

Научная статья

Original article

УДК 636.661.4:591.111

DOI 10.55186/25876740_2022_6_6_31

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КОРОВ В
ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБОВ И СРОКОВ ЕЁ ХРАНЕНИЯ**

**THE STUDY OF BIOCHEMICAL INDICATORS OF COW BLOOD DEPENDING
ON METHODS AND TERMS OF ITS STORAGE**



Платонов Андрей Викторович, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Вологодский научный центр РАН» (160014, Россия, г. Вологда, ул. Горького, д. 56а), доцент ФКОУ ВО «Вологодский институт права и экономики Федеральной службы исполнения наказаний» (160002, Россия, г. Вологда, ул. Щетинина, д. 2) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1110-7116>, platonov70@yandex.ru

Смирнова Юлия Михайловна, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией ФГБУН «Вологодский научный центр РАН» (160014, Россия, г. Вологда, ул. Горького, д. 56а) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9155-5110>, julya_smirnova_35@list.ru

Артамонов Иван Владимирович, младший научный сотрудник ФГБУН «Вологодский научный центр РАН» (160014, Россия, г. Вологда, ул. Горького, д. 56а) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6387-4886>, iv.artamonov@outlook.com

Platonov Andrei Viktorovich, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher, Vologda Research Center of the Russian Academy of Sciences

(160014, Russian Federation, Vologda, Gorky Street, 56A), Associate Professor, Vologda Institute of Law and Economics of the Federal Penitentiary Service of Russia (160002, Russian Federation, Vologda, Shchetinina Street, 2) ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1110-7116>, platonov70@yandex.ru

Smirnova Yulia Mihajlovna, Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Laboratory, Vologda Research Center of the Russian Academy of Sciences, (160014, Russian Federation, Vologda, Gorky Street, 56A) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9155-5110>, julya_smirnova_35@list.ru

Artamonov Ivan Vladimirovich, Junior Research Vologda Research Center of the Russian Academy of Sciences (160014, Russian Federation, Vologda, Gorky Street, 56A), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6387-4886>, iv.artamonov@outlook.com

Аннотация. Одной из стадий технологического процесса молочного животноводства является биохимическое исследование крови животных. При этом большое значение отводится преаналитическому этапу, так как несоблюдение правил отбора, транспортировки и хранения проб крови при лабораторном анализе может привести к 50-70% ошибок. Создание и регулярное осуществление системы мероприятий для выявления и предотвращения недопустимых погрешностей является неотъемлемой частью процесса выполнения достоверных лабораторных исследований. Однако представление об обеспечении качества достоверных результатов лабораторных исследований как о последовательном и правильном выполнении только аналитического этапа является очень узким и не может считаться полноценной и достаточной основой обеспечения гарантированного качества работы специалистов клинической лабораторной диагностики. В работе изучено влияние факторов преаналитического этапа (способы и сроки хранения образцов крови), которые могут оказать интерферирующее влияние на будущую диагностическую информацию. Исследование показателей крови проводилось с помощью стандартных тест-систем на автоматическом ветеринарном биохимическом анализаторе. Разные способы и сроки хранения крови оказали существенное

влияние на уровень метаболитов в крови. Наибольшие отклонения показателей зафиксированы при хранении цельной крови более суток при температуре + 4°C, а также при её замораживании. Хранение сыворотки крови при температуре + 4°C не более суток или ее замораживание не приводило к существенным изменениям изученных показателей. В производственных условиях главным специалистам сельхозпредприятий в случае возникших трудностей быстрой доставки крови (более суток) для большей стабильности содержания аналитов в крови рекомендуем отделить сыворотку и произвести её заморозку с дальнейшей транспортировкой для проведения аналитического этапа исследования.

