяемого двухволновыми фотометрическими методами уровня карбоксигемоглобина. Показано, что методы мультикомпонентного анализа в присутствии метиленового синего могут давать заниженные результаты по СОHb и MetHb, вследствие чего в такой ситуации целесообразно использование метода Evelyn-Malloy и его модификации. Выявлено, что вид антикоагулянта (ЭДТА-К<sub>3</sub>, Li-гепарин) практически не влияет на результат измерения уровня дисгемоглобинов в крови; в то же время, отмечен эффект завышения уровня СОHb (до 4,8 %) в ряде ЭДТА- и гепарин-содержащих пробирок в зависимости от степени их заполнения. Показано, что карбоксигемоглобин, вне зависимости от вида антикоагулянта, достаточно стабилен при длительном хранении крови в различных температурных условиях. Метгемоглобин достаточно стабилен при его физиологической концентрации в крови, но при исходно повышенных уровнях наблюдается существенное снижение концентрации MetHb в ходе хранения как при комнатной температуре ( $T_{1/2} \sim 4$  ч), так и при +4 - +8 °С ( $T_{1/2} \sim 10$  ч), что не полностью согласуется с данными, приведенными в ряде справочных руководств.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

На основании полученных данных сформулированы рекомендации к ведению преаналитического этапа, выбору методов и аппаратуры для определения уровня карбокси- и метгемоглобина в крови в зависимости от конкретной клинической ситуации. Определены условия взятия, хранения и обработки биоматериала, а также его исследования, позволяющие получить наиболее корректные аналитические результаты.

Показано, что методы МКА позволяют получить достоверные и точные данные при определении уровней дисгемоглобинов, превышающих физиологическую норму.

Методики МКА пригодны для определения СОHb и MetHb в иктеричном и липемичном биоматериале, но подвержены значительному интерферирующему влиянию метиленового синего. Использование ЭДТА- или гепарин-содержащих вакуумных систем для сбора крови требует осторожной трактовки результатов определения СОHb (при небольших его уровнях) в связи с возможным завышением.

Стабильность СОHb позволяет производить отсроченное измерение его уровня. В то же время, концентрация MetHb в биоматериале при остром отравлении метгемоглобинообразователями должна определяться как можно быстрее, а при невозможности быстрого анализа образцы должны храниться при низкой температуре.

#### **Методология и методы исследования.**

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение общенаучных (теоретико-эмпирических) и специальных методов научного познания. Работа выполнена в дизайне сравнительного экспериментального и клинического исследования с использованием клинико-лабораторных и статистических методов.

**Соответствие паспорту специальности:** Тема работы, использованные методы и материалы, полученные результаты и их обсуждение, выводы и практические рекомендации соответствуют паспорту специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика (пункты 2, 7, 8).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Современные методы мультикомпонентного анализа с многоволновым измерением позволяют получить близкие между собой результаты при определении уровня карбокси- и метгемоглобина в крови, но, как и фотометрические методы, не обеспечивают достаточной воспроизводимости результатов ( $CV >20\%$ ) при низких концентрациях карбокси- и метгемоглобина ( $<1\%$ ).

2. Присутствие билирубина и триглицеридов в исследуемом образце крови приводит к завышению определяемого двухволновыми фотометрическими методами уровня карбоксигемоглобина. Вид крови (капиллярная, венозная) и применяемый антикоагулянт не оказывают существенного влияния на определяемый уровень дисгемоглобинов в крови. Применение некоторых вакуумных систем приводит к завышению определяемого уровня карбоксигемоглобина, особенно при частичном (неполном) заполнении пробирок.

3. Карбоксигемоглобин обладает высокой стабильностью при хранении в различных температурных режимах. Исходно повышенный уровень метгемоглобина в крови с течением времени значительно снижается; уровни метгемоглобина в физиологических пределах при хранении биоматериала существенно не изменяются.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности полученных результатов определяется достаточным количеством исследуемого биоматериала (222 пробы), адекватными методами исследования и корректными методами статистической обработки. Основные подборки клинического материала формировались в одинаковых условиях. Пробы пациентов исследовались на анонимной основе (преимущественно из остатков биоматериала после проведенных клинико-лабораторных

исследований); участие добровольцев в исследовании подтверждалось их письменным согласием.

Материалы диссертации были представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Национальные дни лабораторной медицины» (Москва, 2014), Всероссийской научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития лабораторной службы в России» (Москва, 2015), 80-й и 81-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2015-2016).

#### **Внедрение результатов исследования в практику.**

Основные результаты исследования опубликованы в печатных работах, доложены на научных и научно-практических конференциях, внедрены в практику работы химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ РБ ГКБ № 21 г. Уфы, используются в учебном процессе кафедры лабораторной диагностики ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

**Публикации результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 5 - в рецензируемых журналах из перечня ВАК Минобрнауки России.

**Личный вклад автора.** Диссертантом самостоятельно проведен сбор и анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, лично проведены измерения лабораторных показателей, статистическая обработка результатов исследований, написание текста диссертации, подготовка публикаций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 120 страницах компьютерного текста, содержит 33 таблицы, 35 рисунков и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации и список использованной литературы, включающий 62 отечественных и 68 зарубежных работ.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования.** Было проведено исследование 222 образцов крови (клинический материал пациентов отделений токсико-реанимации и общей хирургии ГКБ № 21 г. Уфы, кровь добровольцев, а также моделированные на их основе образцы) и 9 проб аттестованного контрольного материала на основе цельной крови Multi 4 CO-Oximeter Control фирмы Instrumentation Laboratory (три уровня).

Клинический материал, использованный в работе, был представлен 168 образцами крови, полученными от пациентов токсико-реанимационного отделения ГКБ № 21 г. Уфы, госпитализированных с диагнозом острого отравления угарным газом и находившихся в состоянии средней тяжести или тяжелом, а также 19 образцами крови от пациентов с



подозрением на отравление метгемоглобинообразователями, проходящих обследование в НИИ Медицины труда и экологии человека (г. Уфа). Кровь забиралась в максимально короткий срок после поступления пациента, а также спустя 3-6 часов пребывания в стационаре.

