

**АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»  
СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2»**

*На правах рукописи*

**ПИСКУНОВ**

**ДМИТРИЙ ПАВЛОВИЧ**

**ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТНОГО ФАКТОРА НА КАЧЕСТВО ПРОВЕДЕНИЯ  
ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**3.1.31 – геронтология и гериатрия**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
доцент Пушкин Александр Сергеевич

**Санкт-Петербург – 2022**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА У ЛИЦ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	14
1.1 Флеботомия .....	16
1.2 Выбор пробирки для взятия образцов. ....	21
1.3 Транспортировка и хранение образцов. ....	25
1.4 Интерференция: гемолиз, липемия, иктеричность.....	33
1.5 Влияние метаболизма клеток на результаты анализа.....	39
1.6 Влияние гендерных различий на результаты анализа .....	40
1.7 Влияние рациона питания на результаты исследований.....	41
1.8 Влияние физической активности на результаты исследований .....	48
1.9 Влияние биоритмов человека на результаты исследований .....	49
Заключение .....	51
ГЛАВА 2 МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	52
2.1 Материал для исследований .....	52
2.2 Методология и методы исследования при оценке влияния возрастного фактора на стабильность биологических веществ в крови человека. ....	54
2.2.1 Исследование изменений уровня биохимических веществ крови при различных условиях хранения биоматериала с учетом клинической значимости (RCV). ....	54
2.3 Методология и методы исследования оценки влияния эндогенных факторов (характеристик клеток крови) на стабильность концентрации глюкозы в различных возрастных группах. ....	60
2.4 Оценка влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб, поступающих в лабораторию .....	66
2.4.1. Анализ количества гемолизированных проб аппаратным и визуальным методом для определения приемлемого метода детекции. ....	66
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	71
3.1. Результаты исследования оценки влияния возрастного фактора на стабильность биологических веществ в венозной крови с учетом	

температурного и временного режимов хранения образцов проведено в два этапа	71
3.1.2. Результаты исследования влияния возраста человека на уровень биохимических веществ в крови при хранении биоматериала, анализ клинической значимости (RCV).....	77
3.2. Результаты оценки влияния эндогенных факторов на уровень концентрации биологических веществ в пробах крови людей различных возрастных групп. ....	78
3.3. Оценка влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб, поступающих в лабораторию. ....	80
3.3.1. Анализ количества гемолизированных проб аппаратным и визуальным методом для определения приемлемого метода детекции. ....	80
3.3.2. Исследование влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб. ....	89
3.3.3. Ретроспективная оценка влияния возраста на количество проб с критическими значениями уровня калия (K <sup>+</sup> ) и натрия (Na <sup>+</sup> ) как одних из наиболее чувствительных к гемолизу исследуемых веществ. ....	90
3.3.4. Оценка эффективности разработанных методических рекомендаций по индивидуальному подбору игл для венепункции у лиц пожилого и старческого возраста. ....	91
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	94
4.1. Оценка влияния возрастного фактора на стабильность биологических веществ в венозной крови с учетом температурного и временного режимов хранения образцов проведено в два этапа.....	94
4.1.1 Исследование изменений уровня биохимических веществ крови при различных условиях хранения биоматериала с учетом клинической значимости (RCV).....	94
4.1.2 Исследование влияния возраста человека на уровень биохимических веществ в крови при хранении биоматериала, анализ клинической значимости (RCV).....	95
4.2. Оценка влияния эндогенных факторов (характеристик клеток крови) на стабильность концентрации глюкозы в различных возрастных группах .....	96
4.3. Оценка влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб, поступающих в лабораторию. ....	98

4.3.1. Анализ количества гемолизированных проб аппаратным и визуальным методом для определения приемлемого метода детекции .....	98
4.3.2. Исследование влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб. ....	99
4.3.3. Ретроспективная оценка влияния возраста на количество проб с критическими значениями уровня калия (K <sup>+</sup> ) и натрия (Na <sup>+</sup> ). ....	100
4.3.4. Оценка эффективности разработанных методических рекомендаций по индивидуальному подбору игл для венопункции у лиц пожилого и старческого возраста .....	100
ВЫВОДЫ .....	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ: .....	110

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность исследования**

Геронтологические аспекты преаналитического этапа биохимических исследований важны для понимания ключевых закономерностей биологических процессов, влияющих на качество диагностики и достоверность полученных результатов.