Abstract. One of the stages of the dairy farming technological process is the biochemical study of the animal blood. At the same time, great importance is given to the preanalytical stage, since non-compliance with the rules for the selection, transportation and storage of blood samples in laboratory analysis can lead to 50-70% errors. The creation and regular implementation of a system of measures for identifying and preventing unacceptable errors is an integral part of the process of performing reliable laboratory research. However, the concept of reliable laboratory results quality assurance as a consistent and correct implementation of the analytical stage only is very narrow and cannot be considered a full and sufficient basis for ensuring the guaranteed quality of the work of clinical laboratory diagnostics specialists. The paper studies the influence of factors on the preanalytical stage (methods and terms of blood samples storage), which may have an interfering effect on future diagnostic information. The study of blood parameters has been carried out using standard test systems on an automatic veterinary biochemical analyzer. Different methods and terms of blood storage had a significant impact on the level of metabolites in the blood. The greatest deviations of indicators were recorded during storage of whole blood for more than a day at a temperature of + 4°C, as well as when it was frozen. Storage of blood serum at a temperature of + 4°C for no more than a day or its freezing did not lead to significant changes in the studied parameters. In production conditions, in case of difficulties in the rapid blood delivery to the main specialists of agricultural enterprises (when it takes

more than a day), for greater stability of the content of analytes in the blood, we recommend separating the serum and freezing it with further transportation for the analytical stage of the study.

Ключевые слова: *цельная кровь, сыворотка крови, биохимические показатели, сроки и способы хранения.*

Keywords: *whole blood, blood serum, biochemical parameters, terms and methods of storage.*

Введение

Анализ биохимических показателей крови крупного рогатого скота предназначен для количественного определения химического состава крови и оценки функционального состояния органов и систем организма животных, как с целью определения уровня обменных процессов и обеспеченности их всеми необходимыми питательными веществами, так и для современной диагностики и выявления патологических процессов на доклинической стадии [1,2].

Достоверность результатов подобных исследований во многом определяется квалификацией сотрудника. Поскольку исключить влияние «человеческого фактора» на результаты исследования невозможно (например, из-за ошибок при разведении реактивов, калибраторов и контрольных материалов, пипетировании, снятии показаний при фотометрировании и пр.), то в современных лабораториях ручные методы определения аналитов все активнее замещаются автоматизированными – выполняемыми при помощи автоматических биохимических анализаторов [3,4].

Автоматический биохимический анализатор позволяет в короткие сроки проводить биохимические исследования сыворотки крови фотометрическими методами с минимальным расходом биохимических реагентов. Прибор автоматически выполняет взятие образца и реагентов, перемешивание реакционной жидкости, измерение, промывку, вычисление, выводит результат на экран или на печать. Замена ручной работы на автоматическое выполнение анализов не только увеличивает эффективность работы, но и уменьшает ошибки

при выполнении тестов, тем самым позволяя получать более точные и воспроизводимые результаты [5].

В реальных условиях хозяйствования не всегда возможен анализ крови после отбора образцов. Поскольку при ведении животноводства, кровь и ее производные являются наиболее часто используемым типом биоматериала при проведении биохимических исследований, изучение условий хранения образцов крови с целью сохранности качественных и количественных показателей является одним из актуальных направлений в области контроля качества биообразцов. Существенную роль здесь играет обеспечение адекватных условий хранения. Неправильное хранение образцов может привести к разрушению, модификации аналитов, что в конечном итоге снизит достоверность результатов исследований. Несмотря на актуальность проблемы, исследований, посвященных изучению стабильности биохимических показателей, измеряемых в сыворотке крови, при разных условиях и сроках хранения не так много.

По некоторым данным содержание электролитов, субстратов, некоторых ферментов может не изменяться при хранении образцов сыворотки (плазмы) крови при температуре холодильника +4 °С до четырех дней, в некоторых же работах указано, что изменение показателей уже существенно изменяется на вторые сутки хранения [6,7].

В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа» допускается хранение сыворотки (плазмы), отделенной от форменных элементов крови, в замороженном виде (при -20 °С) – в течение нескольких недель, при этом размораживать сыворотку можно только один раз. По другим данным температура ниже +4 °С может существенно изменить содержание в образце многих аналитов [8,9].

