

УДК 616.126-002-07-08-089

DOI: 10.35693/2500-1388-2019-4-3-4-7

# Референсные интервалы содержания свободного гемоглобина при исследовании гемоглобинцианидным методом на биохимическом автоматическом анализаторе ILAB 300 PLUS

О.И. Мурыгина<sup>1</sup>, Е.Р. Жукова<sup>1</sup>, О.В. Петрова<sup>1, 2</sup>, Д.М. Никулина<sup>2</sup>

## Аннотация

**Цель** – установить референсные интервалы содержания свободного гемоглобина при исследовании его гемоглобинцианидным методом на биохимическом автоматическом анализаторе.

**Материал и методы.** Референсная группа была сформирована следующим образом: 120 здоровых мужчин и 120 здоровых женщин, проживающих в Астраханской области, в возрасте от 20 до 60 лет.

Контроль качества определения свободного гемоглобина обеспечивали стандартизацией преаналитического долабораторного, преаналитического лабораторного, аналитического и постаналитических этапов.

Забор крови осуществляли пункцией кубитальной вены после наложения жгута (не более 1 минуты) в положении пациента лежа в двухкомпонентные системы для забора крови – одноразовые полипропиленовые пробирки с активатором свертывания крови (Sarstedt, Германия). Для получения сыворотки крови пробирки с кровью центрифугировали при 2500 оборотах в минуту в течение 10 минут.

Свободный гемоглобин в сыворотке крови определяли гемоглобинцианидным методом на автоматическом биохимическом анализаторе ILAB 300 PLUS (Laboratory Instrumentation, USA).

Все статистические процедуры выполняли с помощью программного пакета Statistica 6.0 for Windows (StatSoft Inc., USA).

**Результаты.** В работе использовали классический подход с применением строгих критериев включения и исключения, рекомендованных CLSI C 28-A3. Гендерных и возрастных различий в содержании свободного гемоглобина в сыворотке крови у мужчин и женщин Астраханской области не обнаружено. Референсный интервал свободного гемоглобина составил у мужчин и женщин Астраханской области 0,02–0,84 г/л.

**Ключевые слова:** свободный гемоглобин, операции на сердце, искусственное кровообращение, внутрисосудистый гемолиз, референсный интервал.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

## Для цитирования:

Мурыгина О.И., Жукова Е.Р., Петрова О.В., Никулина Д.М. Референсные интервалы содержания свободного гемоглобина при исследовании гемоглобинцианидным методом на биохимическом автоматическом анализаторе ILAB 300 PLUS. *Наука и инновации в медицине*. 2019;4(3):4-7.  
doi: 10.35693/2500-1388-2019-4-3-4-7

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава России (Астрахань, Россия)

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России (Астрахань, Россия)

## Сведения об авторах

**Мурыгина О.И.** – врач клинической лабораторной диагностики.

ORCID: 0000-0002-0359-8664

**Жукова Е.Р.** – врач клинической лабораторной диагностики.

ORCID: 0000-0002-5314-4601

**Петрова О.В.** – к.м.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией.

ORCID: 0000-0003-3544-2266

**Никулина Д.М.** – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой биологической химии.

## Автор для переписки

**Петрова Ольга Владимировна**

Адрес: Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии, ул. Покровская роща, 4, г. Астрахань, Россия, 414011.

E-mail: students\_asma@mail.ru

Тел.: +7 (917)183 82 01.

ИК – искусственное кровообращение; РИ – референсный интервал; АД – артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЧДД – частота дыхательных движений.

**Рукопись получена:** 20.08.2019

**Рецензия получена:** 04.09.2019

**Решение о публикации принято:** 26.09.2019

# Free hemoglobin reference intervals detected with hemoglobin-cyanide method on a biochemical automatic analyzer ILAB 300 PLUS

Olga I. Murygina<sup>1</sup>, Elena R. Zhukova<sup>1</sup>, Olga V. Petrova<sup>1, 2</sup>, Dina M. Nikulina<sup>2</sup>

## Abstract

**Objectives** – to evaluate the reference intervals for free hemoglobin concentration with the help of hemoglobin-cyanide method and a biochemical automatic analyzer.

**Material and methods.** The reference group consisted of 120 healthy men and 120 healthy women from the Astrakhan region aged from 20 to 60 years.