Частое коморбидное состояние лиц старшей возрастной группы обуславливает сложности дифференциальной диагностики многих заболеваний. Возникает необходимость проведения целого ряда исследований. Исследования биохимических показателей крови в значительной степени оказывают влияние на принятие клинических решений [Lippi G., Plebani M., 2015]. С возрастанием важности персонализированной медицины именно исследования биологических показателей имеют жизненно важное значение для диагностики, прогнозирования и терапевтического мониторинга заболеваний человека [Lippi G., Bassi A., Vovo C., 2016]. Так, результаты биохимического анализа крови необходимы для оценки состояния различных биосистем организма, а недостоверные результаты могут привести к ошибкам лечения. Несмотря на успехи, которые позволили достичь более высокого уровня качества диагностического обследования, многие проблемы по-прежнему остаются нерешенными, особенно на преаналитическом этапе исследования крови: от получения биологического материала, его хранения и до его транспортировки в лаборатории [Lippi G., Bowen R., Adcock D. M., 2016].

Необходимо учитывать тот факт, что возраст человека, являясь основополагающим эндогенным биологическим фактором, а также условия транспортировки и хранения биологических образцов по-разному влияют на достоверность результата исследования. В 2021 году Европейская федерация

клинической химии и лабораторной медицины (EFLM) опубликовала рекомендации по типам образцов и биологической стабильности в различных условиях, однако влияние возрастного фактора там практически не упоминается [Cornes M. et al., 2021].

Работа по сбору данных о влиянии биологических факторов на преаналитический этап проводится во многих странах Европейского союза [Cornes M. et al., 2016]. Также разрабатываются и принимаются соответствующие национальные руководящие принципы, однако геронтологические аспекты в данных руководствах не обозначаются, что не дает полного представления об управлении качеством преаналитического этапа.

Свой вклад в проблему качества преаналитического этапа вносит и централизация исследований, при которой биологические образцы транспортируются на дальние расстояния и хранятся длительное время перед началом аналитического этапа. Это стало особенно актуально в условиях пандемии COVID-19 по причине возрастающего потока образцов, транспортируемых для исследований в централизованные учреждения.

В настоящее время в России 15% населения составляют лица 65 лет и старше [Russia - Age distribution 2019, ]. Численность данной категории населения имеет положительную динамику роста на протяжении десятилетия. Согласно докладу, выпущенному Всемирной организацией здравоохранения (30.09.2015), ожидается удвоение числа пожилых людей к 2050 г. В связи с этим все больше возрастает биологическая роль возраста как одного из ведущих факторов, влияющих на качество и достоверность получаемого результата лабораторного исследования. Однако в доступной литературе отсутствует однозначное мнение о влиянии возрастного фактора на стабильность биохимических веществ и его влиянии на преаналитический этап лабораторного исследования, что представляет научный и практический интерес.

**Цель исследования** – оценка влияния возрастного фактора на качество преаналитического этапа исследований биологических веществ в венозной крови человека.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие **задачи исследования**:

1. Изучить влияние возрастного фактора на биологическую стабильность веществ крови при биохимическом анализе с учетом временного и температурного режимов хранения образцов (экзогенных факторов).

2. Выявить влияние эндогенных факторов (характеристик клеток крови) на стабильность концентрации исследуемых веществ в различных возрастных группах.

3. Оценить влияние возраста человека на долю гемолизированных образцов крови в рутинной практике клинико-диагностической лаборатории.

4. Определить экономическую эффективность внедрения учета влияния возраста при проведении преаналитического этапа у лиц пожилого и старческого возраста.

5. Разработать и внедрить методические рекомендации по проведению преаналитического этапа биохимических исследований венозной крови у людей пожилого и старческого возраста в практическую работу.

### **Научная новизна исследования**

В рамках диссертационной работы впервые рассмотрено влияние возрастного фактора на качество проведения преаналитического этапа исследований биологических веществ в венозной крови человека, что позволит существенно дополнить представления о данном этапе исследования.

Впервые установлено, что клинически значимые изменения уровня глюкозы (RCV 95%) у лиц среднего и пожилого возраста наступают при

хранении проб в течение 24 ч при температуре 4°C, в то время как у людей старческого возраста клинически значимых изменений в тех же условиях хранения не наступает.