Цель данной работы – показать, что нарушение инструкций и правил отбора, транспортировки и хранения крови крупного рогатого скота существенно влияет на стабильность биохимических компонентов сыворотки.

Материалы и методы исследования

Работу вели в соответствии с принципами гуманного обращения с животными, используемыми в научном эксперименте. Кровь от трех клинически здоровых животных производственной группы с уровнем молочной продуктивности около 8000 кг за лактацию, отбиралась с соблюдением мер асептики и антисептики из хвостовой вены в пробирку с активатором свертывания в утренние часы перед кормлением. Пробирки с кровью в термоконтейнере с хладагентом в течение полутора часов были доставлены в лабораторию.

Исследования по определению биохимических показателей крови проводились с помощью стандартных тест-наборов фирмы «Диакон-Вет» на автоматическом ветеринарном биохимическом анализаторе *iMagic-V7* (iCubio).

В сыворотке крови определяли показатели белкового обмена: общий белок, альбумины, мочевины; показатели активности ферментов: аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ); содержание глюкозы, фосфора и кальция. Выбор анализируемых компонентов обусловлен тем, что анализ данных показателей широко используется в сельскохозяйственной практике, а также что их содержание может изменяться с течением времени. Так изменение буферных свойств крови повлияет на активность ферментов и структуру белков, разрушение форменных элементов крови изменит содержание минеральных веществ, увеличение окислительных процессов скажется на содержании белков и глюкозы [6]

Варианты анализируемой крови в зависимости от сроков и способов хранения приведены в табл. 1.

Таблица 1. Схема эксперимента

Сроки анализа, после взятия крови	Варианты анализируемой крови
1-е сутки	Сыворотка, полученная из свежей крови (отделение сыворотки проводили в течение 2-3 часов после забора крови у животных)
2-е сутки	Сыворотка, хранившаяся в холодильнике 24 ч после отделения при температуре + 4°C
	Сыворотка, полученная из крови хранившейся 24 ч в холодильнике при температуре + 4°C
3-и сутки	Сыворотка, хранившаяся в холодильнике 48 ч после отделения при температуре + 4°C

	Замороженная сыворотка, полученная из свежей крови, хранившаяся в холодильнике 48 ч при температуре – 18°C
5-е сутки	Сыворотка, хранившаяся в холодильнике четверо суток после отделения при температуре + 4°C
	Замороженная сыворотка, полученная из свежей крови, хранившаяся в холодильнике четверо суток при температуре – 18°C
	Сыворотка, полученная из замороженной свежей крови, хранившейся в холодильнике четверо суток при температуре – 18°C

Компоненты сыворотки крови определяли в трехкратной аналитической повторности, внутренний контроль качества результатов анализов проводили с использованием калибровочных и контрольных материалов фирмы DiaSys (Германия): контрольные сыворотки «Норма» (*TruLab N*), «Патология» (*TruLab P*) и мультикалибратор (*TruCal U*).

Результаты и обсуждение

На начальном этапе был проведен анализ биохимических показателей в день взятия крови сразу после её транспортировки в лабораторию (таблица 2).

Таблица 2. Содержание биохимических компонентов сыворотки, через 2 часа после забора крови

Показатель	Норма	1-е животное	2-е животное	3-е животное
Общий белок, г/л	70,0–89,0	75,27±0,65	78,60±0,60	75,83±0,51
Альбумины, г/л	35,0–50,0	35,53±0,19	36,20±0,13	35,00±0,11
Мочевина, ммоль/л	3,30–6,70	3,58±0,02	4,01±0,03	4,10±0,02
АЛТ, МЕ/л	7,6–35,0	9,40±0,04	20,67±0,09	8,77±0,03
АСТ, МЕ/л	45,0–120,0	57,17±0,32	72,73±0,40	60,37±0,28
Глюкоза, ммоль/л	2,50–3,88	3,59±0,02	3,63±0,01	3,57±0,02
Фосфор, ммоль/л	1,29–2,25	1,87±0,01	1,90±0,01	1,97±0,01
Кальций, ммоль/л	2,60–3,80	3,78±0,03	3,54±0,02	3,57±0,02

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что показатели сыворотки крови животных не выходили за рамки референсных значений. В крови животного №2 отмечена несколько более высокая активность аланинаминотрансферазы, по сравнению с другими коровами, вероятно, это является индивидуальной особенностью животного.

