



УДК 619:57.041:57.043:612.111
DOI:10.52419/issn2072-2419.2022.1.110

ВЛИЯНИЕ МЕТОДА ОТБОРА КРОВИ НА РИСК МЕХАНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ У ТЕЛЯТ ЗДОРОВЫХ И С СИНДРОМОМ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Алехин Ю.Н. – д. вет. н., глав. науч. сотр., Жуков М.С. – к.вет.н., ст.науч.сотр., Нико-
ненко Г.В. – мл. науч. сотр.
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии»

Ключевые слова: лабораторная диагностика, преаналитический этап исследования крови, гемолиз, телята, синдром эндогенной интоксикации. **Key words:** laboratory diagnostics, preanalytical stage of blood testing, hemolysis, calves, endogenous intoxication syndrome.



РЕФЕРАТ

В условиях комплекса по производству молока в Воронежской области, где содержится крупный рогатый скот голштинской породы, были проведены исследования по изучению степени травматизма клеток крови при её отборе разными методами у телят здоровых и с синдромом эндогенной интоксикации. У здоровых животных отбор проб крови методом пассивного вытекания не оказывает влияния на мембраны эритроцитов. При использовании вакуумных систем нет визуальных признаков (гемолиз) деструкции клеток, но происходят изменения их цитоскелета с повышением чувствительности мембран к негативным преаналитическим факторам. У животных с синдромом эндогенной интоксикации имеются явные или скрытые деструкции мембран эритроцитов, которые проявляется повышением содержания внеэритроцитарного гемоглобина, степени физиологического гемолиза, чувствительности к внутри- и внесосудистым гемолитическим факторам. В результате, уже при отборе образцов крови методом пассивного самотека возникает риск гемолиза, а при использовании вакуумной системы он наблюдается в большинстве проб. Поэтому при обследовании больных животных необходимо учитывать высокую вероятность ошибки лабораторной диагностики на преаналитическом этапе, возникающей по причине гемолиза эритроцитов с повышенной чувствительностью к внесосудистым цитолитическим факторам, в том числе к механическим воздействиям во время отбора проб крови.

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень развития технологий лабораторных исследований позволяет рассматривать их как равный клини-

ческим методам по информативности методический подход к оценке состояния организма и планированию тактики профилактики или терапии [2]. При этом

нередки случаи, когда результаты, полученные из лаборатории, не согласуются с клинической картиной, наблюдаемой врачом-клиницистом. Одной из причин подобно ситуации являются методологические ошибки лабораторных исследований, которые сопровождаются усилением биологической и аналитической вариации [3, 6]. Выделяют 3 основных этапа лабораторной диагностики: преаналитический — предшествующий непосредственному исследованию образца; аналитический — лабораторный анализ биоматериала в соответствии с назначением; постаналитический — оценка и систематизация полученных данных. Технологическая модернизация клинических лабораторий и автоматизация многих процессов анализа биоматериала существенно снизили роль субъективного фактора и риск ошибки на аналитическом этапе исследования, но актуальность вопросов отбора, транспортировки и хранения проб, в последние годы возросла [15]. Одним из наиболее частых интегральных результатов нарушений преаналитического этапа, является гемолиз, представляющий собой процесс разрушения клеток крови с выходом их содержимого в плазму или сыворотку крови [12]. Причинами гемолиза могут быть болезни крови, гемолитические яды, а также нарушение технологии отбора проб, транспортировки, хранения и получение сыворотки или плазмы [9]. При этом можно предположить, что гемолитики, в зависимости от своей концентрации, могут вызывать разрушение клеток или только деструкцию мембран с повышением их чувствительности к внешним факторам, в том числе и к механическим во время забора проб крови.