В ряде образцов крови моделировались целевые значения общего гемоглобина / гематокрита, СОНб, MetHb, общего билирубина и триглицеридов. Для оценки влияния антикоагулянтов и типа крови (венозная / капиллярная), а также стабильности карбокси- и метгемоглобина исследовались свежеполученные образцы венозной и капиллярной крови пациентов отделения токсико-реанимации. Измерения проводились как *ex tempore* в первичном материале без антикоагулянтов, так и в образцах, содержащих Li-гепарин и ЭДТА, которые выдерживались при комнатной температуре и в холодильнике. Для определения interfering влияния билирубина исследовались нативные и моделированные образцы крови от пациента с холестазом. Влияние триглицеридов и метиленового синего оценивалось на образцах, созданных на основе проб крови здоровых курящих добровольцев.

*Моделирование образцов крови с различным уровнем общего гемоглобина.* После центрифугирования образца крови с измеренным уровнем общего гемоглобина производилось либо удаление части плазмы, либо ее добавление в соответствующих количествах (использовалась плазма того же человека).

*Моделирование образцов крови с патологическим уровнем дисгемоглобинов.* Цельная кровь с повышенным уровнем карбоксигемоглобина создавалась путем 100 % насыщения части образца крови монооксидом углерода (СО), полученным при реакции муравьиной и серной кислот в специально созданной установке, с последующим добавлением в различных соотношениях исходной крови из того же образца. Образцы крови с повышенным уровнем метгемоглобина были получены путем лизирования взвеси осажденных эритроцитов внесением сухого дезоксихолата натрия (7 мг/мл) и последующего добавления различных количеств 10 % раствора ферроцианида калия.

*Моделирование образцов крови с патологическими уровнями билирубина и карбоксигемоглобина.* Часть образца венозной крови пациента с высоким уровнем билирубина (холестаз на фоне желчнокаменной болезни) обрабатывалась угарным газом до 100 % насыщения и далее разводилась оставшимся объемом той же крови. Плазма той же крови после центрифугирования разводилась физиологическим раствором в разных соотношениях и добавлялась к осадку клеток. Смоделированные пробы осторожно перемешивались и подвергались измерениям.

*Моделирование образцов крови с повышенным уровнем триглицеридов.* У здорового добровольца через 3 часа после приема в пищу сливочного масла и сметаны производилось взятие венозной крови. После центрифугирования готовилась смесь отделенной плазмы с

физиологическим раствором в разных соотношениях, которая затем добавлялась к осадку клеток и перемешивалась.

*Моделирование образцов крови с различным уровнем метиленового синего.* К образцам венозной крови здорового курящего добровольца добавлялись различные количества 1 % свежеприготовленного раствора метиленового синего. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 и 5 минут в пробах измерялся уровень общего Hb и его производных.

Временной промежуток от получения крови до подготовки/обработки образцов составлял от 20 минут до 4 часов. Моделирование требуемого уровня Hb/COHb/MetHb занимало до 2 часов. Для предотвращения влияния лекарственных препаратов на результаты измерений, из исследования исключались пробы пациентов или добровольцев, принимавших в течение последних 2 суток лекарственные препараты, потенциально способные влиять на уровень определяемых аналитов (за исключением образцов крови с высоким уровнем билирубина, использованных для исследования интерференции).

*Методы определения производных гемоглобина.* Для определения дисгемоглобинов использовались многоволновые методы МКА, реализованные в анализаторах ABL 825 и ПолиГем. Кроме того, производилось определение метгемоглобина одноволновым фотометрическим методом Evelyn-Malloy и его двухволновой модификацией, а также карбоксигемоглобина двухволновым фотометрическим методом М.С. Кушаковского (1968) на спектрофотометре Unicо 2605 с применением расчетных коэффициентов W.G. Zijlstra (2000).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.0. Вычислялись следующие показатели: среднее значение (M), среднеквадратичное отклонение (SD), коэффициент аналитической вариации (CV) для измерений в дубликатах, абсолютная разница (d) и относительное смещение (B). Для оценки сходимости парных результатов, полученных на разных анализаторах, использовался регрессионный и корреляционный анализ. В ряде случаев, при небольшом количестве данных / измерений в каждой из групп, специальная оценка нормальности распределения не проводилась; достоверность различий по группам количественных показателей определялась по критерию Манна-Уитни, и различия расценивались как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Оценка аналитических характеристик спектрофотометрических методов и МКА (точность, прецизионность) при определении уровня карбокси-и метгемоглобина в крови.** С целью изучения аналитических характеристик различных методов определения производных гемоглобина 47 образцов крови с различными уровнями гемоглобина и его производных были многократно измерены исследуемыми методами. Кроме того, измерению подвергался

аттестованный контрольный материал Multi 4 CO-Oximeter Control (низкий, нормальный и высокий уровни). Результаты измерений и статистический анализ приведены в таблицах 1-3.

При сравнительном анализе за опорные значения принимались данные МКА на ABL 825, так как входящие в анализаторы этого производителя (RADIOMETER) ко-оксиметрические блоки являются признанными мировой научной общественностью приборами для измерения уровня дисгемоглобинов в крови и часто применяются в научно-исследовательских работах. С другой стороны, в руководстве по эксплуатации анализаторов ABL содержатся сведения об использовании метода Evelyn-Malloy в качестве первичного референтного по отношению к методу МКА для данного типа анализаторов, и данный метод широко применяется в научных исследованиях. В связи с этим, для сравнения результатов измерения метгемоглобина использовались оба указанных метода. При сравнительной оценке методов определения дисгемоглобинов различия считались «клинически значимыми», если они могли оказать существенное влияние на оценку тяжести состояния пациента.

При оценке относительного смещения результатов измерения концентрации дисгемоглобинов их «нулевые» уровни (< 1 %) не учитывались ввиду клинической малозначимости, а также того, что небольшая абсолютная разница их результатов (доли процента) дает значительную величину относительного смещения (до десятков процентов), что может вести к неправильной интерпретации сдвигов.