В практическое деятельности возникают ситуации, когда сельскохозяйственные предприятия доставляют кровь для анализа не на первые

сутки после забора у животных, это связано с удаленностью предприятий от биохимических лабораторий, экономией финансовых средств при доставке и другими факторами.

Поэтому был проведен анализ анализов в крови при разных сроках и способах хранения. На рисунках представлены величины отношений показателей сыворотки крови после хранения в разных условиях к анализам, полученным в первый день исследования (эталон принят за единицу).

Данные рисунка 1А свидетельствуют, что хранение сыворотки в холодильнике при температуре + 4°C в течение суток не оказывает существенного влияния на устойчивость биохимических компонентов, отклонения от эталонного образца составляют не более 5%. При более длительном хранении сыворотки в холодильнике разница с начальными показателями несколько увеличивается, так на 3-е сутки хранения активность АЛТ возрастает на 11%, содержание мочевины снижается на 9,5%. На 5-е сутки хранения – содержание кальция занижено на 18%, содержание мочевины на 14,5%, содержание глюкозы на 9%. Это, по-видимому, связано с процессами разрушения веществ, происходящими при длительном хранении проб.

Данные рисунка 1Б свидетельствуют, что в сыворотке крови полученной в первый день исследования, а затем замороженной показатели биохимических компонентов близки к исходным, отклонения составляют не более 5%, что свидетельствует об устойчивости определяемых компонентов при температуре – 18°C.

