

УДК 577.114 : 57.084.1

Д. С. Запрянова, Т. Г. Мирчева, Т. Г. Динев

Тракийский университет, Стара Загора, Болгария

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ НА ДИНАМИКУ КОНЦЕНТРАЦИИ САХАРА В КРОВИ КОЗ

Досліджено динаміку вмісту глюкози в крові кіз (у момент відбору проби, через 3, 6 та 24 години) під впливом чотирьох антикоагулянтів (розчини фториду та цитрату натрію, гепарину, комплексу III). При тривалому зберіганні проб крові відмічено зниження рівня глюкози, найбільше виражене при застосуванні цитрату натрію.

Dynamics of the content in the goats' blood (at the instant the sample was taken, and then after 3, 6 and 24 hours) under influence of 4 anticoagulants (sodium fluoride, sodium citrate, heparin and complexon III) were studied. Long term storage of the blood samples resulted in the glucose level decrease. It was mostly pronounced under the sodium citrate treatment.

Введение

Определение концентрации сахара в крови является интегральным компонентом рутинной клинической диагностики. Несмотря на развитие аналитических технологий, интерпретация данных зависит от ряда факторов, например, стабильности исследованного показателя во время самого исследования. Несмотря на многочисленные публикации об условиях взятия и сохранения пробы до момента ее определения, зачастую данные получаются противоречивыми. Ветеринарный биохимик находится в более затрудненном положении по сравнению с медицинским биохимиком из-за меньшей доступности информации о видовых различиях у отдельных видов животных, а также того, что в торговой сети имеются только реактивы, приготовленные для клинических исследований человека.

Исследования еще более усложняются, когда пробы берут в отдаленных районах и транспортируют в лабораторию. В литературе встречаются данные относительно стабильности концентрации глюкозы у некоторых видов животных, особенно у собак и кошек [1–4; 12], однако данные о содержании глюкозы у коз в доступной нам литературе отсутствуют. Кроме этого, мы не нашли информации относительно влияния на различные антикоагулянты и стабильность глюкозы в разные периоды хранения препаратов у животных, в частности у коз.

Цель нашего исследования – определить, до какой степени концентрация сахара в крови коз зависит от использованного антикоагулянта и какие факторы воздействуют на этот уровень во время хранения проб.

Материал и методы исследований

Исследования проводились с 6 клинически здоровыми козами Болгарской молочной породы. Отобраны нелактующие (недойные) животные живым весом $38,6 \pm 3,5$ кг. Перед проведением исследований провели дегельминтизацию и удаление эктопаразитов у экспериментальных животных. Задействованные в эксперименте козы содержались в одинаковых условиях на сходном рационе (пищу и воду давали *ad libitum*). Пробы крови были взяты от каждого животного через пункцию на *v. jugularis*, перед кормлением. Концентрация сахара исследована в свежей крови (до двух часов от момента отбора) ортотолуидиновым методом. Глюкозу определяли в момент взятия, через 3, 6 и 24 часа. Кровь хранили в холодильных установках при

© Д. С. Запрянова, Т. Г. Мирчева, Т. Г. Динев, 2007

216

температуре до +4°C. Стабилизация крови проводится предварительным добавлением в пробирку для отбора крови противосвертывающего средства при тщательном размешивании. Антикоагулянты, которые использовались для исследований – фторид натрия, раствор гепарина, комплексон III и цитрат натрия.

1. Фторид натрия – 20 мг NaF на 10 мл крови.
2. Раствор комплексона III – 25 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na_2 ЭДТА, Complexon III), 225 г дистиллированной воды и 25 мл 36 % формалина; к 10 мл крови добавляем 0,25 мл от этого раствора.
3. Гепарин – Heparin “Biochemic” 25000 U/U: на 2 мл крови необходимо 0,01 мл 1 % гепаринового раствора или 10 мг сухого вещества.
4. Цитрат натрия – 40 мг $C_6H_7O_7Na$ на 1 мл; фторид натрия – 20 мг на 10 мл крови; определение концентрации сахара в крови проводится ортотолуидиновым методом [8].

Для определения статистической достоверности различий между выборочными средними использован Tukey test (программа StatMost for Windows (DataMost Co., USA, 1994)).

Результаты и их обсуждение

Содержание глюкозы в момент отбора крови максимально (табл.) для антикоагулянта NaF , значительно ниже (на 30 %) для цитрата натрия, гепарина (на 20 %) и комплексона III (на 13 %). Содержание глюкозы понижается на третий час хранения пробы для всех использованных антикоагулянтов. Эта тенденция сохраняется и к шестому часу для всех антикоагулянтов (на 33–40 %). Через сутки содержание глюкозы повышается приблизительно до уровня третьего часа хранения пробы.

