

616.155.16—074

K OTÁZCE STANOVENÍ HEMOGLOBINU V KRVÍ

Podplukovník MUDr. E. SKALA, podplukovník M. ARIENT, PhMr. J. PETEROVÁ, Ústřední vojenská nemocnice

Hemoglobinometrii je věnována v posledních letech opět zvýšená pozornost. Téměř všeobecně je odmítána metoda Sahliho, které se bohužel ještě používá i na pracovištích, kde je k dispozici fotometr. Z fotometrických metod je u nás běžná metoda s čpavkovou vodou a nejnověji

metoda využívající starších prací Drabkina a Austina³), při níž se hemoglobin stanoví jako cyanhemiglobin. Srovnání těchto metod je na tabulce čis. 1.

Cyanhemiglobinové metodě a přípravě příslušného standardního roztoku je věnována řada prací¹⁻⁹ aj., z nichž souhlasně vyplývají její přednosti. V poslední době se však přesto objevil opět návrh připravit neomezeně trvanlivý anorganický standard kombinací roztoků NiCl_2 a CoCl_2 ⁹). Protože jsme v písemnictví našli některé ne zcela souhlasné názory, rozhodli jsme se ověřit několik údajů významných pro praxi.

Položili jsme si tyto otázky:

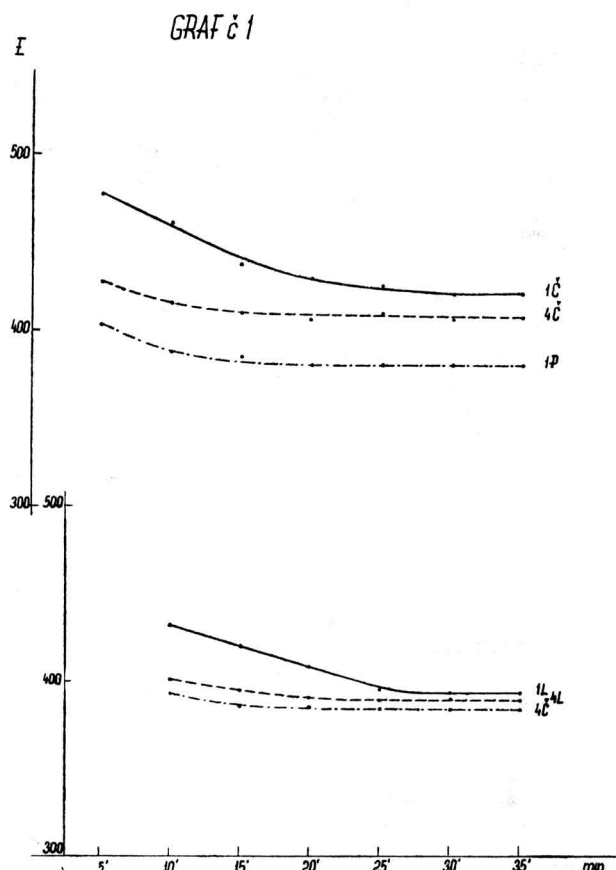
1. Má význam přidávat k standardnímu roztoku antiseptikum, popříp. transformační roztok seitzovat, aby bylo zcela odstraněno nebezpečí bakteriální kontaminace?
2. Která modifikace transformačního roztoku je výhodnější? Má význam zvýšit podíl kyanidu draselného^{6, 8} a je bikarbonát v roztoku zbytečný?
3. Jak dlouho lze transformačního roztoku užívat, popřípadě lze jej uchovávat při pokojové teplotě?
4. Jaké výhody má Resslerův anorganický standard?

Materiál a metody

1. Cyanhemiglobinový standard jsme připravovali z exspirovaných erytrocytárních mas postupem podle Crosbyho a Houchina²) v těchto úpravách: a) substance transformačního roztoku byly sypány do sterilizované vody, b) transformační roztok byl před přidáním krvinek seitzován, c) do připraveného standardu byl přidán merthiolát (konečná koncentrace merthiolátu byla 2 ‰).

Tabulka 1

	Metoda	
	s čpavkovou vodou	cyanhemiglobinová
Transformační roztok	čpavková voda (se vzdušným O_2)	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{KCN}$ (+ NaHCO_3)
Hemoglobin převeden v	$\text{Hb}'''\text{O}_2$	$\text{Hb}'''\text{CN}$
Chyba metody	obsah Hb''' v krvi snižuje extinkci	0
Po přípravě vzorku je možno měřit na fotometru	ihned	po 20 min.
Mnohahodinovým stáním vzorku připraveného k měření dojde ke změně	extinkce klesá (vznik Hb''')	0 (je možno měřit i po několika dnech)
Lze připravit trvalý standard?	ne	ano
Cena za 1 litr transform. roztoku	asi 70 hal.	asi 70 hal.
Smrtelná dávka transform. roztoku	—	> 3 litry



Graf 1

Závislost extinkce na době, která uplyne od přípravy vzorku k měření (25 cmm krve + 7 ml transformačního roztoku). 1,4 = čísla roztoku (viz text). Č = čerstvě připravený roztok, L = roztok uchovávaný 5 týdnů v lednici, P = roztok uchovávaný 5 týdnů při pokoj. teplotě

Standard byl rozdělen po 20 ml a uložen při teplotě 37° C, při pokojové teplotě, v lednici (+2 až 4° C) a při -20° C.