Поэтому целью нашей работы стало изучение степени травматизма клеток крови при её отборе разными методами у телят здоровых и больных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Это исследование было проведено с соблюдением правила гуманного отношения к животным [16]. В условиях комплекса по производству молока в Воронежской области, где содержится круп-

ный рогатый скот голштинской породы, была проведена оценка состояния здоровья телят (n=48) в возрасте 60-72 суток, ранее переболевших бронхопневмонией, в возникновении которой ведущую роль играла ассоциация грамположительных и грамотрицательных бактерий. При их клиническом обследовании не были выявлены симптомы заболеваний, но анализ крови показал наличие у некоторых из них повышенного уровня маркеров эндогенной интоксикации, что стало основанием для формирования двух групп животных: №1 (n=10, контроль) - здоровые и №2 (n=10) – эндотоксикоз. Телята содержались в групповых клетках по 10 голов в специализированном помещении, где температура воздуха была в пределах от 18 до 25°C, а относительная влажность 60-64%. Они находились под постоянным клиническим наблюдением, но более детальное обследование с забором проб крови проводилось в 1 и 3 день опыта.

Задачей первого комплексного обследования была оценка клинического состояния животных и уровня маркеров эндотоксикоза. При этом образцы крови у телят отбирали из яремной вены в вакуумные пробирки IMPROVACUTER с антикоагулянтом (КЗЭДТА) для сохранения её интактного состояния и с активатором свёртывания (SiO₂) для получения сыворотки (Guangzhou Improve Medical Instruments CO, LTD, Китай). Из числа маркеров синдрома эндогенной интоксикации в крови определяли сорбционную способность (ёмкость) эритроцитов (ССЭ), содержание молекул средней массы на длине волны 237 нм (МСМ 237), 254 нм (МСМ 254) и 280 нм (МСМ 280) [1], а также внеэритроцитарный гемоглобин (ВЭГ) гемоглобинцианидным методом [4]. Помимо этого, с помощью гематологического счётчика АВХ Micros 60 СТ/ОТ (Франция) изучали количественный состав лейкоцитов, показатели которого использовали для расчёта лимфоцитарного индекса (L/N) и индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ) [1].

Задачей второго обследования (3 день

опыта) было проведение сравнительной оценки степени травматизма клеток крови при её отборе разными методами. У всех телят, дважды с интервалом 30 минут, из яремной вены отбирали по 5 мл крови. При первом заборе крови использовали иглу «21Gx1; 0,8x25 и вакуумную закрытую систему «Sarstedt Monovette 5 мл, 92x11 мл, с цитратом натрия» (Sarstedt, Германия). Второе взятие крови, в том же объёме, проводили с помощью иглы «G18. 1,2*4,0» (Vogt Medical Vertrieb GmbH, Германия) методом самотёка в пробирку с 0,5 мл 3,8% раствора цитрата натрия. Из всех проб крови отбирали плазму и дважды отмывали эритроциты изотоническим (145,3 ммоль/л) раствором натрия хлорида. Затем готовили взвесь эритроцитов в физиологическом растворе хлорида натрия в соотношении 1:1, которую разливали по 0,1 мл в три пробирки. В пробирку №1 вносили 4,9 мл изотонического раствора хлорида натрия, в №2 и №3 – по 4,9 мл раствор мочевины в концентрации соответственно 149,83 и 299,65 ммоль/л. Содержимое пробирок перемешивали путём 3-х кратного их перевёртывания, а через 5 минут пробы центрифугировали (2000 об/мин, 5 минут) с последующим определением экстинкции надосадочной жидкости при длине волны 540 нм (Shimadzu UV 1700, Япония). Степень гемолиза рассчитывали по формуле:

$$(1) \quad E_k \times 100 / E_{0, \dots}$$

где E_k – экстинкция надосадочной жидкости в пробирке с раствором моче-

вины 299,65 ммоль/л, в которой происходил 100% гемолиз; E_0 – экстинкция надосадочной жидкости в пробирках с изотоническим раствором натрия хлорида или раствором мочевины с концентрацией 149,83 ммоль/л.

Математико-статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Statistica 13.3» (Statsoft). Рассчитывали среднюю арифметическую (M) и среднеквадратическое отклонение (SD), различие между группами (p) оценивали по критерию Стьюдента и считалось достоверным при уровне значимости $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические показатели телят в первый день опыта не имели достоверных межгрупповых различий. Температура тела у них составила $38,9 \pm 0,05$ °C, частота дыхательных движений – $25,5 \pm 0,80$ /мин и пульс – $94,0 \pm 2,50$ уд/мин. Кал густой консистенции светло-коричневого цвета. Дыхание ритмичное, глубокое без патологических шумов.