Таблица 1 - Результаты измерений уровня СОHb (в %) в контрольном материале Multi 4

Уровень КМ	Аттестованные уровни СОHb, %	Метод / определенный уровень СОHb, M±SD, % (n=3)		
		МКА ABL-825	МКА ПолиГем	СФ 534/562
Уровень 1	55,9-61,9	56,7±0,3	57,3±0,3	52,0±1,7
Уровень 2	1,5-5,5	2,67±0,06	4,33±0,06	8,70±0,26
Уровень 3	20,0-25,0	20,5±0,2	21,5±0,2	24,0±0,8

Таблица 2 - Результаты измерений уровня MetHb (в %) в контрольном материале Multi 4

Уровни КМ	Аттестованные уровни MetHb, %	Метод / определенный уровень MetHb, M±SD, % (n=3)			
		МКА ABL-825	МКА ПолиГем	Evelyn-Malloy	Evelyn-Malloy модиф.
Уровень 1	-0,8 - +3,2	1,43±0,06	0,27±0,06	0,77±0,06	0,73±0,06
Уровень 2	-0,8 - +3,2	0,67±0,06	0,57±0,06	1,57±0,15	1,53±0,06
Уровень 3	-0,6 - +3,4	0,57±0,06	0,70±0,10	1,43±0,06	1,30±0,10

Точность методов определялась по соответствию результатов измерения контрольного материала допустимым пределам аттестованных значений СОHb по разным уровням. Из представленных в таблице 1 данных следует, что результаты измерения уровня СОHb в контрольном материале методами МКА укладывались в допустимые интервалы по всем уровням, за исключением данных фотометрического метода (СФ 534/562) при измерении контрольного материала уровня 1 и 2. Двухволновый фотометрический метод показал

существенное завышение уровня аналита в контрольном материале с низкой концентрацией СОНб (уровень 2) - среднее значение измерений превысило верхний аттестованный предел на 3,2 %, а при измерении контрольного материала с высокой концентрацией СОНб (уровень 1) среднее значение измерений было ниже нижней границы допустимого интервала на 4,2 %. Результаты измерения MetHb всеми исследуемыми методами укладывались в референтные пределы. В то же время, ввиду низкого уровня метгемоглобина в контрольном материале не представляется возможным судить о точности исследуемых методов по этому показателю при его концентрации более 3,4 %.

*Аналитические характеристики исследуемых методов (по результатам многократных измерений).* Как следует из полученных данных, смещение результатов метода двухволновой фотометрии (СФ 534/562) относительно МКА на ABL 825 сильно зависит от концентрации карбоксигемоглобина и достигает наибольших значений при невысоких его уровнях (<15 %). При этом абсолютное смещение составляет до 13,1 %, но расчетное относительное смещение оказывается чрезмерным (вплоть до 76,8 %).

Таким образом, метод двухволновой фотометрии для определения СОНб при его уровнях менее 15 % использовать нежелательно. При более высокой концентрации СОНб (15-45 %) как абсолютное, так и относительное смещение результатов оказывается намного меньшим, а при уровне СОНб выше 45 % оно меняет знак (завышение сменяется занижением). Результаты МКА на анализаторе ПолиГем отличаются от опорных в значительно меньшей степени, показывая относительное завышение от 1,1 % (верхний диапазон концентраций СОНб) до 9,1 % (нижний диапазон).

Смещение результатов модифицированного метода Evelyn-Malloy (метод М.С. Кушакоского) относительно остальных методов сильно зависит от концентрации метгемоглобина; наибольший сдвиг отмечается при его высоких уровнях (MetHb > 45 %). При этом абсолютное смещение в индивидуальных пробах составляет до 8,5 %, а расчетное относительное смещение оказывается несколько большим (вплоть до 19,5 %). В связи с этим, при высоких уровнях метгемоглобина (> 45 %) следует воздерживаться от использования метода Evelyn-Malloy в модификации М.С. Кушаковского, либо применять его с учетом обнаруженной особенности.

Результаты МКА на анализаторе ПолиГем также отличаются от опорных (МКА ABL 825 и метод Evelyn-Malloy), но в значительно меньшей степени, показывая относительное смещение до 4,9 %. Наименьшее смещение отмечено между опорными методами - МКА на ABL 825 и Evelyn-Malloy.

Клинически существенных различий, влияющих на оценку состояния пациента, между уровнями СОНб в материале с различными концентрациями общего Hb, СОНб, MetHb и в

различных их сочетаниях, измеренными методами МКА, не выявлено – абсолютная разница данных не превышала 3,3 % (рисунки 1 и 2).

Таблица 3 - Средние значения относительного смещения (В, %) результатов измерения различными методами концентрации СОНб и МетНб (в %) в образцах с уровнями С1, С2, С3, М1, М2, М3 (5-15 %; 15-45 %; более 45 %) по отношению к значениям, полученным методами МКА на приборах, указанных в верхней строке

Аналит	Метод / прибор	Уровень аналита	МКА ABL825	МКА ПолиГем	Evelyn-Malloy
СОНб	МКА ПолиГем	5-15 %	9,1	-	-
		15-45 %	6,3	-	-
		>45 %	1,1	-	-
	СФ 534/562	5-15 %	76,8	61,1	-
		15-45 %	11,9	5,4	-
		>45 %	-4,4	-5,3	-
МетНб	МКА ПолиГем	5-15 %	-3,6	-	-
		15-45 %	0,7	-	-
		>45 %	4,6	-	-
	Evelyn-Malloy	5-15 %	0,7	4,9	-
		15-45 %	1,4	0,8	-
		>45 %	-0,2	-4,5	-
	Evelyn-Malloy модифицир.	5-15 %	-7,4	-3,6	-8,1
		15-45 %	-6,8	-7,3	-8,0
		>45 %	-10,4	-14,3	-10,2

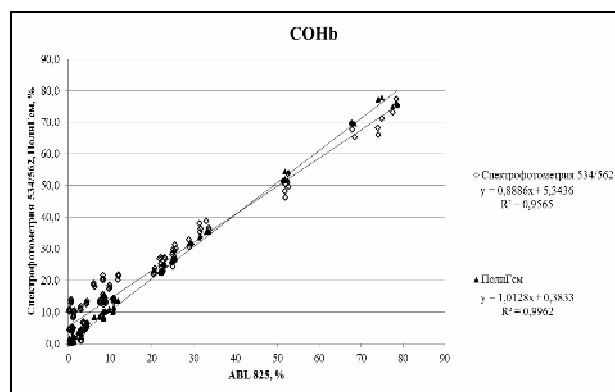


Рисунок 1 - Результаты измерений уровня карбоксигемоглобина методом МКА (ПолиГем) и спектрофотометрическим методом в сравнении с уровнем, полученным опорным методом МКА (ABL-825).