2. Připravili jsme transformační roztoky ve složení: $K_3Fe(CN)_4$ 0,2, KCN 0,1, Aquae dest. ad 1000,0 (roztok č. 1), dále: $K_3Fe(CN)_4$ 0,2, KCN 0,05, $NaHCO_3$ 1,0, Aquae dest. ad 1000,0 (roztok č. 4) a některé další. Roztoky jsme uložili jednak v lednici, jednak při pokojové teplotě a používali jich souběžně při stanovení množství hemoglobinu v krvi. Užívali jsme poměru 25 cmm oxalátové krve + 7 ml transformačního roztoku.

3. Měřeno při vlnové délce 540 m μ na spektrofotometru Beckman typ DU.

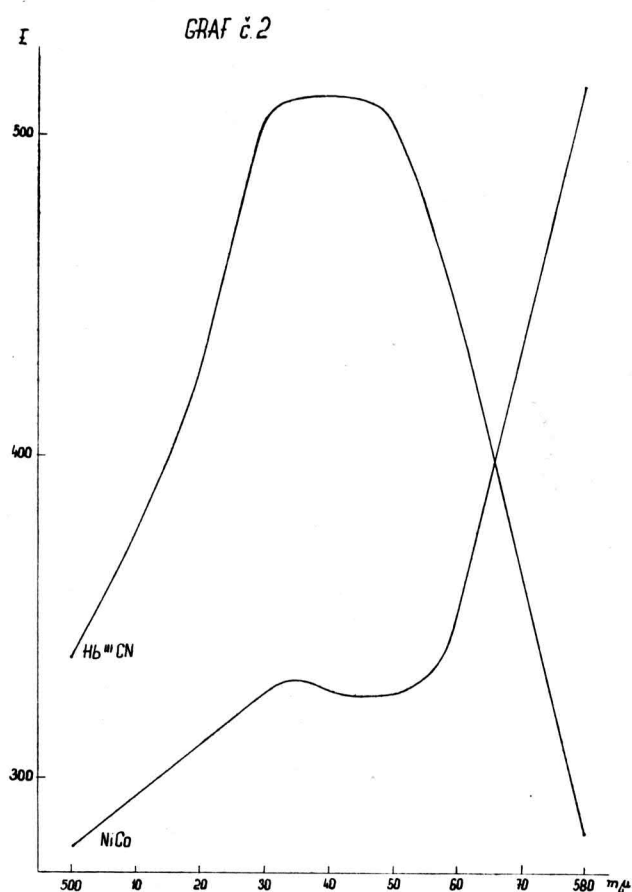
Výsledky

1. Nejlépe se osvědčil prostý způsob přípravy standardu, při němž se substance transformačního roztoku sypou do sterilizované vody a další manipulace je sterilní. Standard uložený v lednici se nemění po řadu měsíců (po 14 měsících byl pokles extinkce zanedbatelný nebo žádný — $3 \times < 2 \%$, $2 \times$ nezměněno). Seitzování způsobilo pokles o 6 %, přísada merthiolátu až o 18 %. Byl potvrzen známý vliv vyšších teplot. Standard s přísadou merthiolátu precipitoval již při

pokojové teplotě. Zmrznutím se standard kalí. Všechny pět dosud připravených šarží standardu (po 2 litrech) bylo sterilních. Prostý semisterilní způsob přípravy tedy pro praxi vyhovuje.

2. Výsledky srovnání obou transformačních roztoků jsou znázorněny na grafu č. 1. Nepotvrdili jsme výhodu zvýšení podílu KCN v roztoku. Přídavek 1‰ bikarbonátu urychluje transformaci. Roztok s bikarbonátem je ovšem třeba uchovávat v lednici, protože při uložení v pokojové teplotě (zejména na světle) dochází k precipitaci. Roztok uložený v lednici je použitelný i po 5 týdnech. Je však výhodné jej obměňovat častěji ($2 \times$ měsíčně).

3. Podařilo se připravit Resslerův anorganický standard s dosti uspokojivou spektrofotometrickou charakteristikou (graf č. 2). Ovšem odečítali-li jsme extinkci anorganického standardu na kalibračních křivkách připravených na různých fotometrech pomocí cyanhemiglobinového standardu, dostali jsme na Beckmanově fotometru hodnotu odpovídající 15,5 g%, na hemometru Prema 19,3 g% a na Pulfrichově fotometru bylo měření prakticky neproveditelné. Bylo by tedy třeba anorganický standard upravovat podle užívaného fotometru, což jistě není výhodné.