Впервые выявлено, что клинически значимое изменение (увеличение) уровня калия у лиц старческого возраста наступает при хранении проб в течение 24 ч при температуре 4°C, однако у лиц среднего и пожилого возраста клинически значимых изменений уровня калия не происходит в аналогичных условиях хранения образцов.

Доказано, что у людей в возрасте от 75 лет и старше гемолизированных проб больше в среднем на 51,5% по сравнению с людьми среднего возраста, что связано с совокупностью факторов: более сложной процедурой венепункции у лиц старческого возраста ввиду более хрупких вен, коморбидности этой группы людей. Учет индивидуальных особенностей вен людей старшей возрастной группы и подбор игл способны уменьшить количество гемолизированных проб.

Впервые был проведен экономический анализ финансовых потерь при выбраковке биологических образцов в процессе обследования людей старших возрастных групп. Была показана необходимость внедрения методических рекомендаций по подбору игл для венепункции у лиц старших возрастных групп. Указанное внедрение позволяет сократить затраты на расходные материалы для флеботомии, снизить болевые ощущения у пациента, уменьшить риски заражения пациента и персонала возбудителями гемоконтактных инфекций, повысить качество взятого биологического материала, что минимизирует искажение результата исследования.

### **Практическая значимость результатов исследования**



Проведенное исследование впервые показало статистически значимые отличия смещения уровня глюкозы в крови у пациентов разных возрастов при длительном хранении образцов. Так, у людей в возрасте от 35 до 59 лет смещение уровня глюкозы составляет в среднем 17% при хранении образцов при  $t^{\circ} = 4^{\circ}\text{C}$  в течении 24 часов. В то же время, у людей в возрасте от 75 лет и старше смещение уровня глюкозы составляет 9,4% при аналогичных условиях хранения образцов; кроме того, показано значение влияния биосистемы клеток крови на изменение уровня глюкозы в образце. В совокупности эти данные позволили создать программу для ЭВМ с функцией прогнозирования уменьшения уровня глюкозы в биологическом образце в зависимости от возраста в процессе хранения при  $t^{\circ} = 4^{\circ}\text{C}$ . Информация о величине смещения уровня глюкозы в биологическом образце необходима для принятия решения о достоверности получаемого результата с точки зрения клинически значимой разницы уровня показателя. Данный метод следует принимать во внимание в условиях со сложной логистикой, где нет возможности провести аналитический этап исследований в ближайшие минуты после взятия крови.

В ходе работы были получены данные о большем количестве гемолизированных проб у лиц старше 75 лет по сравнению с лицами средней возрастной группы. Так, у лиц в возрасте от 21 года до 34 лет гемолизированные образцы составляют в среднем 0,85%, в то время как у лиц старческого возраста количество таких проб составляет 1,75%. Также разработана и внедрена методика по индивидуальному подбору игл для венепункции у лиц пожилого и старческого возраста, позволяющая снизить количество гемолизированных проб у людей старших возрастных групп. Применение методики позволило сократить количество гемолизированных проб на 40,3%

Внедрение разработанной методики венепункции у лиц пожилого и старческого возраста позволило достичь экономической выгоды в среднем на 1,2% в год за счет сокращения использования расходных материалов при

повторных процедурах флеботомии в связи с некачественными образцами крови.

Таким образом, полученные результаты исследования вносят вклад в улучшение качества преаналитического этапа биохимических исследований биологических образцов людей пожилого и старческого возраста.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. У лиц среднего, пожилого и старческого возраста продолжительность и температура хранения образцов сыворотки крови оказывают клинически значимое влияние на исследуемые вещества при температурах от 4°C до 30°C и времени хранения от 4 ч до 72 ч. Клинически значимое изменение (уменьшение) уровня глюкозы составляет 17,09% у лиц среднего возраста и наступает при хранении проб в течение 24 ч при температуре 4°C, в то время как у людей старческого возраста изменение (уменьшение) уровня глюкозы составляет 9,4% при аналогичных условиях хранения, что клинически значимым не является (RCV 95% -17%). В то же время, клинически значимое изменение (увеличение) уровня калия у лиц старческого возраста составляет 13,8% (RCV 95% - 13,6%) при хранении проб в течение 24 ч при температуре 4°C, однако у лиц среднего и пожилого возраста клинически значимых изменений уровня калия не наступает в аналогичных условиях хранения образцов.