Показатели крови представлены в таблице 1, из данных которой видно, что у телят из группы №1 они находятся в пределах референсного диапазона здоровых животных [1]. Исключение составляет сорбционная способность эритроцитов, которая у них оказалась выше нормы на 0,8%. В сопоставимой группе (№2) были выше, чем в контроле, уровень соотношения лимфоцитов и нейтрофилов на 31,4%, индекса сдвига лейкоцитов на 9,4%, сорбционной способности эритроцитов на

Таблица 1
Уровень маркеров эндогенной интоксикации у телят (M±SD)

Показатели	Группа 1 (здоровые)	Группа 2 (эндотоксикоз)	Референсный диапазон**
МСМ 237 нм, усл.ед	0,782±0,0667	0,810±0,1185	0,1-1,0
МСМ 254 нм, усл.ед	0,240±0,0948	0,369±0,1201*	0,1-0,3
МСМ 280 нм, усл.ед	0,237±0,0508	0,376±0,0316*	0,1-0,3
ССЭ, %	38,3±3,35	43,5±3,60*	До 38,0
L/N	2,23±0,411	2,93±0,521*	2,0-3,5
ИСЛ	1,27±0,047	1,39±0,035*	0,1-1,5
ВЭГ, г/л	0,32±0,082	0,60±0,123*	-

Примечание – * - $p < 0,01$ в сравнении с здоровыми животными; ** - [1].

12,1%, внеэритроцитарного гемоглобина на 87,5%, содержания молекул средней массы на длине волны 237, 254 и 280 нм, соответственно на 3,6, 56,1 и 58,6%. Несмотря на указанное изменения величин МСМ-237, L/N и ИСЛ они не вышли за пределы референсного диапазона, что указывает на отсутствие у животных инфекции [7, 14]. Таким образом, результаты обследования показали, что телята из группы контроля клинически здоровы. Животные из группы №2 признаны условно здоровыми, т.к., результаты физикальных методов указывают на отсутствие у них патологии, но анализ крови показал наличие обменного эндотоксикоза [1]. Учитывая, что ранее эти телята переболели бронхопневмонией, выявленную эндогенную интоксикацию следует рассматривать как остаточное патологическое явление после перенесенной патологии. Однако, в данном случае эндотоксикоз не является симптомом рецидива инфекции, т.к. не повышен уровень индексов лейкоцитов [7] и содержания молекул средней массы на длине волны 237 нм, образующихся в естественных полостях организма [1].

Из данных таблиц видно, что в крови всегда имеется некоторое количество внеэритроцитарного гемоглобина (табл.1), которое отражает степень внутрисосудистого гемолиза и оценивается в пробах с раствором натрия хлорида (табл.2). В

нашем опыте у здоровых животных это физиологически обусловленный гемолиз, который указывает на наличие пула эритроцитов со сравнительно высоким уровнем проницаемости их мембран. При этом так же подтверждает мнение о том, что клетки, закончившие свой срок жизни, разрушаются не только в печени, селезенке и красном костном мозге, но в кровеносных сосудах [5]. У телят с эндотоксикозом внутрисосудистый гемолиз носит уже патологический характер, т.к., содержание внеэритроцитарного гемоглобина более чем в 2 раза выше, чем у здоровых (табл.1). Из данных таблица 2 видно, что у здоровых животных, метод отбора крови не влиял на уровень физиологически обусловленного гемолиза. У больных он оказался выше контроля при использовании вакуумной система в 2,24 раза, а при заборе крови методом пассивного вытекания – на 73,9%, что указывает на наличие у них эритроцитов с явной или скрытой деструкцией мембран. Столь высокие уровень внутрисосудистого гемолиза создаёт риск получения ложных показателей состава крови, а также имеет патогенетическое значение в развитии гипоксии, гемолитической анемии и коагулопатии [10]. Известно, что от состояния цитоскелета зависит активность трансмембранного переноса мочевины [11, 13], что используется в клинической практике при оценке структуры и функ-

Таблица 2

Степень гемолиза в пробах крови отобранных разными методами (%)

Пробирка, №	Реагент	Вакуумный забор крови		Метод пассивного вытекания крови	
		Группа №1	Группа №2	Группа №1	Группа №2
1	Натрия хлорид, 0,9%	0,24±0,098	0,59±0,221*	0,23±0,126	0,40±0,111*
2	Мочевина, 149,83 ммоль/л	89,4±2,56	98,7±0,68	88,7±2,09	92,0±1,65*
3	Мочевина, 299,65 ммоль/л	100	100	100	100

Примечание – * - $p < 0,01$ в сравнении с показателями животных из группы №1.