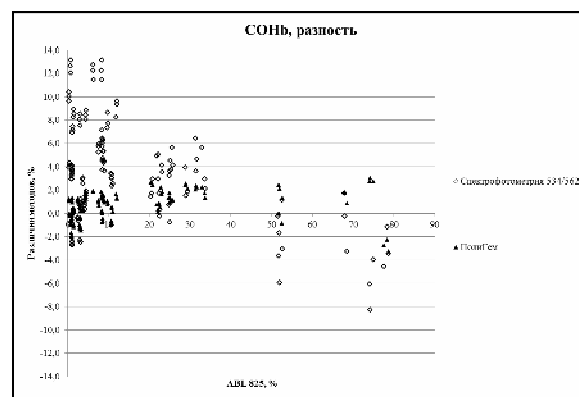


Рисунок 2 - Разность (в %) результатов измерений уровня карбоксигемоглобина методом МКА (ПолиГем) и фотометрическим методом (СФ 534/562) с результатами, полученными опорным методом МКА (ABL 825).

В то же время, двухволновый фотометрический метод показал определенное завышение результатов по сравнению с методами МКА: при исследовании материала с концентрацией СОНб <20 %, а в области высоких значений аналита (СОНб >50 %) отмечено противоположное явление. Это может быть обусловлено как неабсолютным соответствием расчетных формул, связывающих коэффициенты молярной экстинкции присутствующих в гемолизате соединений

(дезоксигемоглобин и карбоксигемоглобин) при различных длинах волн, так и относительной погрешностью калибровки используемого аналитического оборудования (спектрофотометра), а также значительной долей мануальных процедур в ходе проведения анализа.

Значимых различий между результатами измерения метгемоглобина различными методами в образцах с уровнями MetHb < 15 % не выявлено - абсолютная разница результатов не превышала 2,0 % (рисунки 3, 4).

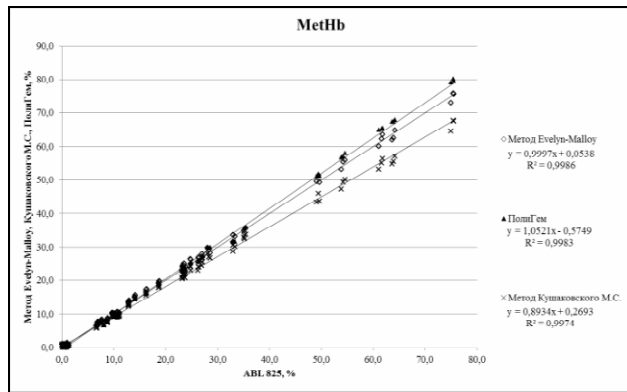


Рисунок 3 - Результаты измерения уровня метгемоглобина методом МКА (ПолиГем), методом Evelyn-Malloy и его модификацией по М.С. Кушаковскому в сравнении с уровнем, определенным опорным методом МКА (ABL-825).

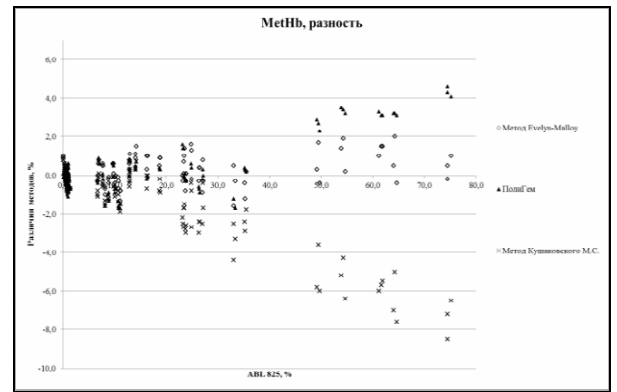


Рисунок 4 - Разность результатов измерений уровня метгемоглобина методом МКА (ПолиГем), методом Evelyn-Malloy и его модификацией по М.С. Кушаковскому в сравнении с опорным методом МКА (ABL-825).

При этом, в области высоких концентраций аналита (> 20 %) результаты измерения методом Evelyn-Malloy были более приближены к показаниям МКА на ABL 825, тогда как результаты измерения методом Evelyn-Malloy в модификации М.С. Кушаковского были до 8,5 % ниже данных МКА, а данные ПолиГем были несколько выше при измерении образцов с уровнем аналита более 50 %. Более низкие результаты измерения в модифицированном методе могут быть объяснены особенностью методики - тремя измерениями вместо четырех в классическом методе Evelyn-Malloy, что, наряду с сокращением трудоемкости, привело к необходимости введения специальных коэффициентов в расчетной формуле и к соответствующим ошибкам, аналогичным тем, которые имеют место при двухволновом фотометрическом определении карбоксигемоглобина. Завышение определяемого уровня метгемоглобина в образцах с высокой концентрацией аналита, выявленное методом МКА на ПолиГем, существенной клинической значимости не имеет, так как подобные ситуации встречаются нечасто.

Вариация результатов определения СОHb (таблица 4) была ожидаемо ниже на анализаторах, реализующих принцип МКА, и не требующих длительной и сложной

пробоподготовки, сопряженной с непрогнозируемой потерей части гемоглобина и его производных при центрифугировании.

Таблица 4 - Средние, минимальные и максимальные значения коэффициента аналитической вариации (CV %) результатов измерения карбокси- и метгемоглобина в образцах крови с уровнями С1, С2, С3, М1, М2 и М3 различными методами и на различных приборах

Уровень СОHb и MetHb	МКА на ABL 825	МКА на ПолиГем	СФ 534/562	Evelyn-Malloy	Evelyn-Malloy модифицир.
С 5-15 %	0,96 (0,67-1,84)	1,54 (0,67-2,17)	3,23 (1,48-4,43)	-	-
С 15-45 %	0,81 (0,48-1,24)	0,53 (0,00- 0,83)	3,88 (2,84-4,83)	-	-
С > 45 %	0,76 (0,56-0,97)	0,45 (0,18-0,86)	3,38 (2,8-3,78)	-	-
М 5-15 %	0,55 (0,00-0,85)	1,36 (0,00-2,56)	-	2,62 (0,70-3,17)	2,60 (0,76-2,99)
М 15-45 %	0,47 (0,23-1,06)	0,43 (0,16-1,13)	-	2,88 (1,64-3,61)	3,05 (1,26-5,06)
М > 45 %	0,51 (0,51-0,74)	0,63 (0,19-0,44)	-	2,40 (1,02-2,09)	2,68 (1,09-3,08)

Учитывая, что в целом CV не превышал 4,83% при клинически значимых «ненулевых» значениях дисгемоглобинов (> 1 %), вариацию результатов всех исследуемых методов можно считать вполне приемлемой для их применения в клинической практике.