The fulfilment of standard procedures during the pre-analytical pre-laboratory, pre-analytical laboratory, analytical and post-analytical stages of the study ensured the quality control for free hemoglobin evaluation. Blood samples were taken with cubital vein puncture after applying a tourniquet (for not more than 1 minute), patient in lying position, using

## Citation

Murygina OI, Zhukova ER, Petrova OV, Nikulina DM. Free hemoglobin reference intervals detected with hemoglobin-cyanide method on a biochemical automatic analyzer ILAB 300 PLUS. *Science & Innovations in Medicine*. 2019;4(3):4-7. doi: 10.35693/2500-1388-2019-4-3-4-7

<sup>1</sup>Federal Center for Cardiovascular Surgery (Astrakhan, Russia)  
<sup>2</sup>Astrakhan State Medical University (Astrakhan, Russia).

## Information about authors

Olga I. Murygina – physician of clinical laboratory diagnostics.

ORCID: 0000-0002-0359-8664

Elena R. Zhukova – physician of clinical laboratory diagnostics.

ORCID: 0000-0002-5314-4601

Olga V. Petrova – PhD, Head of Clinical Diagnostic Laboratory.

ORCID: 0000-0003-3544-2266

Dina M. Nikulina – PhD, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry.

two-component blood sampling systems – disposable polypropylene tubes with a blood coagulation activator (Sarstedt, Germany). To obtain blood serum, blood tubes were centrifuged at 2500 rpm during 10 minutes.

The free hemoglobin in blood serum was detected by the hemoglobin-cyanide method using a ILAB 300 PLUS biochemical automatic analyzer (Laboratory Instrumentation, USA).

The data was processed using the software package Statistica 6.0 for Windows (StatSoft Inc, США).

**Results.** We used the classical approach and followed the strict inclusion and exclusion criteria, recommended by CLSI C 28-A3 guidelines. Gender and age differences in the content of free hemoglobin in blood serum in men and women of the Astrakhan region were not found. The reference interval of free hemoglobin in men and women of the Astrakhan region was evaluated as 0.02–0.84 g/l.

**Keywords:** free hemoglobin, heart surgery, cardiopulmonary bypass, intravascular hemolysis, reference interval.

**Conflict of Interest:** nothing to disclose.

#### Corresponding Author

Olga V. Petrova

Address: Federal Center for Cardiovascular Surgery,  
4 Pokrovskaya roscha st., Astrakhan, Russia, 414011.

E-mail: students\_asma@mail.ru

Phone: +7 (917)183 82 01.

Received: 28.08.2019

Revision Received: 04.09.2019

Accepted: 26.09.2019

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно в мире выполняется около 800 тысяч операций на сердце в условиях искусственного кровообращения (ИК). ИК – метод, позволяющий поддерживать кровоток в организме (отдельном органе) непродолжительное время за счет полной замены насосной функции сердца и газообменной функции легких. Несмотря на развитие современной перфузиологии, анестезиологии и реанимации, кардиохирургии, ИК является фактором внутрисосудистого гемолиза.

Диагностика внутрисосудистого гемолиза осуществляется с помощью определения лабораторного показателя – свободного гемоглобина (внеэритроцитарного) в сыворотке/плазме крови.

Оценка результатов лабораторного исследования проводится с помощью сопоставления полученных результатов с референсным интервалом (РИ) аналита. РИ имеет границы (верхний и нижний предел). Значения лабораторных показателей, выходящие за пределы РИ, указывают на развитие патологических процессов.

В настоящее время в клинической практике для диагностики внутрисосудистого гемолиза и оценки эффективности проводимого лечения используются справочные РИ свободного гемоглобина, установленные в 80–90 годы прошлого века. РИ свободного гемоглобина, указанные в справочной литературе, имеют различия в верхних пределах: 0–0,51 г/л и 0–0,26 г/л [1, 2].

Международные и отечественные сообщества по клинической лабораторной диагностике рекомендуют рассчитывать и устанавливать собственные РИ для своей аналитической системы (анализатор, реактивы и т.д.) и популяции [3, 4, 5, 6].

Ввиду значительных различий в РИ, указанных в справочной литературе, и значимости свободного гемоглобина в клинической практике для диагностики внутрисосудистого гемолиза у больных после операций на сердце, мы поставили перед собой цель установить РИ свободного гемоглобина у взрослого населения Астраханской области.