ций этих клеток [8]. Внесение во взвесь эритроцитов раствора мочевины в предлитической концентрации (149,83 ммоль/л) активирует её транспорт, и возникающая при этом функциональная нагрузка позволяет визуализировать скрытые риски деструкции мембран. У здоровых животных мочевиновый тест показал, что сопоставимые способы отбора проб крови не оказывают достоверное влияние на цитоскелет эритроцитов, но при использовании вакуумной системы возникает тенденция к увеличению (на 2,3%, $p=0,036$) степени гемолиза. Поэтому в случаях наличия внутри- и внесосудистых гемолитических факторов травматический потенциал вакуумной системы может усиливаться. Данное предположение подтвердили результаты исследования проб крови от больных телят, у которых степень гемолиза в пробах с мочевиной оказалась выше контроля на 3,7% при отборе крови методом самотека и на 10,4% при использовании сопоставимого варианта.

Таким образом, гемолитики, в зависимости от своей концентрации, могут вызывать разрушение клеток или только деструкцию их мембран с изменением трансмембранного переноса и чувствительности к внешним факторам, в том числе и к технологическим. При этом токсические метаболиты, образующиеся при внутренних болезнях, могут быть непосредственной причиной гибели эритроцитов или предрасполагающими факторами механического гемолиза во время забора проб крови. В первом случае возникает внутрисосудистый гемолиз, который, по нашему мнению, следует рассматривать как самостоятельный клинический симптом, требующий фармакологической коррекции. Как правило, случаи механического гемолиза расцениваются как ошибки преаналитического этапа исследований обусловленные нарушением правил забора крови. Однако, при эндотоксикозе риск механического гемолиза во время отбора проб возрастет по причине токсической деструкции мембран эритроцитов.

ВЫВОДЫ

Полученные нами результаты показали, что у здоровых телят отбор проб крови методом пассивного вытекания не оказывает негативное влияние на мембраны эритроцитов. При использовании вакуумных систем так же нет визуальных признаков (гемолиз) деструкции клеток, но происходят изменения их цитоскелета с повышением чувствительности мембран к негативным преаналитическим факторам. У животных с синдромом эндогенной интоксикации имеются явные или скрытые деструкции мембран эритроцитов, которые проявляется повышением содержания внеэритроцитарного гемоглобина, степени физиологического гемолиза, чувствительности к внутри- и внесосудистым гемолитическим факторам. В результате, уже при отборе образцов крови методом пассивного самотека у части животных возникает гемолиз, а при использовании вакуумной системы он наблюдается в большинстве проб. Поэтому при обследовании больных необходимо учитывать высокую вероятность ошибки лабораторной диагностики на преаналитическом этапе, возникающей по причине гемолиза эритроцитов с повышенной чувствительностью к внесосудистым цитолитическим факторам, в том числе к механическим воздействиям во время отбора проб крови. В данном случае следует использовать малотравматичные технологии отбора проб крови и нивелировать другие негативные преаналитические факторы.

THE EFFECT OF THE BLOOD SAMPLING METHOD ON THE RISK OF MECHANICAL HEMOLYSIS OF ERYTHROCYTES IN HEALTHY CALVES AND WITH ENDOGENOUS INTOXICATION SYNDROME. Alekhin Yu.N. – doctor of veterinary sciences, chief researcher, Zhukov M.S. – candidate of veterinary sciences, senior researcher, Nikonenko G.V. – junior research (All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy)