Таблица

**Концентрация глюкозы (ммоль/л) в крови коз,
измеренная в различные периоды для различных антикоагулянтов**

Время после взятия пробы крови, часов	Антикоагулянт			
	фторид натрия	комплексон III	гепарин	цитрат натрия
0	2,96 ± 0,05	2,59 ± 0,11 ¹	2,37 ± 0,07 ^{1,2}	2,10 ± 0,13 ^{1,2,3}
3	2,34 ± 0,09	2,21 ± 0,08	1,96 ± 0,07 ^{1,2}	1,65 ± 0,09 ^{1,2,3}
6	1,77 ± 0,05	1,88 ± 0,07	1,58 ± 0,05 ^{1,2}	1,38 ± 0,02 ^{1,2,3}
24	2,44 ± 0,07	2,18 ± 0,07 ¹	1,91 ± 0,07 ^{1,2}	1,75 ± 0,12 ^{1,2}

Примечания: статистически достоверная разница между измеренными показателями при $p < 0,05$:
¹ – по сравнению с 0 часов, ² – с 3 часами, ³ – по сравнению с 6 часами.

Использование цитрата натрия в нашем эксперименте привело к статистически достоверному ($p < 0,05$) снижению изучаемого показателя по сравнению с другими антикоагулянтами через 3 и 6 часов после отбора пробы. Достоверные различия между содержанием глюкозы в начальный момент времени и через 24 часа были установлены только при использовании комплексона III и фторида натрия. Содержание глюкозы через 24 часа после отбора пробы находится на одном уровне при использовании гепарина и цитрата натрия. При стабилизации крови гепарином уровень сахара достоверно снижался ($p < 0,05$) по сравнению с результатами, полученными с фторидом натрия и комплексоном III.

При использовании Na_2 ЭДТА как антикоагулянта в пробах крови для определения глюкозы отмечено, что существует статистически достоверная ($p < 0,05$) разница в показателях сахара крови от момента отбора до периода 24-го часа только для фторида натрия в те же периоды времени. Самые большие различия

зарегистрированы при использовании цитрата натрия. При использовании комплексона III в момент отбора крови содержание сахара в крови достоверно ниже ($p < 0,05$), чем при использовании *NaF*. Для гепарина показатели достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем для *NaF* и комплексона III. При использовании цитрата натрия отмечен самый низкий уровень глюкозы в крови относительно других антикоагулянтов. Через три часа после отбора пробы зарегистрировано достоверно более низкое ($p < 0,05$) содержание глюкозы по сравнению с моментом отбора пробы. Через сутки после отбора проб для четырех различных антикоагулянтов содержание сахара в крови коз снижается ($p < 0,05$) по сравнению с данными в момент отбора крови, через 6 часов, но не через 3 часа после взятия проб. В современных условиях определение глюкозы может проводиться сразу же после ее взятия глюкомером, но это измерение дорогостоящее, требует большой ответственности лаборанта или ветврача. Возможны ошибки в результате неправильного использования инструкций по работе, калибрования стандартных проб, недостаточной очистки аппарата, некачественных контрольных материалов, хранения реагентов или проб.

Обычно под термином “сахар крови” подразумевается именно содержание глюкозы. В крови содержатся также другие сахара (фруктоза, галактоза, мальтоза, пентозы и др.), но их количество при нормальных физиологических условиях очень низко, оно практически не оказывает влияния на концентрацию общего сахара крови. Используются и другие методы диагностики, основанные на редуцирующих свойствах глюкозы, энзимные и колориметрические методы. Чаще используется (до применения энзимных методов) ортотолуидиновый метод. Концентрация глюкозы у коз по этому методу составляет 2,22–3,33 ммоль/л. Выведение белка из крови проводится с применением трихлоруксусной кислоты, при условии, что этот процесс начнется не позднее чем через час после взятия крови. Депротеинизированная кровь хранится несколько дней [4].

В некоторых лабораторных опытах (например, при определении глюкозы) лучше брать кровь у животного непосредственно перед исследованием. Когда это невозможно, исследования могут быть сделаны и на стабилизированной противосвертывающим средством крови. При хранении крови до 24 часов она должна находиться в холодильнике при температуре около +4°C [4]. Для более продолжительного времени кровяные пробы сохраняются при температуре ниже –10°C. Как антикоагулянт крови чаще используется 1% гепариновый раствор, растворы комплексона III, цитрата натрия, оксалата натрия, оксалата калия, фторида натрия, гирудина. Для нашего исследования мы выбрали четыре самых употребляемых противосвертывающих средства – гепарин, комплексон III, цитрат и фторид натрия.