## ■ ЦЕЛЬ

Установить РИ (референсные интервалы) содержания свободного гемоглобина при исследовании его гемоглобинцианидным методом на биохимическом автоматическом анализаторе.

## ■ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовался классический подход со строгими критериями включения и исключения, рекомендованными CLSI C 28-A3 [8]. Критерий включения в исследование – практически здоровые лица. Критерий исключения – наличие соматической патологии.

Обследования проводили в рамках профилактического медицинского осмотра в ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава России (Астрахань). Все участники исследования дали свое информированное согласие.

При осмотре врачом-профпатологом – среднее систолическое АД составило  $120,33 \pm 0,64$  мм рт. ст., диастолическое –  $76,66 \pm 0,37$  мм рт. ст., ЧСС –  $70,96 \pm 3,54$  в мин, ЧДД –  $15,72 \pm 2,34$  в мин.

Среднее содержание общего холестерина в сыворотке крови составило  $4,65 \pm 0,46$  ммоль/л, глюкозы –  $5,25 \pm 0,48$  ммоль/л, общего билирубина –  $8,58 \pm 1,04$  ммоль/л, эритроцитов в периферической крови  $4,4 \pm 0,1 \cdot 10^9$ /л и гемоглобина  $127,0 \pm 1,4$  г/л.

Референсная группа была сформирована следующим образом: 120 здоровых мужчин и 120 здоровых женщин, проживающих в Астраханской области, в возрасте от 20 до 60 лет.

Контроль качества определения свободного гемоглобина обеспечивали стандартизацией преаналитического долабораторного, преаналитического лабораторного, аналитического и постаналитических этапов.

Забор крови осуществляли пункцией кубитальной вены после наложения жгута (не более 1 минуты) в положении пациента лежа в двухкомпонентные системы для забора крови – одноразовые полипропиленовые пробирки с активатором свертывания крови (Sarstedt, Германия). Для получения сыворотки крови пробирки с

кровью центрифугировали при 2500 оборотах в минуту в течение 10 минут.

Свободный гемоглобин в сыворотке крови определяли гемоглобинцианидным методом [2] на автоматическом биохимическом анализаторе PLAB 300 PLUS (Laboratory Instrumentation, USA).

Все статистические процедуры выполняли с помощью программного пакета Statistica 6.0 for Windows (StatSoft Inc., USA). Вычисляли  $X$  – среднее арифметическое и  $SD$  (стандартное отклонение). Тип распределения определяли по критерию Колмогорова – Смирнова. Для оценки различий средних тенденций между группами использовали  $t$ -критерий Стьюдента. Разделение считали статистически значимым при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования мы сопоставили полученные значения свободного гемоглобина у здоровых мужчин и женщин с РИ, представленными в справочной литературе. При сопоставлении оказалось, что здоровых мужчин и женщин можно разделить на 3 группы. Первая группа – 44% здоровых мужчин и женщин, у которых значения свободного гемоглобина находились в РИ 0–0,24 г/л. Вторая группа – 31% здоровых мужчин и женщин, у которых значения свободного гемоглобина находились в диапазоне РИ 0–0,46 г/л. Третья группа – 25% здоровых мужчин и женщин, у которых значения свободного гемоглобина находились за пределами РИ 0–0,46 г/л. Обращает на себя внимание и тот факт, что у данной группы лабораторные показатели внутрисосудистого гемолиза эритроцитов (общий билирубин, количество эритроцитов в периферической крови, количество гемоглобина) были в пределах РИ, что указывало на отсутствие внутрисосудистого гемолиза. Ввиду отсутствия лабораторных данных за внутрисосудистый гемолиз значения свободного гемоглобина у данной группы использовали для расчета РИ.

На втором этапе исследования рассчитали  $X$  и  $SD$  свободного гемоглобина у мужчин и женщин; женщин в свою очередь разделили по подгруппам с учетом анатомо-физиологических особенностей, результаты представлены в **таблице 1**.

При сравнении  $X_{ср}$  свободного гемоглобина не выявлено статистически значимых различий между мужчинами и женщинами, а также у женщин в подгруппах. Таким образом, гендерных и возрастных различий в содержании свободного гемоглобина в сыворотке крови не обнаружено.