**Исследование интерферирующего влияния билирубина, триглицеридов и метиленового синего на определение производных гемоглобина в крови методами двухволновой фотометрии и мультикомпонентного многоволнового анализа.** Большинство оптических методов, используемых в лабораторной медицине, подвержено интерферирующему влиянию различных веществ, присутствие которых может существенно исказить определяемый уровень аналита. В наших исследованиях оценивалось интерферирующее влияние билирубина и триглицеридов, а также метиленового синего (используется в терапии острых отравлений метгемоглобинообразователями) на результаты измерения уровня дисгемоглобинов спектрофотометрическими методами и МКА. Измеренная методами МКА концентрация СОHb в пробах с разным уровнем билирубина практически не различалась (таблица 5). Тенденций к изменению показателей MetHb по мере нарастания концентрации билирубина отмечено также не было; абсолютная разница результатов, полученных различными методиками, не превышала 1 %. В то же время, при применении двухволнового фотометрического метода был заметным эффект завышения определяемого уровня карбоксигемоглобина (вплоть до +3,6 %), что, вероятно, обусловлено пересечением спектров поглощения билирубина и СОHb / Hb в измеряемой области.

Измеренная методами МКА концентрация СОHb в пробах с разным уровнем триглицеридов (таблица 6) различалась мало и составляла 6,50 - 7,23 %. Тенденций к изменению показателей СОHb и MetHb при использовании методов МКА по мере нарастания

концентрации билирубина отмечено также не было: абсолютная разница между результатами, полученными с помощью различных методик, не превышала 0,37 %.

Таблица 5 - Измеренная разными методами концентрация СОНб и MetHb (в %;  $M \pm SD$ ;  $n=3$ ) в образцах крови с повышенным уровнем СОНб и разными уровнями билирубина.

Билирубин, мкмоль/л	Карбоксигемоглобин			Метгемоглобин			
	МКА		СФ 534/562	МКА		Evelyn- Malloy	Evelyn- Malloy модиф.
	ABL825	ПолиГем		ABL-825	ПолиГем		
38	12,5±0,1	12,8±0,1 **	13,9±0,3 **	0,67±0,06	0,33±0,06 **	0,92±0,01 **	0,79±0,03 **
91	12,6±0,1	12,4±0,1 *	14,1±0,3 **	0,63±0,06	0,37±0,06 **	0,96±0,08 **	0,85±0,08 **
130	12,3±0,2	12,0±0,1 *	14,2±0,4 **	0,67±0,06	0,37±0,06 **	0,98±0,01 * **	0,88±0,02 * **
230	12,7±0,1	12,2±0,2 * **	14,8±0,3 * **	0,67±0,06	0,40±0,00 **	0,98±0,04 * **	0,88±0,04 * **
496	12,7±0,1	12,5±0,1 *	16,3±0,5 * **	0,70±0,00	0,37±0,06 **	1,00±0,05 * **	0,86±0,04 * **

Примечания: \* -  $p < 0,05$  по отношению к значению при минимальном уровне билирубина (38 мкмоль/л); \*\* -  $p < 0,05$  по отношению к значению, полученному методом МКА на ABL 825.

Таблица 6 - Результаты сравнительных измерений уровня СОНб и MetHb (в %,  $M \pm SD$ ;  $n=3$ ) разными методами в образцах крови с повышенным уровнем СОНб и различным уровнем триглицеридов

Триглицериды, ммоль/л	Карбоксигемоглобин			Метгемоглобин			
	МКА		СФ 534/562	МКА		Evelyn- Malloy	Evelyn- Malloy модиф.
	ABL-825	ПолиГем		ABL-825	ПолиГем		
0,7	6,50±0,10	7,37±0,06 **	6,85±0,25	0,43±0,06	0,50±0,00 **	0,75±0,04 **	0,66±0,03 **
3,0	6,60±0,10	7,60±0,20 **	8,61±0,25* **	0,47±0,06	0,47±0,06	0,72±0,01 **	0,64±0,05 **
5,3	6,60±0,10	7,23±0,06 **	11,3±0,3 * **	0,50±0,00	0,47±0,06	0,80±0,08 **	0,69±0,03 **

Примечания: \* -  $p < 0,05$  по отношению к значению при минимальном уровне триглицеридов (0,7 ммоль/л); \*\* -  $p < 0,05$  по отношению к значению, полученному методом МКА на ABL 825

В то же время, наблюдалось значительное завышение данных по карбоксигемоглобину по мере нарастания уровня триглицеридов при использовании двухволнового фотометрического метода (СФ 534/562), что, как и в случае с билирубином, объясняется пересечением спектральных областей поглощения эмульсии триглицеридов и СОНб / Нб. Влияние триглицеридов на определяемый уровень метгемоглобина было незначительным ( $d < 0,08$  %), хотя значения MetHb в одной и той же пробе с «физиологическим» уровнем несколько различались в зависимости от метода определения.



Выявлено значимое интерферирующее влияние метиленового синего на показатели общего гемоглобина и дисгемоглобинов в пробах крови: при 1-минутной инкубации концентрация общего Hb, измеренная методами МКА, занижалась на 12,4 %, уровня СОНb - на 2,5 %, уровня MetHb – на 4,6 %. При 5-минутной инкубации эффекты были сходными. В то же время, констатировано завышение измеренного абсолютного уровня метгемоглобина в исследуемом материале (до 2,7 %) при определении классическим фотометрическим способом Evelyn-Malloy и его модификацией, что, вероятно, обусловлено особенностью действия метиленового синего, отмеченной в исследованиях М.С. Кушаковского и заключающейся в активации ряда конкурирующих процессов восстановления и окисления метгемоглобина.

**Исследование влияния антикоагулянтов и вида крови на определяемый уровень карбокси- и метгемоглобина. Оценка стабильности дисгемоглобинов в зависимости от условий хранения и используемого антикоагулянта.** В ГОСТ Р 53079.4-2008 по правилам ведения преаналитического этапа лабораторных исследований данные по влиянию антикоагулянтов, типа биоматериала, а также по стабильности показателей карбокси- и метгемоглобина в крови отсутствуют. В связи с этим, было признано необходимым провести сравнительные измерения уровня дисгемоглобинов в образцах крови с различными уровнями аналитов в капиллярной и венозной крови с использованием различных антикоагулянтов (ЭДТА-К3, ЭДТА-К2, литий-гепарин) в вакуумных пробирках от производителей, чья продукция получила достаточно широкое распространение в отечественных лабораториях, а также оценить влияние условий хранения биоматериала на стабильность уровня карбокси- и метгемоглобина.