2. Возраст является основополагающим эндогенным фактором, влияющим на химический состав биологического образца при его хранении. У людей старческого возраста в образцах крови уровень глюкозы на 45% выше при хранении в течение 24 ч при температуре 4°C по сравнению с показателями у лиц среднего возраста.

3. У лиц старческого возраста количество гемолизированных биологических проб больше в среднем на 48,5% по сравнению с аналогичным показателем у лиц среднего возраста. При этом отличие

в количестве гемолизированных образцов у лиц пожилого возраста по сравнению со средним возрастом статистически не значимо.

4. Применение индивидуального подбора игл для венепункции у лиц пожилого и старческого возраста приводит к уменьшению затрат на расходные материалы при назначении повторных исследований и снижению количества флеботомий в связи с гемолизом образцов сыворотки крови.

#### **Степень достоверности и апробация и результатов**

Достоверность и обоснованность полученных результатов научной работы обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объемом выборок изученного материала, достаточным количеством проведенных исследований эндогенных и экзогенных факторов влияния на преаналитический этап и адекватным статистическим анализом полученных данных. Сформированные выборки были репрезентативны по количеству и могли использоваться для решения поставленных задач. Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на Всероссийском научном форуме студентов и молодых ученых «Студенческая наука 2018», на Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Профессиональная стандартизация в подготовке и деятельности специалистов со средним медицинским образованием», на IV Российском конгрессе лабораторной медицины, на международном научном конгрессе «Многопрофильная клиника XXI века. Инновации в медицине – 2019», на междисциплинарной конференции с международным участием «Критические значения лабораторных показателей неотложных состояний пациентов», на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины и геронтологии – 2022».

Также за данную работу присуждена победа на конкурсе грантов для студентов, аспирантов ВУЗов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

## **Внедрение результатов исследования в практику**

Отдельные положения и выводы диссертации учтены при организации и проведении преаналитического этапа биохимических исследований у пациентов пожилого и старческого возраста в СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2». Так, внедрение внутреннего аудита качества преаналитического этапа у пациентов пожилого и старческого возраста в лаборатории СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2» способствовало уменьшению количества гемолизированных проб, повышению качества выполнения венепункции и, как следствие, большей экономической эффективности.

## **Личный вклад автора**

Автором определены цель и задачи исследования, проанализирована отечественная и зарубежная литература по изучаемой проблеме, разработаны методические подходы к проведению исследования. Автор производил сбор данных, их обработку, а также обобщение полученных материалов. Автором подготовлены публикации по выполненной работе, также написана и оформлена рукопись.

## **Связь с научно-исследовательской работой института**

Диссертационная работа выполнена по основному плану научно-исследовательской работы Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

## **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, включая 6 опубликованных в изданиях из перечня рецензируемых научных журналов Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки Российской Федерации, в том числе 1 статья в издании, индексируемом базой данных Scopus. Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2021669975 «Программа для учета влияния

возрастного эндогенного фактора на стабильность биохимического анализа – глюкозы».

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания результатов собственных исследований, выводов, библиографического указателя литературы, содержащего ссылки на 126 работ, в том числе 6 на русском и 120 на английском языках. Работа иллюстрирована 5 рисунками и 22 таблицами.

## **ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА У ЛИЦ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

Со временем все больше возрастает роль лабораторной диагностики ввиду более чувствительных показателей состояния человека, относительно его субъективных ощущений. Так, диагностика *in vitro* стала незаменимым инструментом в клинической практике для диагностики и мониторинга заболеваний [Raman G., Avendano E. E., Chen M., 2015]. Согласно исследованиям, клиничко-лабораторные показатели несут до 70% необходимой информации для принятия клинического решения [Rohr U-P. et al., 2016]. По этой причине важные решения в отношении ведения пациента могут опираться на небольшие изменения результатов исследований биологических показателей крови. Таким образом, необходимо контролировать весь процесс проведения исследования, в том числе и факторы влияния возраста на анализируемые пробы крови.