Статистические показатели	Мужчины 20–60 лет (n = 120)	Женщины (n = 120)			
		1 подгруппа, 20–29 лет (n = 30)	2 подгруппа, 30–39 лет (n = 30)	3 подгруппа, 40–49 лет (n = 30)	4 подгруппа, старше 49 лет (n = 30)
$X_{ср}$	0,42	0,42	0,43	0,42	0,43
$SD$	0,2	0,19	0,21	0,18	0,22

**Таблица 1.** Среднее значение ( $X_{ср}$ ), стандартное отклонение ( $SD$ ) свободного гемоглобина (г/л) у здоровых мужчин и женщин

**Table 1.** Mean value ( $X_{ср}$ ), standard deviation ( $SD$ ) of free hemoglobin (g/l) in healthy men and women

Для получения единых РИ свободного гемоглобина мужчин и женщин объединили в одну группу, референсная группа составила 240 человек. В объединенной группе рассчитали  $X_{ср}$  и  $SD$  свободного гемоглобина.  $X_{ср}$  составила 0,42 г/л и  $SD$  – 0,2.

Согласно рекомендациям CLSI C 28-A3 [8, 9, 10, 11] способ расчета (формула) зависит от численности группы и типа распределения значений аналита.

В нашем случае тип распределения был правильным и численность референсной группы составила 240 человек, следовательно, формула для расчета РИ свободного гемоглобина выглядела следующим образом:  $X_{ср} \pm 2SD$ . Исходя из формулы РИ, свободный гемоглобин составил 0,02–0,82 г/л.

Установив РИ свободного гемоглобина, мы сопоставили полученные данные с данными других авторов. Результаты сопоставления представлены в **таблице 2**.

Из представленных данных в таблице видно, что рассчитанная нами верхняя граница РИ свободного гемоглобина в 3,23 раза больше значений, установленных Тонкошкурова О.А. с соавторами (1996) [2] и 1,83 раза больше значений, установленных Левиной Л.Д. с соавторами (1995) [2].

Полученные нами данные РИ подтверждаются результатами других авторов [1, 7], изучавших причины и частоту развития внутрисосудистого гемолиза у больных ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования в условиях ИК. Чумакова С.П. с авторами (2018) показали, что значения свободного гемоглобина в сыворотке крови доноров находятся в диапазоне от 0 до 1,0 г/л, повышение концентрации свободного гемоглобина в крови более 1 г/л у больных после операций на сердце в условиях ИК указывает на развитие внутрисосудистого гемолиза [7].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день ведется работа по разработке и внедрению в клиническую практику наименее травматичных аппаратов для ИК. Несмотря на это, частота развития внутрисосудистого гемолиза у больных ишемической болезнью сердца в среднем составляет около 50% [7]. Опасность внутрисосудистого гемолиза заключается в том, что он усугубляет течение послеоперационного периода, приводит к развитию почечной патологии, которая в отдельных случаях может стать причиной летального исхода.

Поэтому своевременная, точная и правильная лабораторная диагностика внутрисосудистого гемолиза востребована в настоящее время. Однако в лабораторной

практике используются ручные методики для определения свободного гемоглобина [2], описанные в 80-е годы прошлого века, и РИ к ним.

На сегодняшний день клинические лаборатории оснащены современными высоковоспроизводимыми автоматическими анализаторами (аналитическими системами) с программами

РИ, полученный нами		РИ, представленный в справочной литературе <sup>1</sup>		РИ, представленный в справочной литературе <sup>2</sup>	
0,02–0,84		0–0,26		0–0,46	
Нижняя граница	Верхняя граница	Нижняя граница	Верхняя граница	Нижняя граница	Верхняя граница
0,02	0,82	0	0,26	0	0,46

**Примечание:** <sup>1</sup>Тонкошкурова О.А. с соавторами (1996) [2];

<sup>2</sup>Левина Л.Д. с соавторами (1995) [2].

**Таблица 2.** Референсный интервал свободного гемоглобина (г/л) у здоровых мужчин и женщин, установленный нами и представленный в справочной литературе

**Table 2.** Reference interval of free hemoglobin (g/l) in healthy men and women: measured and represented in literature

внутрилабораторного контроля качества, позволяющими оценить качество химической реакции, правильность и воспроизводимость лабораторных исследований. Автоматический биохимический анализатор PLAB 300 PLUS

позволяет установить РИ свободного гемоглобина при применении гемоглобинцианидного метода.

Согласно отечественным и международным рекомендациям по лабораторной диагностике (по формированию референсных групп и расчету РИ), мы установили РИ свободного гемоглобина у мужчин и женщин Астраханской области. РИ свободного гемоглобина составил 0,02–0,84 г/л.