Graf 2

Srovnání spektrofotometrických charakteristik cyanhemiglobinového standardu ($Hb'''CN$) a Resslerova anorganického standardu ($NiCo$)

Diskuse

V současné době je snaha zjednodušovat a současně zpřesňovat laboratorní postupy pro hromadná hematologická vyšetřování, zejména vylučovací, která představují hlavní podíl práce hematologických laboratorí. Proto dále stoupá význam přesného stanovení hemoglobinu v krvi. Cyanhemoglobinová metoda při užití elektrického i Pulfrichova fotometru tu znamená nesporný přínos, protože velmi dobře vyhovuje po stránce teoretické, a tím, že je k dispozici dostatečně stálý standard, umožňuje srovnávat výsledky různých laboratorí, což je dosud obtížné.⁴⁾

Naše zkušenosti potvrdily, že lze dobrý cyanhemoglobinový standard připravovat poměrně jednoduchou metodou podle Crosbyho a Houchina a že při semisterilním způsobu práce je nebezpečí bakteriální kontaminace malé. Neúspěchy s přísadou merthiolátu a dokonce i se seřezáváním roztoku ukázaly, že cyanhemoglobinový komplex je přece jen dosti labilní a že otázce trvanlivého standardu je třeba věnovat nadále pozornost. Pro praxi však i dosavadní standard má značné výhody a nedomníváme se, že by ho mohl Resslerův anorganický standard v současné podobě nahradit.

Výhody Remmerovy modifikace⁸⁾ transformačního roztoku (se zdvojnásobením podílu KCN) jsme nepotvrdili. Ecklebeho modifikaci⁶⁾ (se čtyřnásobným podílem KCN) jsme předem odmítli pro zbytečné zvyšování toxicity. Nepotvrdili jsme ani Remmerův názor⁸⁾, že bikarbonát v roztoku neovlivňuje dobu transformace hemoglobinu. Z našich pokusů vyplývá, že lze měřit již za 20 minut po smíchání zkoušeného vzorku krve s transformačním roztokem č. 4.

Pokud jde o metodu Sahliho, zastáváme názor, že je třeba ji zcela opustit. Pro hromadná vyšetření v podmínkách, kde není k dispozici vhodný fotometr, je daleko užitečnější kapková metoda podle Phillipse van Slyka.

Souhrn

Autoři získali dobré zkušenosti s přípravou cyanhemoglobinového standardu podle Crosbyho

a Houchina při dodržení semisterilního postupu. Potvrdili výhody přísady bikarbonátu sodného k transformačnímu roztoku. Nemohli potvrdit rovnocennost anorganického Resslerova standardu se standardem cyanhemoglobinovým. Odmítají Sahliho metodu i v těch případech, že fotometr není k dispozici.

Резюме

Придерживаясь полустерильного способа приготовления циангемоглобинового стандарта по методу Кросби и Гучина, авторы добились хороших результатов. Они подтвердили достоинства прибавления бикарбоната натрия к трансформирующему раствору. Подтвердить равноценность анорганического стандарта Ресслера со стандартом циангемоглобина они не смогли. Метод Сали авторы отвергают и в том случае, когда не имеется в их распоряжении фотометра.

Summary

The authors gained favourable experiences with the preparation of the cyanhaemoglobin standard by the method of Crosby and Houchin using a semisterile technique. They confirm that addition of sodium bicarbonate to the transformation fluid is advantageous, but noted that the anorganic Ressler standard is not as valuable as the cyanhaemoglobin standard. They reject the Sahli method also in cases when a photometer is not available.

Písemnictví

1. Cannan, R. K.: Blood 1958, 13, 11, 1101.
2. Crosby, W. H., Houchin, D. N.: Blood 1957, 12, 12, 1132.
3. Drabkin, D. L., Austin, J. H.: J. biol. Chem. 1932, 98, 719, cit. dle ⁸⁾.
4. Dudek, J., Daudlebský, B., Freiová, M.: Prakt. lék. 1959, 39, 24, 1146.
5. Dudek, J., Daudlebský, B., Šimon, J.: Prakt. lék. 1960, 40, 5, 229.
6. Ecklebe, G.: Dtsch. med. Wschr. 1959, 84, 35, 1531.
7. Green, P., Teal, C. F. J.: Amer. J. clin. Path. 1959, 32, 3, 216.
8. Remmer, H.: Der Internist 1959, 1, 6, 232.
9. Ressler, N., Nelson, N. A., Smith, I. M.: J. lab. clin. Med. 1959, 54, 2, 304.