*Влияние антикоагулянтов и вида крови (венозная / капиллярная) на определяемый уровень дисгемоглобинов.* Исследовались свежеполученные образцы венозной и капиллярной крови пациентов токсико-реанимационного отделения ГКБ № 21 г. Уфы. Измерения на приборе ПолиГем проводились как ex tempore в первичном материале без антикоагулянта, так и в гепаринизированных и ЭДТА-содержащих образцах. Для предотвращения влияния вакуума на уровень СОНb вследствие «эвакуации» СО из пробы, венозная кровь забиралась одноразовым шприцем с последующим быстрым переносом (после снятия иглы) в пробирку с открытой крышкой и тщательным перемешиванием. Капиллярная кровь бралась в пластиковые микропробирки с соответствующими добавками. Полученные данные свидетельствуют о том, что тип антикоагулянта или его отсутствие, а также вид крови практически не влияют на результаты измерений СОНb и MetHb при их уровнях, соответствующих нормальным (у здоровых людей).

*Стабильность дисгемоглобинов в моделированных по уровню СОHb образцах венозной крови.* Пробы крови с антикоагулянтами насыщались угарным газом в различной степени, после чего подвергались анализу через 20 мин, 1, 3, 12, 24, 48 и 72 часа при хранении как при комнатной температуре, так и при +2-8 °С. Согласно полученным данным, максимальная разница между измеренными уровнями карбоксигемоглобина в образцах крови с различным временем хранения составила 0,6 %, а для метгемоглобина - 0,13 %, что клинически незначимо. Таким образом, карбоксигемоглобин, даже при его высоком уровне в образце, является достаточно стабильным при хранении биоматериала как при комнатной температуре, так и в холодильнике; в обоих случаях литий-гепарин был предпочтительным антикоагулянтом. Наилучшую стабильность уровня метгемоглобина в условиях хранения при 2-8 °С показали образцы с литий-гепарином, при комнатной температуре – образцы с ЭДТА.

*Стабильность дисгемоглобинов и влияние антикоагулянтов на результаты исследований.* Образцы крови пациентов токсико-реанимационного отделения ГКБ № 21 г. Уфы анализировались через 30 мин, 1, 4, 12, 24, 48 и 72 часа хранения при +2-8 °С. Результаты измерений свидетельствуют об отсутствии «клинически значимых» различий между измеренной концентрацией дисгемоглобинов в пробах с «физиологическим» уровнем MetHb, хранившихся различное время при +2-8 °С. Вместе с тем, в материале, стабилизированном ЭДТА-К3, определялся более высокий уровень карбоксигемоглобина по сравнению с гепаринизированной кровью, причем в образцах с меньшим заполнением вакуумных пробирок (25-40 % от требуемого объема вследствие нехватки биоматериала), измеренная концентрация СОHb была еще выше. Можно предположить, что на результаты измерений уровня СОHb влияет степень заполнения вакуумной пробирки. Для более детального изучения этого эффекта были проведены специальные исследования, результаты которых приведены ниже.

*Стабильность дисгемоглобинов в моделированных образцах венозной крови с повышенным уровнем MetHb.* Кровь у здорового курящего добровольца забиралась в вакуумные пробирки с ЭДТА-К3 и с литий-гепарином. В каждом образце измерялся базовый уровень дисгемоглобинов, затем во все пробы вносилось 10 мкл 4 % нитрита натрия с последующим тщательным перемешиванием. Спустя 60 мин повторно измерялся уровень дисгемоглобинов, после чего часть пробирок помещалась в холодильник при температуре 2-8 °С, а другая часть хранилась при комнатной температуре (18-25 °С). Дальнейшие измерения производились через 3, 5, 7, 9, 11, 13, 19, 21, 24 час после взятия крови. Как показали результаты, уровень карбоксигемоглобина в пробах с ЭДТА несколько превышал показатели в литий-гепариновых системах (что соответствует ранее полученным данным), но оставался весьма стабильным на протяжении всего срока хранения, независимо от температурных условий и типа антикоагулянта.

В то же время, стабильность метгемоглобина была низкой. Его уровень в исходных образцах крови был «физиологическим» (практически нулевым), после внесения нитрита натрия и 60-минутной инкубации достигал 18,7 - 19,0 %, и в ходе хранения прогрессивно снижался в результате работы метгемоглобинредуктазных систем крови. Скорость изменения концентрации MetHb при 2-8 °С была значительно более низкой (рисунок 5): оценочное время полураспада метгемоглобина в крови ( $T_{1/2}$ ) при 18-25 °С составило около 4 час, при 2-8 °С – около 10 час.

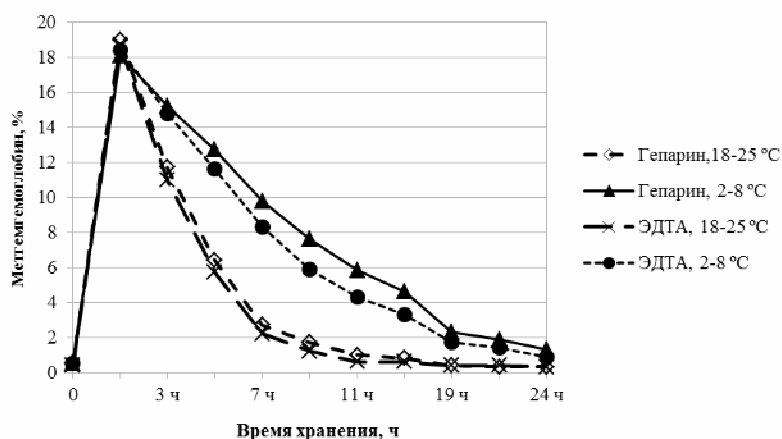


Рисунок 5 - Динамика измеренного уровня метгемоглобина (в %) в ходе хранения образцов крови, стабилизированных ЭДТА-КЗ и литий-гепарином, при различной температуре.

Тип антикоагулянта (литий-гепарин, ЭДТА) не влиял на стабильность карбоксигемоглобина, но скорость самопроизвольного восстановления метгемоглобина в образцах крови с Li-гепарином была несколько ниже, чем в материале с ЭДТА-КЗ.