Согласно ГОСТ Р 53079.4 – 2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований»: «Достоверность отражения в результатах лабораторных исследований состояния внутренней среды пациента, содержания искомым компонентов биологических материалов в значительной степени зависят от условий, в которых пациент находился в период, предшествовавший взятию у него образца биоматериала, от условий и процедур забора образца, его первичной обработки и транспортировки в лабораторию, то есть от факторов преаналитического этапа лабораторного исследования». Преаналитическая фаза, включающая назначение тестов, взятие образцов, их хранение и транспортировку, а также подготовку образцов перед тестированием, на данный момент является критически важным аспектом для обеспечения качества процесса исследования биологических образцов. [Lippi G. et al.,

2015]. Многими авторами отмечается, что преаналитические ошибки значительно влияют на достоверность полученных результатов тестов, поэтому оказывают большее влияние на последующее лечение пациентов [Lippi G., Cadamuro J., 2017]. Ведущие факторы, способствующие повышению количества ошибок на преаналитическом этапе, включают отсутствие стандартизации различных методов сбора образцов, обработки, транспортировки и подготовке образцов, а также пренебрежение имеющимися руководствами или рекомендациями [Simundic A-M., 2014]. Для обеспечения качественного выполнения процедур преаналитического этапа в каждом ЛПУ необходимо разработать внутренний стандарт преаналитического этапа и обеспечить его выполнение средним медицинским персоналом всех лечебных учреждений откуда доставляется биологический материал [Simundic A-M., 2014].

Важным критерием работы лаборатории является время оборота теста «turn around time» (TAT) который является одним из параметров для измерения производительности любой лаборатории. Существует разница в толковании термина «TAT» среди клиницистов и врачей лаборатории. Для лабораторного персонала TAT включает время от получения образца в лаборатории до составления отчета. С другой стороны, врачи клиницисты рассматривают TAT с момента подачи заявки до получения отчета [Steindel S. J., Howanitz P. J., 2001]. Многие описывают термин «терапевтическая TAT», то есть время от заказа теста до времени, когда решение о лечении принимается на основании результата теста. Таким образом, «терапевтический TAT» включает три фазы любого лабораторного теста: преаналитический, аналитический и постаналитический этапы. Причины задержек в TAT чаще всего связаны с преаналитической и постаналитической фазами. Наиболее распространенные причины задержек тестирования связаны со сбором и транспортировкой образцов, прерыванием рутинного

тестирования для срочных анализов и передачей результатов [Steindel S. J., Howanitz P. J., 2001].

## 1.1 Флеботомия

Венопункция является одной из наиболее часто выполняемых медицинских процедур в здравоохранении [Ialongo, Bernardini, 2016]. В зависимости от страны взятие крови может выполняться сертифицированными флеботомистами, медсестрами, врачами и даже административным персоналом [Simundic A-M. et al., 2013]. Сбор крови остается одним из ведущих источников преаналитических ошибок [Ialongo S., Bernardini S., 2016], которые часто могут привести к ощутимым рискам для качества образцов и безопасности человека. Основными факторами, которые влияют на процедуру венопункции, являются: недостаточная подготовка флеботомистов, плохое соблюдение существующих рекомендаций и отсутствие стандартизации [Simundic A-M. et al., 2015]. В литературе присутствуют рекомендации для повышения качества процедуры взятия крови, однако сама процедура крайне зависима от флеботомиста.

В качестве руководства по флеботомии во всем мире используются два ключевых документа: руководство H3-A6 "Процедуры для сбора диагностических образцов крови с помощью венопункции", изданное в 2007 году институтом клинико-лабораторных стандартов – CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard – Sixth Edition. CLSI document H3-A6.) и руководство по взятию образцов крови, выпущенное Всемирной организацией здравоохранения в 2010 г (WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy). Данные руководства включают в себя многие процедуры и подробно описывают порядок проведения флеботомии, но вопрос применения их на практике остается открытым, так как необходима адаптация этих документов к особенностям системы здравоохранения



отдельных государств. Европейские страны используют общепринятые стандарты, однако в некоторых из них приняты руководящие принципы по флеботомии на национальном уровне. Согласно обзору рабочей группы по преаналитическому этапу Европейской федерации клинической химии и лабораторной медицины (EFLM WG-PA) [Simundic A-M. et al., 2013], только семь европейских стран имеют национальные рекомендации по флеботомии: Ирландия, Великобритания, Испания, Словения, Швеция, Италия и Хорватия. Основными причинами того, что страны не внедрили национальные руководящие принципы, по-видимому, является отсутствие времени или инициативы для выполнения этой работы или из-за внедрения других – главным образом CLSI - руководящих принципов [Simundic A-M. et al., 2013].