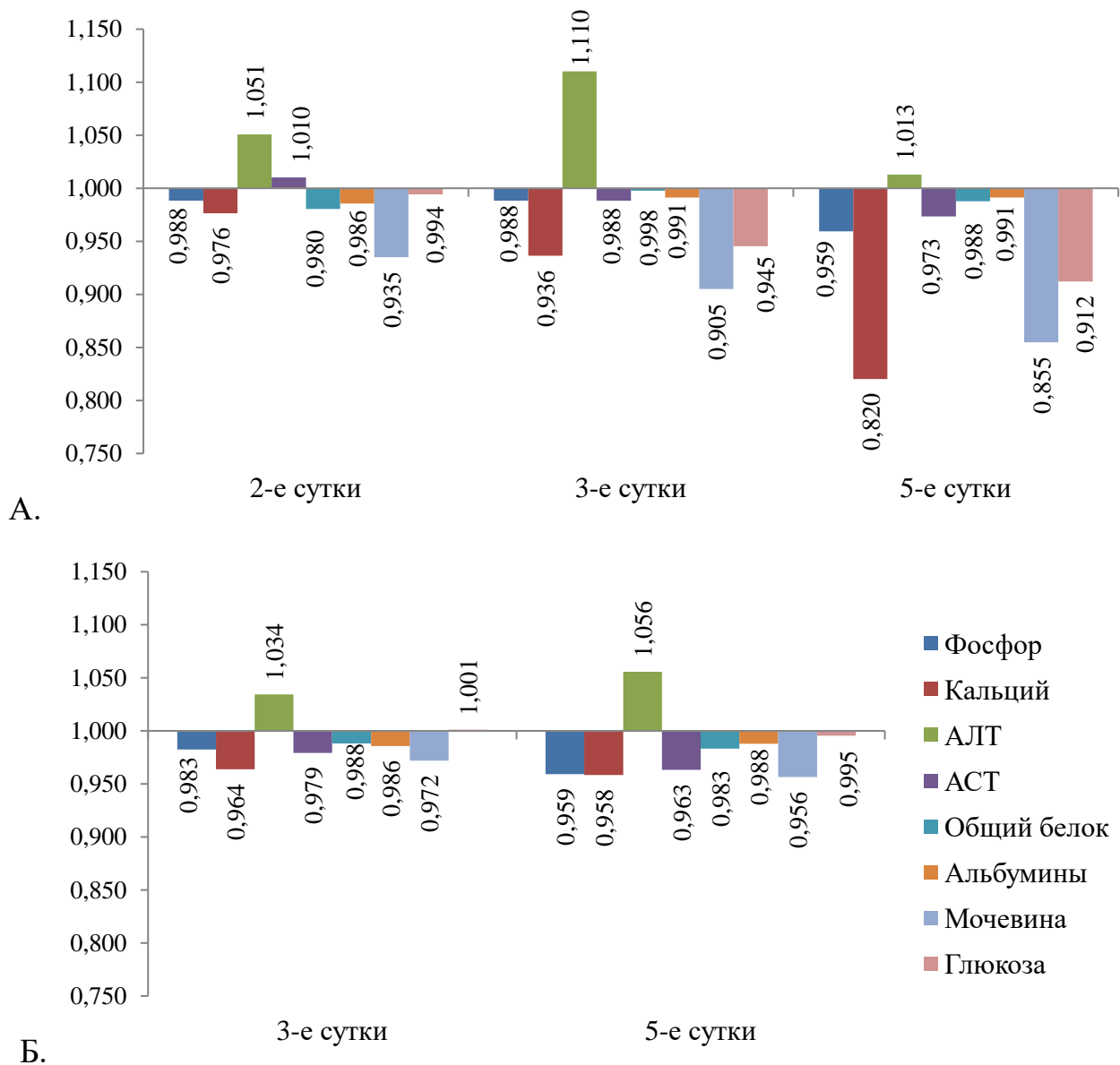


Рис. 1 – Отклонения биохимических показателей крови от исходного состояния в охлажденной (А) и замороженной (Б) сыворотке в зависимости от сроков хранения

Хранение же цельной крови в холодильнике при температуре + 4°С в течение 24 ч оказывает существенное влияние на устойчивость некоторых биохимических компонентов сыворотки (рис.2).

Так если содержание общего белка, альбуминов, глюкозы, фосфора и кальция близко к эталонным показателям, то показатели активности ферментов и концентрация мочевины возрастают более чем на 12%. Это может быть обусловлено тем, что многие ферменты в высоких концентрациях содержатся в лейкоцитах, эритроцитах и тромбоцитах, и хранение неразделенной сыворотки

может приводить к высвобождению этих ферментов и завышению некоторых биохимических показателей.