**Исследование влияния типа и степени заполнения вакуумных систем на определяемый уровень карбокси- и метгемоглобина в крови.** Отмеченное ранее завышение определяемого уровня карбоксигемоглобина в крови, взятой в ЭДТА-содержащие вакуумные пробирки, согласно литературным данным, могло быть связано с выделением некоторого количества СО из материала крышек пробирок, и отмечалось лишь в вакуумных системах с ЭДТА. С связи с тем, что технологические процессы при производстве вакуумных пробирок у разных производителей несколько различаются, представлялось важным оценить влияние объема пробирки и степени ее заполнения на определяемый уровень карбокси- и метгемоглобина в различных вакуумных системах.

*Влияние степени заполнения кровью ЭДТА-содержащих пробирок на определяемый уровень СОHb.* Взятая у пациентов токсико-реанимационного отделения ГКБ № 21 г. Уфы кровь переносилась в одинаковые вакуумные пробирки, но с разной степенью заполнения (на стенки предварительно наносились специальные метки). Пробы выдерживались при комнатной температуре в течение 30 мин, затем уровень дисгемоглобинов в них измерялся методом МКА на анализаторе ПолиГем. Обнаружена четкая зависимость между степенью заполнения

пробирок с ЭДТА-К3 и измеренным уровнем карбоксигемоглобина ( $r = -0,71 - -0,93$ ), выраженная в различной степени в продукции разных производителей. Основными причинами этого эффекта, на наш взгляд, могут быть interfering влияние самого антикоагулянта либо присутствие монооксида углерода, который может выделяться материалом крышки пробирки, пластиком, сурфактантом и др.

Для выявления преобладающей причины завышения уровня СОНб было проведено его измерение в крови, взятой у курящего добровольца и перенесенной в разных объемах в 4 пробирки Univas с ЭДТА-К3. При этом за 1 ч до исследования с первых трех пробирок были сняты крышки для девакуумизации и удаления потенциально присутствующего СО. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии interfering влияния антикоагулянта ЭДТА-К3 на определяемый уровень СОНб в крови. В дополнительной серии исследований абсолютные различия определяемых уровней карбоксигемоглобина в одном и том же образце крови, взятом в вакуумные пробирки с ЭДТА-К3, рассчитанные на разный объем крови (2 и 4 мл), достигали 1,4 %. Поскольку пробирки различались лишь степенью вакуума и количеством антикоагулянта, можно заключить, что в пустых вакуумных пробирках при хранении накапливается некоторое количество угарного газа, который впоследствии растворяется во взятой крови и увеличивает показатели карбоксигемоглобина.

*Влияние степени заполнения кровью литий-гепариновых пробирок на определяемый уровень СОНб.* Для содержащих литий-гепарин пробирок Univas с различной степенью заполнения кровью отмечен эффект завышения уровня карбоксигемоглобина, аналогичный описанному выше, но менее выраженный. Поскольку пробирки различались только по типу антикоагулянта, следовательно, ЭДТА в большей степени способствует завышению уровня СОНб, хотя не совсем ясен механизм этого явления. В литий-гепариновых пробирках Honyu Medical такого эффекта не наблюдалось. Можно предположить, что выделение СО зависит не столько от антикоагулянта, сколько от материала пробирки, крышки и используемого сурфактанта. Эффект может проявляться по-разному в разных партиях пробирок, в связи с чем рекомендуется предварительная оценка степени завышения СОНб для каждой конкретной партии пробирок с ЭДТА-К3 и литий-гепарином, особенно при выполнении научных исследований, требующих точных результатов. В то же время, измеренный уровень метгемоглобина (при «физиологических» значениях) не зависел от объема пробирок и степени их заполнения кровью ( $d = 0,1-0,2 \%$ ).

Сравнение основных характеристик различных приборов (стоимость прибора и необходимых реагентов, условия и продолжительность анализа) с учетом реализованных в них методов определения дисгемоглобинов позволяет заключить, что применение анализаторов газового состава крови является наименее выгодным экономически (значительно более высокая

цена прибора и реагентов), а их применение обосновано лишь в условиях токсико-реанимационных отделений. Применение портативных анализаторов фракций гемоглобина (ПолиГем, Avox 4000 / Gem Opt) требует меньших затрат на анализ (стоимость исследования сопоставима с одно- и двухволновыми спектрофотометрическими методами – менее 1 рубля), но, в то же время, подобные приборы обладают существенным недостатком – малым перечнем определяемых аналитов по сравнению со спектрофотометрами (на них возможна реализация большинства оптических методов) и анализаторами газов крови (определяются кислотно-основные параметры).

## ВЫВОДЫ

1. Современные методы мультикомпонентного анализа с многоволновым измерением позволяют получить близкие между собой результаты при измерении в клиническом материале уровня карбокси- и метгемоглобина ( $d < 2,5 - 3,3$  %, в зависимости от уровня аналитов), несмотря на различие алгоритмов расчета в разных приборах.

2. Прецизионность как мультикомпонентных многоволновых, так и одно- и двухволновых фотометрических методов при определении карбокси- и метгемоглобина в низких концентрациях ( $< 1$  %) неудовлетворительна - CV достигает 34 %; в подобных случаях данные могут использоваться лишь с оценочной целью.

3. Как мультикомпонентные многоволновые, так и одно- и двухволновые фотометрические методы определения метгемоглобина в крови практически не подвержены интерферирующему влиянию билирубина (до 496 мкмоль/л) и триглицеридов (до 5,3 ммоль/л). При использовании двухволновых фотометрических методов отмечается значимое завышение показателей карбоксигемоглобина (относительное смещение до 17,3 % и 65 %, соответственно) при высоких концентрациях билирубина и триглицеридов.

4. Присутствие метиленового синего ведет к занижению определяемых методами мультикомпонентного анализа уровней метгемоглобина и карбоксигемоглобина (относительное смещение до 51 % от исходного уровня), а также общего гемоглобина (до 8,7 %). Предпочтительным методом измерения концентрации метгемоглобина в присутствии метиленового синего является фотометрический метод Evelyn-Malloy или его модификация по М.С. Кушаковскому.

5. Вид крови (капиллярная, венозная), взятой у пациента, не оказывают клинически значимого влияния на определяемый уровень дисгемоглобинов в крови ( $d < 0,03$  % в физиологическом диапазоне концентраций). Тип вакуумной системы (литий-гепарин, ЭДТА) также не влияет существенно на результаты измерений (для карбоксигемоглобина  $r > 0,99$ ; для метгемоглобина  $r = 0,88-0,97$ ). В то же время, ряд вакуумных систем может содержать монооксид углерода, что сопровождается абсолютным завышением определяемого уровня

карбоксигемоглобина (до 4,7 %) и может вести к неверной оценке степени воздействия оксида углерода на пациента. Эффект является более выраженным при частичном (неполном) заполнении пробирки.