Стандартизация процесса флеботомии важна, так как на данном этапе существует ряд факторов способных существенно повлиять на результаты тестирования. Перед взятием образца крови кожу очищают и дезинфицируют спиртом. Если алкоголь не высыхает полностью перед венепункцией, он может случайно попасть в пробу крови. Это загрязнение может вызвать гемолиз или помешать измерению уровня этанола в крови [Stankovic A. K., Smith S., 2004]. Чтобы свести к минимуму влияние антисептиков, перед получением образцов крови кожа должна быть полностью сухой. Немаловажным фактором являются иглы для флеботомии. Одной из проблем, связанных с иглами, является гемолиз, который вызывает выделение гемоглобина и других внутриклеточных веществ (например, калия, лактатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, неорганического фосфата и магния) в сыворотку или плазму [Lippi G., et al., 2006]. Эти вещества будут ложно увеличены в образцах, тогда как альбумин, щелочная фосфатаза и натрий будут ложно снижены по причине разведения образцов. Свободный гемоглобин в сыворотке или плазме может помешать нескольким клиническим анализам, что приведет к неточным результатам или повторному забору крови. Обнаружено, что иглы малого диаметра (25 калибра

или менее) связаны со статистически значимым увеличением содержания калия и других веществ в сыворотке крови вследствие гемолиза [Lippi G. et al., 2006]. Более медленные скорости потока в иглах с меньшим отверстием также связаны с повышенной свертываемостью, окклюзией и вариациями результатов тестов [Prabhu S. et al., 2006]. Иглы большого диаметра (больше 19-го калибра) могут вызывать гемолиз из-за турбулентности, т. е. увеличения неламинарного кровотока [Lippi G. et al., 2006]. Поэтому важно подбирать иглу по размеру вены; в большинстве условий сбора предпочтительны иглы 21-го калибра [Stankovic A. K., Smith S., 2004]. Компоненты металлической иглы (например, хром, железо, марганец и никель) могут загрязнять образцы крови и мешать последующим химическим реакциям или ложно повышать уровень металлов в крови [Cornelis R. et al., 1996].

Выбор размера иглы для взятия проб крови определяется состоянием вен у каждого конкретного пациента. Наиболее широко используются иглы 21G. При необходимости взять у пациента несколько проб крови для анализа предпочтение следует отдавать иглам с большим диаметром (20G), а в трудных случаях (склерозированные вены, тонкие вены, ожирение), у детей, иглам с меньшим диаметром (22G). Для взятия проб венозной крови предпочтительно использовать иглы с визуальной камерой, которые позволяют осуществлять контроль попадания в вену при проведении венепункции, и покрытые силиконом, что обеспечивает свободный ток крови по игле в вакуумную пробирку и снижает риск гемолиза. Основная проблема, возникающая при использовании игл с маленьким отверстием в сочетании с вакуумными пробирками, заключается в том, что к крови прилагается значительная сила вакуума, которая может вызывать повышенное и продолжительное давление на клетки крови, повышая риск активации тромбоцитов, повреждения клеток и гемолиза *in vitro*. Ненапряженная жидко-липидная мембрана, такая как плазматическая мембрана, может выживать в течение очень длительного периода времени в виде пленки или закрытой

везикулы. Однако при стрессе некоторый уровень натяжения мембраны приведет к быстрому открытию отверстия и разрыву мембраны, что обычно является чрезвычайно быстрым и невидимым событием в масштабе световой микроскопии [Evans E. et al., 2003]. Лизис клеток крови наблюдался при постоянных напряжениях сдвига в диапазоне 1500 дин / см<sup>2</sup> для эритроцитов, 300 дин / см<sup>2</sup> для лейкоцитов и 100–150 дин / см<sup>2</sup> для тромбоцитов, хотя относительные пороговые значения для лизиса зависят от характера и продолжительность напряжения мембраны. Наконец, из-за пониженного и турбулентного потока внутри меньших игл, например, с диаметром отверстия 25 G или меньше, кровь более склонна к свертыванию, вызывая закупорку иглы или ложные отклонения в результатах некоторых анализов, такие как незначительное усиление коагуляции, активность или снижение количества тромбоцитов [Prabhu S. et al., 2006].