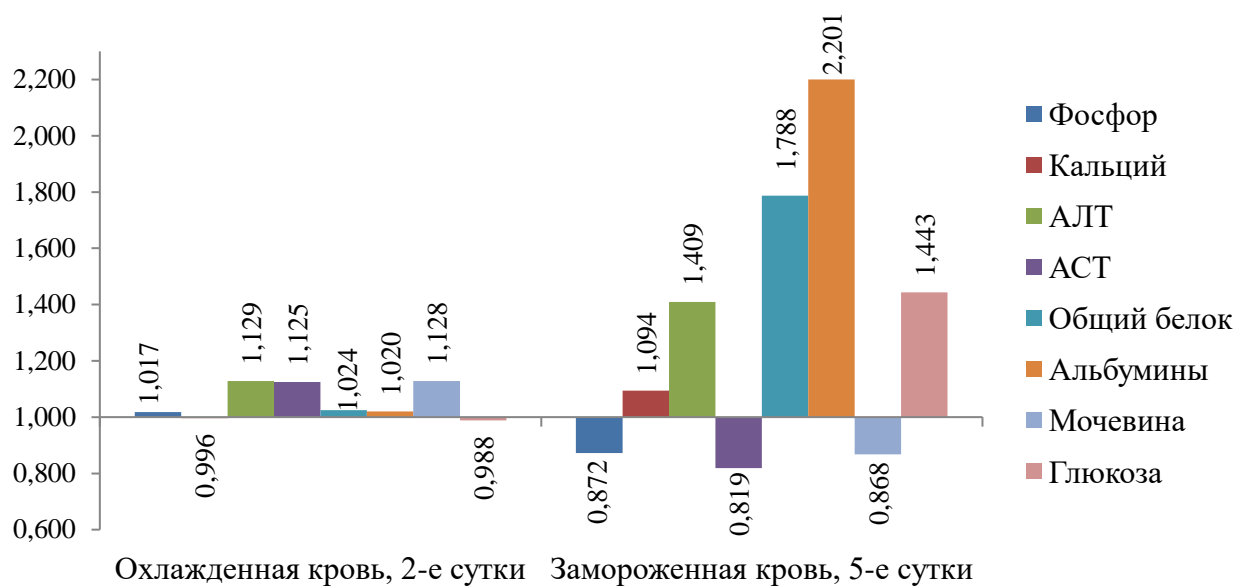


Рис. 2 – Отклонения биохимических показателей крови от исходного состояния в зависимости от способа хранения цельной крови

Биохимические показатели замороженной крови значительно отличаются от результатов, полученных в первый день исследования (рис.2). Так в сыворотке на 13–18% занижено содержание АСТ, мочевины и фосфора, в то время как содержание остальных определяемых компонентов существенно завышено, например содержание белка и альбуминов в 1,78 и 2,20 раза больше по сравнению с первоначальными значениями. Такая картина получена вследствие, того что при заморозке цельной крови с последующим размораживанием произошло разрушение форменных элементов с последующим изменением биохимических параметров. Внешне гемолиз проявился в красном цвете сыворотки крови (за счет свободного гемоглобина, вышедшего из эритроцитов), что стало видно после отделения клеток крови центрифугированием.

Выводы. Разные способы и сроки хранения крови оказали существенное влияние на её биохимические показатели. Наибольшие отклонения показателей зафиксированы при хранении цельной крови более суток, а также при её замораживании. Хранение сыворотки крови не более суток при температуре + 4°C

или её замораживание не приводило к существенным изменениям анализируемых показателей. В производственных условиях главным специалистам сельхозпредприятий в случае возникших трудностей быстрой доставки крови (более суток) для большей стабильности содержания аналитов в крови рекомендуем отделить сыворотку и произвести заморозку с дальнейшей ее транспортировкой для проведения аналитического этапа исследования.

Литература

1. Васильева С.В., Конопатов Ю.В. Клиническая биохимия крупного рогатого скота. СПб.: Лань. 2017. 188 с.
2. Громыко Е.В. Оценка состояния организма коров методами биохимии // Экологический вестник северного Кавказа. 2005. Т. 1. № 2. С. 80–94.
3. Минеева Л.Д., Гугуева Н.Б., Джуха Ю.П., Соловей А.Э., Новоточенова В.И. Сравнительная оценка результатов судебно-биохимических анализов, полученных общепринятыми методами и при помощи автоматического биохимического анализатора // Проблемы экспертизы в медицине. 2009. Т. 9. № 36–4. С. 39–40.
4. Павлюшина В.А., Кандрина Н.Ю. О необходимости внедрения автоматизированных методов исследования в экспертную практику судебно-биохимических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы // Судебная медицина. 2016. Т. 2. №1. С. 38–40.
5. Скворцова Р.Г. Современные подходы к организации клинко-диагностической лаборатории // Сибирский медицинский журнал. 2013. № 6. С. 170–174.
6. Эделев И.С. Влияние давности и температуры хранения трупной крови на показатели веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ) // Вестник судебной медицины. 2018. Т. 7. № 3. С. 15–18.
7. Мороз В.В., Голубев А.М., Козлова Е.К., Афанасьев А.В., Гудкова О.Е., Новодержкина И.С., Марченков Ю.В., Кузовлев А.Н., Заржецкий Ю.В., Костин А.И., Волков Д.П., Яковлев В.Н. Динамика морфологических изменений эритроцитов и биохимических показателей консервированной цельной крови в

различные сроки хранения // Общая реаниматология. 2013. Т. IX. № 1. С. 5–13.