В гликолитической цепи энзим энзолаза чувствителен к ингибирующему действию фтора, так что при использовании фторида натрия берется во внимание то, что это основной антикоагулянт и ингибитор распада глюкозы. Таким образом, как самый подходящий антикоагулянт для определения уровня глюкозы в крови должен использоваться фторид натрия. По мнению некоторых авторов [9], подходящими противосвертывающими средствами являются гепариновый раствор и цитрат натрия. Другие авторы применяют для этой цели цитрат натрия, оксалат аммония и оксалат калия [10].

При определении концентрации сахара в крови коз по ортотолуидиновому методу некоторые авторы [6] советуют использовать ЭДТА как антикоагулянт. По мнению других источников [5; 11], при исследовании биохимических показателей крови коз, в том числе и глюкозы, самыми подходящими антикоагулянтами считаются гепарин и $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). В нашем исследовании при употреблении цитрата натрия наблюдаются

достоверно более низкие ($p < 0,05$) показатели по сравнению с использованием других антикоагулянтов в начальный момент, на третьем и шестом часу. При использовании всех исследованных антикоагулянтов не обнаружено больших различий между третьим и двадцать четвертым часом. Показатели глюкозы через сутки более низкие ($p < 0,05$) и приблизительно одинаковые при использовании двух антикоагулянтов (гепарина и цитрата натрия) по сравнению с данными при использовании фторида натрия и комплексона III. Поэтому при стабилизации крови гепарином нужно иметь в виду, что уровень сахара, хоть и приблизительно одинаков, но все же ниже ($p < 0,05$) по сравнению с результатами, полученными с фторидом натрия и комплексоном III.

Выводы

При использовании NaF как антикоагулянта в начальный момент времени уровень сахара в крови у коз достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с показателями, полученными после использования других трех противосвертывающих средств. При продолжительном хранении проб крови отмечено понижение уровня глюкозы, наиболее выраженное при использовании цитрата натрия. Когда используется этот антикоагулянт, видны статистически более низкие ($p < 0,05$) уровни сахара в крови по сравнению с другими противосвертывающими средствами. Концентрация сахара в крови уменьшается с течением времени (через 3, 6 и 24 часа после отбора проб). Самое большое снижение показателя глюкозы в крови отмечено при использовании цитрата натрия как противосвертывающего средства.

Библиографические ссылки

1. **Creatine kinase** in dog plasma: preanalytical factors of variation, reference values and diagnostic significance / M. Aktas, D. Auguste, D. Concordet et al. // Res. in Vet. Sci. – 1994. – Vol. 56. – P. 30–36.
2. **Effects** of storage time on chemistry results from canine whole blood, heparinized whole blood, serum and heparinized plasma / S. I. Thoresen, G. N. Havre, H. Morberg, P. Mowinckel // Vet. Clin. Pathol. – 1992. – Vol. 21, N 3. – P. 88–94.
3. **Fraser C. G.** Short-term biological variation of plasma analytes in renal disease / C. G. Fraser, P. Williams // Clin. Chem. – 1983. – Vol. 29, N 3. – P. 508–510.
4. **Ibrishimov N.** Klinichno-laboratorni izsledvania vav veterinarnata medicina / N. Ibrishimov, H. Lalov. – Bulgaria: Zemizdat, 1974.
5. **Jones D. G.** Stability and storage characteristics of enzymes in cattle blood // Research of Veterinary Science. – 1985. – Vol. 38. – P. 301–306.
6. **Nazifi S.** Biochemical and cytologic properties of blood and peritoneal fluid in clinically normal adult goats / S. Nazifi, S. Dehghani, H. R. Gheisari // Veterinarski Arhiv. (Iran). – 1999. – Vol. 69, N 4. – P. 221–227.
7. **Plasma** versus serum: specific differences in biochemical analyte values / T. C. Hrubec, J. M. Whichard, C. T. Larsen, F. W. Pierson // Journal of avian medicine and surgery. – Vol. 16, N 2. – P. 101–105.
8. **Popov C.** Practical book in biochemistry / C. Popov, E. Dishlyanova. – Sofia: Zemizdat, 1993.
9. **Removal** of blood from laboratory mammals and birds / D. B. Morton, D. Abbot et al. // Laboratory animals. – 1993. – Vol. 27.
10. **Ryan W. L.** Simulatet human platelets from red blood ceels. – US Patent Issued 5008201. – 1991.
11. **Taiwo V. O.** Haematology, plasma, whole blood and biochemical values of clinically healthy captive-reared grey duiker and west african dwarf sheep and goats / V. O. Taiwo, A. O. Ogunsanmi // Izrael Vet. Med. Ass. – 2003. – Vol. 58, N 1.
12. **The effects** of haemolysis on serum chemistry measurement in poultry / J. R. Andreasen, C. B. Andreasen, A. B. Sonn, D. C. Robeson // Avian Pathol. – 1996. – Vol. 25, N 3. – P. 519–536.

Надійшла до редколегії 14.06.2007