Таким образом, решение о наиболее подходящем размере иглы зависит от точного баланса между характеристиками места венопункции и риском получения неподходящих образцов из-за активации клеток крови и наличия сгустков и / или гемолиза. Дополнительные переменные, которые следует учитывать, – это минимальное количество крови, необходимое для тестирования, а также возраст и психологическое состояние пациента. С этой точки зрения для легкодоступных передних локтевых вен рекомендуются иглы 21 G или немного большего размера. Фактически, иглы 19-21 G сводят к минимуму вероятность внесения преаналитической изменчивости [Ernst D. J., Ernst C. 2002]. Иглы 23 G следует использовать для новорожденных и маленьких детей, для маленьких и хрупких вен, а также для тревожных пациентов при условии, что для анализа требуется небольшое количество крови. Из-за своего маленького диаметра игла с меньшей вероятностью разрушит маленькие, нежные вены или вызовет коллапс, или травму хрупких вен у пожилых пациентов. Из-за риска гемолиза использование игл 22/23 G

или меньшего размера у взрослых в настоящее время рекомендуется только в определенных клинических ситуациях [Dugan L. et al., 2005].

Использование шприцев вместо вакуумных пробирок может существенно отразиться на качестве образцов крови, согласно исследовательским данным [Ashavaid T. F. et al., 2008] частота гемолиза в образцах, собранных с помощью шприцев, в 200 раз выше, чем в пробирках с вакуумом. Это связано с высокой нагрузкой на мембраны эритроцитов во время движения поршня шприца.

Вышеперечисленные факторы особенно остро влияют на процедуру флеботомии у людей пожилого и старческого возраста. Пожилым человеком может оказаться особенно сложным для флеботомиста. Обезвоживание, потеря проходимости вен и низкое кровяное давление являются типичными проблемами, в то время как артрит, травма или инсульт могут ограничивать подвижность таких людей, делая невозможным вытягивание рук для исследования доступных вен [Kimori K., Sugama J., 2016]. Также из-за сложности поиска кровеносного сосуда для определения подходящего места прокола, даже несмотря на то, что был разработан оптический метод визуализации кровеносных сосудов [Shepherd A. J. et al., 2006]. Поэтому легкодоступный источник образцов крови очень важен для простой и быстрой диагностики заболеваний у этой категории людей. По сравнению с артериальной и венозной кровью, капиллярную кровь можно легко собрать из различных источников с помощью простых инструментов, а метод сбора прост, быстр, недорог. Следовательно, он имеет отличный потенциал в качестве идеального источника крови для диагностики заболеваний и наблюдения за состоянием здоровья. Согласно действующим правилам, капиллярная кровь является единственным одобренным источником среди различных источников крови для диагностики за пределами клинической лаборатории (например, дома или в условиях ограниченных ресурсов) [Chang M. S., Lister C. W., 1993]. Однако, объем пробы капиллярной крови, как

правило, намного меньше по сравнению с пробами артериальной и венозной крови, поэтому её использование не всегда возможно.

## **1.2 Выбор пробирки для взятия образцов**

Исследования показали, что большая часть времени теста обусловлена факторами на преаналитическом этапе, включая эффективность доставки образцов [Chung J. H. et al., 2009]. Одним из факторов является время свертывания крови, а для получения сыворотки, (пробирки с активатором сгустка и разделением геля) требуется 30 минут для свертывания. Следовательно, чтобы сократить проблему времени свертывания, некоторые лаборатории используют образцы плазмы для тестирования. Однако известно, что плазма часто не является приемлемой альтернативой сыворотки [Miles R. R. et al., 2004]. Плазма имеет свой набор недостатков, например, проблема не полного смешивания крови с антикоагулянтами, разница в значениях результатов для некоторых анализируемых веществ при измерении в сыворотке и плазме (калий, лактатдегидрогеназа), что требует изменения референтных интервалов [Er T-K. et al., 2006]. Также исследования стабильности веществ крови отмечают более высокий показатель в сыворотке, по сравнению с плазмой [Oddoze C., Lombard E., Portugal H., 2012].

Пробирки для забора крови состоят из резиновых пробок, материалов стенок, разделительных гелей, активаторов сгустка, антикоагулянтов и поверхностно-активных веществ, которые могут влиять на результаты анализов.

Современные пробирки изготавливают из пластика. Пластик обладает преимуществами, сводя к минимуму выход биологически опасного материала вследствие разрушения пробирки, повышая ударопрочность, увеличивая допуск на скорость центрифугирования, уменьшая вес при транспортировке, облегчая утилизацию при сжигании и снижая затраты на утилизацию

биологически опасных отходов. Однако пластиковые пробирки ограничены повышенной газопроницаемостью по сравнению с стеклянными пробирками [Kratz A., Stanganelli E., Van Cott N. M., 2006].