8. Козлова В.А., Метельская В.А., Покровская М.С., Ефимова И.А., Литинская О.А., Куценко В.А., Яровая Е.Б., Шальнова С.А., Драпкина О.М. Изучение стабильности биохимических маркеров при непрерывном длительном хранении сыворотки крови и при однократном размораживании // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020. Т. 19. № 6. С.149–157.

9. Осочук С.С. Влияние низкотемпературного хранения сыворотки крови крыс на содержание холестерина // Проблемы здоровья и экологии. 2017. №1. (51) С. 62-66.

References

1. Vasil'eva S.V., Konopatov YU.V. Klinicheskaya biokhimiya krupnogo rogatogo skota. SPb.: Lan'. 2017. 188 s.

2. Gromyko E.V. Otsenka sostoyaniya organizma korov metodami biokhimii // Ehkologicheskii vestnik severnogo Kavkaza. 2005. Т. 1. № 2. S. 80–94.

3. Mineeva L.D., Gugueva N.B., Dzhukha YU.P., Solovei A.EH., Novotochenova V.I. Sravnitel'naya otsenka rezul'tatov sudebno-biokhimicheskikh analizov, poluchennykh obshchepriyatymi metodami i pri pomoshchi avtomaticheskogo biokhimicheskogo analizatora // Problemy ehkspertizy v meditsine. 2009. Т. 9. № 36–4. S. 39–40.

4. Pavlyushina V.A., Kandrina N.YU. O neobkhodimosti vnedreniya avtomatizirovannykh metodov issledovaniya v ehkspertnuyu praktiku sudebno-biokhimicheskikh otdelenii byuro sudebnomeditsinskoi ehkspertizy // Sudebnaya meditsina. 2016. Т. 2. №1. S. 38–40.

5. Skvortsova R.G. Sovremennye podkhody k organizatsii kliniko-diagnosticheskoi laboratorii // Sibirskii meditsinskii zhurnal. 2013. № 6. S. 170–174.

6. Ehdelev I.S. Vliyanie davnosti i temperatury khraneniya trupnoi krovi na pokazateli veshchestv nizkoi i srednei molekulyarnoi massy (VNSMM) // Vestnik sudebnoi meditsiny. 2018. Т. 7. № 3. S. 15–18.

7. Moroz V.V., Golubev A.M., Kozlova E.K., Afanas'ev A.V., Gudkova O.E., Novoderzhkina I.S., Marchenkov YU.V., Kuzovlev A.N., Zarzhetskii YU.V., Kostin

A.I., Volkov D.P., Yakovlev V.N. Dinamika morfologicheskikh izmenenii ehritrotsitov i biokhimicheskikh pokazatelei konservirovannoi tsel'noi krovi v razlichnye sroki khraneniya // Obshchaya reanimatologiya. 2013. T. IX. № 1. S. 5–13.

8. Kozlova V.A., Metel'skaya V.A., Pokrovskaya M.S., Efimova I.A., Litinskaya O.A., Kutsenko V.A., Yarovaya E.B., Shal'nova S.A., Drapkina O.M. Izuchenie stabil'nosti biokhimicheskikh markerov pri nepreryvnom dlitel'nom khranении syvorotki krovi i pri odnokratnom razmorazhivanii // Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika. 2020. T. 19. № 6. S.149–157.

9. Osochuk S.S. Vliyanie nizkotemperaturnogo khraneniya syvorotki krovi krysa na sodержanie kholesterola // Problemy zdorov'ya i ehkologii. 2017. №1. (51) S. 62-66.

© Платонов А.В., Смирнова Ю.М., Артамонов И.В. 2022. *International agricultural journal*, 2022, № 6, 1145-1157.

Для цитирования: Платонов А.В., Смирнова Ю.М., Артамонов И.В. Исследование биохимических показателей крови коров в зависимости от способов и сроков её хранения // *International agricultural journal*. 2022. № 6, 1145-1157.