Установленный нами РИ свободного гемоглобина может быть использован в клинико-диагностических лабораториях Астраханской области, так как он был рассчитан с учетом рекомендаций по формированию референсной группы и стандартизации этапов проведения лабораторных исследований. ■

**Конфликт интересов:** все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kasyanova TR, Levitan BN, Kriventsev YuA, et al. The etiologic peculiarities of changes of fetal hemoglobin in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Astrahanskij medicinskiy zhurnal*. 2012;(4):138–140. (In Russ.) [Касьянова Т.Р., Левитан Б.Н., Кривенцев Ю.А. и др. Этиологические особенности фетального гемоглобина у больных хроническим гепатитом и циррозом печени. *Астраханский медицинский журнал*. 2012;7(4):138–140].
- Tonkoshkurova OA, Dmitriyev AI, Dmitriyeva RE. Measurement of nonerythrocytic hemoglobin of the blood serum or plasma by the hemoglobincyanide metod. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 1996;2:21–22. (In Russ.) [Тонкошкурова О.А., Дмитриев А.И., Дмитриева Р.Е. Определение концентрации внеэритроцитарного гемоглобина плазмы (сыворотки) крови гемоглобинцианидным методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1996;2:21–22].
- Spiridonova VA, Novikova TM, Nikulina DM, et al. Complex formation with protamine prolongs the thrombin inhibiting effect of DNA aptamer in vivo. *Biochimic*. 2018;145:158–162. doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.010
- Petrova OV, Shabanova GR, Egorova TG. Reference intervals for the white blood cell and differential white blood cell count in the adult population at the use of the automatic hematology analyzer Sysmex XT 2000I. *Gematologija i transfuziologija*. 2016;61(3):153–156. (In Russ.) [Петрова О.В., Шабанова Г.Р., Егорова Т.Г. Референсные интервалы количества лейкоцитов в крови и лейкоцитарной формулы у взрослого населения при применении автоматического гематологического анализатора Sysmex XT 2000I. *Гематология и трансфузиология*. 2016;61(3):153–156]. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-153-1
- Petrova OV, Shashin SA, Tarasov DG. Reference values of platelet aggregation in impedance aggregometry with adenosine diphosphoric acid on aggregometer multiplate. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2016;8(3):100–104. (In Russ.) [Петрова О.В., Шашин С.А., Тарасов Д.Г. Референтные значения агрегации тромбоцитов при исследовании импедансным методом с аденозиндифосфорной кислотой на агрегометре Multiplate. *Современные технологии в медицине*. 2016;8(3):100–104. doi: 10.17691/stm2016.8.3.11
- Petrova OV, Urtaeva ZA, Shashin SA, et al. The reference intervals of antitrombin III in population of the Astrakanskaia oblast at application of automated coagulometers. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2016;61(7):429–432. (In Russ.) [Петрова О.В., Уртаева З.А., Шашин С.А. и др. Референсные интервалы антитромбина III у населения Астраханской области при применении автоматических коагулометров. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(7):429–432]. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-429-432
- Chumakova SP, Shipulin VM, Urasova OI, et al. The role of uneven blood oxygen saturation parameter in development of hemolysis after on-pump coronary after bypass graft surgery. *Fundamental'naja i klinicheskaja medicina*. 2018;3 (1):22–29. (In Russ.) [Чумакова С.П., Шипулин В.М., Уразова О.И. и др. Роль неравномерной оксигенации крови и других условий перфузии в патогенезе гемолиза при операциях с искусственным кровообращением. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2018;3 (1):22–29].
- CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. CLSI Document C28-A3c Third ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. <https://clsi.org>.
- Daly C, Liu X, Grey V, Hamid J. A systematic review of statistical methods used in constructing pediatric reference intervals. *Clin Biochem*. 2013;46(13-14):1220–7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.05.058
- Shaw J, Cohen A, Konforte D, Binesh-Marvasti T, et al. Validity of establishing pediatric reference intervals based on hospital patient data: a comparison of the modified Hoffmann approach to CALIPER reference intervals obtained in healthy children. *Clin Biochem*. 2014;47(3):166–172. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.11.008
- Sinclair L, Hall S, Badrick T. A survey of Australian haematology reference intervals. *Pathology*. 2014;46(6):538–43. doi: 10.1097/PAT.0000000000000148