ABSTRACT

In the conditions of the milk production complex in the Voronezh region, where Holstein cattle are kept, studies were conducted

to study the degree of injury to blood cells during its selection by various methods in healthy calves and with endogenous intoxication syndrome. In healthy animals, blood sampling by passive leakage does not affect the membranes of erythrocytes. When using vacuum systems, there are no visual signs (hemolysis) of cell destruction, but changes in their cytoskeleton occur with an increase in the sensitivity of membranes to negative pre-analytical factors. In animals with endogenous intoxication syndrome, there are explicit or hidden destruction of erythrocyte membranes, which are manifested by an increase in the content of extra-erythrocyte hemoglobin, the degree of physiological hemolysis, sensitivity to intra- and extravascular hemolytic factors. As a result, already when selecting blood samples by passive gravity, there is a risk of hemolysis, and when using a vacuum system, it is observed in most samples. Therefore, when examining sick animals, it is necessary to take into account the high probability of laboratory diagnostic error at the pre-analytical stage that occurs due to hemolysis of erythrocytes with hypersensitivity to extravascular cytolytic factors, including mechanical effects during blood sampling.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- 1.Алехин Ю.Н. Эндогенные интоксикации у животных и их диагностика (Методические рекомендации) / Ю.Н. Алехин. – Воронеж, 2000. – 28 с.
- 2.Ковязина Н.А. От теории к практике. Роль контроля качества аналитического этапа исследований в повышении клинической информативности лабораторных тестов / Ковязина Н.А., Алхутова Н.А., Бардышева Н.А., Зыбина Н.Н., Калинина Н.М. // Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (3): 188-192.
- 3.Меньшиков В.В. Лабораторный специалист и клиническая интерпретация лабораторных результатов // Клиническая лабораторная диагностика.- 2014, №5.- С. 60-64
- 4.Тонкошкурова О.А. Определение концентрации внеэритроцитарного гемоглобина плазмы (сыворотки) крови гемоглобинцианидным методом / О.А. Тонкошкурова, А.И. Дмитриев, Р.Е. Дмитриева // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. – №2. – С. 21-22.
- 5.Шиффман Ф. Дж. Патофизиология крови / Ф. Дж. Шиффман. Пер. с англ. СПб.: Издательство БИНОМ — Невский Диалект, 2000. – 448 с.
- 6.Carraro P, Plebani M. Errors in a Stat Laboratory: types and frequency 10 years later. *Clinical Chemistry* 2007, 53(7): 1338–1342.
- 7.Combination of white blood cell count and left shift level real-timely reflects a course of bacterial infection / N. Ishimine, T. Honda, A. Yoshizawa, et al. // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2013. – Vol. 27. – P. 407-411. DOI:10.1002/jcla.21619.
- 8.Contreras-Puentes N. Proteomic Approaches for the Mapping of Human Erythrocyte Membrane Proteins / N. Contreras-Puentes // *J Hematol Blood Disord.* – 2019. – Vol. 5(1). – P. 102.
- 9.Hemolysis-free blood plasma separation / J.H. Son, S.H. Lee, S. Hong et al. // *Lab Chip.* – 2014. – Vol. 14(13). – P. 2287-2292. DOI:10.1039/c4lc00149d.
- 10.Kato G.J. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease / G.J. Kato, M.H. Steinberg, M.T. Gladwin // *J. Clin. Investig.* – 2017. – Vol. 127. – P. 750-760. DOI:10.1172/JCI89741.
- 11.Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein / B. Olives, M.-G. Mattei, M. Huet et al. // *J. Biol. Chem.* - 1995. - Vol. 270 (26). – P. 15607-15610. DOI:10.1074/jbc.270.26.15607.
- 12.Koseoglu M. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters / M. Koseoglu, A. Hur, A. Atay, S. Cuhadar // *Biochem Med (Zagreb).* – 2011. – Vol. 21(1). – P. 79-85. DOI: 10.11613/bm.2011.015.
- 13.Mohandas N. New insights into function of red cell membrane proteins and their interaction with spectrin-based membrane skeleton / Mohandas N., An X. // *Transfus. Clin. Biol.* – 2006. – Vol. 13. – P. 29-30. DOI: 10.1016/j.traccli.2006.02.017.
- 14.Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection / T. Honda, T. Uehara, G. Matsumoto, S. Arai, M. Sugano // *Clin Chim Acta.* – 2016. – №457. – P. 46-53. DOI:10.1016/j.cca.2016.03.017.
- 15.Preanalytical challenges – time for solutions / G. Lippi, F. Betsou, J. Cadamuro et al. // *Clin Chem Lab Med.* 2019. – Vol. 57. – P. 974-981. DOI:10.1515/cclm-2018-1334.
- 16.The European Parliament and the Council