6. Карбоксигемоглобин обладает высокой стабильностью (не менее 3 суток) при хранении клинического биоматериала в различных температурных режимах. Физиологический уровень метгемоглобина в биоматериале стабилен, в то время как при метгемоглобинемии его концентрация с течением времени значительно снижается ( $T_{1/2} \sim 4-10$  ч). Получению более корректных результатов анализа метгемоглобина способствует минимальная его продолжительность от момента получения биоматериала и охлаждение крови до исследования. Тип антикоагулянта (литий-гепарин, ЭДТА) не оказывает существенного влияния на стабильность дисгемоглобинов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать следующие практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, судебно-медицинских экспертов и врачей-токсикологов:

1. При измерении уровня карбоксигемоглобина в крови предпочтительно применение методов многоволнового мультикомпонентного анализа, мало подверженных влиянию липемии и иктеричности пробы. Использование двухволновой фотометрии требует тщательной отработки методики со сверкой соответствия пиков поглощения и коэффициентов молярной экстинкции определяемых компонентов, а также обязательной калибровки оборудования и учета значимого интерферирующего влияния триглицеридов и билирубина на результаты анализа.

2. При отравлении метгемоглобинообразователями исследование уровня метгемоглобина после взятия крови должно осуществляться как можно скорее, а при невозможности быстрого выполнения анализа биоматериал должен храниться / транспортироваться при охлаждении до 2-8 °С.

3. При проведении комплексной терапии отравления метгемоглобинообразователями, включающей введение метиленового синего, необходимо во избежание ошибок учитывать значимое интерферирующее влияние этого агента на результаты измерения уровня MetHb методами многоволнового мультикомпонентного анализа. Для получения более надежных данных в подобных случаях следует использовать одно- и двухволновые фотометрические методы (Evelyn-Malloo или его модификация по М.С. Кушаковскому).

4. Перед исследованием уровня карбоксигемоглобина требуется оценка наличия монооксида углерода в используемых вакуумных системах, особенно ЭДТА-содержащих. Для

минимизации образования дополнительного карбоксигемоглобина *in vitro* следует избегать неполного заполнения вакуумных пробирок.

5. С экономических позиций наиболее предпочтительным является применение метода МКА, реализованного в портативных анализаторах (в частности, приборах отечественного производства серии ПолиГЕМ).

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

В качестве перспектив разработки темы можно рассматривать проведение сравнительных измерений уровня карбоксигемоглобина в клиническом материале с применением газовой хроматографии в качестве референсного метода, исследование влияния особенностей пробоподготовки (гемолизат/цельная кровь) и условий хранения (температурные режимы ниже 0 °С) на стабильность аналитов, а также разработку и оценку аналитических характеристик новых экспресс-методов (в том числе мало- и неинвазивных) и приборов для определения уровня дисгемоглобинов в крови в режиме диагностики по месту оказания помощи (point-of-care).

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи, опубликованные в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых российских научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук**

1. Саяхова, Р.М. Информативность базовых лабораторных тестов при остром отравлении угарным газом / Р.М. Саяхова, Р.Р. Газизуллин, К.В. Фаткуллин, Г.Х. Утарбаева, Гильманов А.Ж. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. - №9. - С. 91-92.

2. Фаткуллин, К.В. О стабильности показателей карбокси- и метгемоглобина в пробах крови / К.В. Фаткуллин, Г.Х. Утарбаева, Р.М. Саяхова, А.Ж. Гильманов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. - №9. - С. 104-105.

3. Фаткуллин, К.В. Клиническое значение и современные методологические аспекты определения карбокси- и метгемоглобина в крови / К.В. Фаткуллин, А.Ж. Гильманов, Д.В. Костюков // Практическая медицина. – 2014. - №3. - С. 18-23.

4. Фаткуллин, К.В. О динамике уровня карбоксигемоглобина в крови пациентов в ходе госпитализации / К.В. Фаткуллин, А.Е. Ряховский, Г.Х. Утарбаева, Д.В. Костюков, А.Ж. Гильманов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. - №9. - С. 132-133.

5. Фаткуллин, К.В. Современные возможности определения уровня карбокси- и метгемоглобина в крови / К.В. Фаткуллин, А.Е. Ряховский, Р.М. Саяхова, Ю.А. Ахмадуллина, А.Ж. Гильманов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. - №9. - С. 104.

### Статьи, тезисы докладов в материалах конференций

6. Фаткуллин, К.В. Определение общего гемоглобина в присутствии карбоксигемоглобина / К.В. Фаткуллин, А.Е. Ряховский, А.Д. Фурсова, М.Ф. Урманцев, Ю.А. Ахмадуллина // Сборник статей по материалам 80-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины». Уфа, 2015. - С. 682-685.

7. Фаткуллин, К.В. Сравнение методов Evelyn-Malloy и М.С. Кушаковского в определении уровня метгемоглобина в крови / К.В. Фаткуллин, А.Е. Ряховский, Д.А. Еникеев, Д.Э. Байков, Р.М. Саляхова // Сборник статей по материалам XXIII Международной научно-практической конференции «Наука вчера, сегодня, завтра». Новосибирск, 2015. - С. 43-46.

8. Кадаев, И.Ф. Экспериментальное моделирование метгемоглобинемии / И.Ф. Кадаев, Л.З. Турумтаева, К.В. Фаткуллин, А.Е. Ряховский // Сборник статей по материалам 81-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины». Уфа, 2016. - С. 192-195.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СОHb - карбоксигемоглобин

Hb – гемоглобин

Li-гепарин – литиевая соль гепарина

MetHb – метгемоглобин

CV – коэффициент аналитической вариации

СО – монооксид углерода

$T_{1/2}$  – период полужизни (полураспада)

МКА – мультикомпонентный анализ

СФ - спектрофотометрия

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

<p>Подписано в печать __.__.2018. Тираж 100 экз. Формат 60x90/16 Усл. печ. л. 1,0</p>	<p>Отпечатано в ООО «Феникс» 450054. Уфа Пр. Октября 71/16</p>
---	--