Компоненты резиновых пробок потенциально могут загрязнять образцы крови и вызывать ошибки анализа. Некоторые металлы, такие как кальций, алюминий, магний и цинк, используются в производстве резиновых пробок. Другие потенциальные загрязнители, обнаруженные в резиновых пробках, включают серу, серосодержащие ускорители вулканизации, жирные кислоты и пероксиды [Ouweland van den M., Church S., 2007]. Таким образом, предпочтительнее заполнять пробирки до их назначенного объема и хранить в вертикальном положении, чтобы минимизировать выщелачивание из пробки и не концентрировать потенциальные загрязнители в небольших объемах образца.

Нанесение силиконовых или глицериновых смазок на пробки облегчает установку и удаление пробок из пробирок для сбора крови. Глицерин не следует использовать при измерении концентрации триглицеридов в крови, поскольку глицерин является компонентом анализа. Силиконизированные пробки являются предпочтительными потому, что силикон меньше влияет на точность анализов. Однако силикон на резиновых пробках может ложно повышать уровень ионизированного магния и общего трийодтиронина [Bowen R. A. et al., 2005]. Таким образом, смазка-пробка должна рассматриваться как потенциальный источник ошибок при проведении исследований биологических образцов.

Некоторые пробирки содержат разделительные гели, которые образуют барьер между сгустком и сывороткой во время центрифугирования. Разделительные гели заметно улучшают стабильность веществ в сыворотке и плазме крови, устраняя необходимость в аликвотировании и облегчая хранение и транспортировку. На положение геля влияют контролируемые производителем переменные (удельный вес, предел текучести, вязкость,

плотность и материал пробирки), лабораторные условия (скорость центрифугирования, температура, условия ускорения и замедления, а также условия хранения) и факторы человека (терапия гепарином, низкий гематокрит, повышенный белок плазмы, удельный вес) [Spiritus T., Zaman Z., Desmet W., 2003]. Преимущества таких пробирок: простота использования, более короткое время обработки за счет активации сгустка. В идеале результаты исследования биологических образцов не должны зависеть от взаимодействия с разделительными гелями. Однако, несколько отчетов показывают влияние гелей на концентрации веществ крови. Объем образца, время хранения, температура и тип геля могут влиять на адсорбцию лекарств на геле [Berk S. I. et al., 2006]. Гидрофобные лекарственные средства, такие как фенитоин, фенобарбитал, карбамазепин, хинидин и лидокаин, могут адсорбироваться на гидрофобных разделительных гелях. Эта адсорбция может снизить концентрацию лекарственного средства в сыворотке на 20-50% через 24 часа при 4 ° C [Dasgupta A., Yared M. A., Wells A., 2000]. Концентрации прогестерона подвергаются зависящему от времени снижению до 50% при хранении над разделительным гелем в течение 6 дней [Wilde C. et al., 2013]. Также капли геля и масла могут мешать пробозаборнику, частицы геля могут покрывать и изолировать электроды, тем самым изменяя электрический потенциал и измеряемые концентрации электролитов.

Как фактор влияния на стабильность веществ в крови рассматриваются и сурфактанты т. е. вещества, улучшающие перемешивание образца, распределение активатора сгустка и предотвращающие адсорбцию белков, эритроцитов и тромбоцитов к стенкам пробирки. Согласно данным исследований сурфактанты способны влиять на концентрации ионизированного магния и лития, а также на концентрации жирных кислот [Bowen R. A. R. et al., 2010].

Кровь, собранная для анализа сыворотки, должна сворачиваться как можно быстрее и в полной мере, чтобы облегчить отделение сгустка во время

центрифугирования. Хотя стеклянные поверхности активируют свертывание менее чем за 30 минут, пластиковые пробирки требуют активаторов сгустка для достижения этой цели. Стекло, кремнезем, каолин, бентонит используются в качестве активаторов через внутренний путь, который зависит от площади поверхности, а также активаторы сгустков в виде частиц, такие как неорганические силикаты, относительно медленны (30-60 минут) [Dubrownu N. E., Harrop A. J., 2004]. Второй тип активатора сгустка активирует внешний путь, является биохимически активным и зависит от концентрации. Хотя эти активаторы сгустка работают быстро (10-20 минут), сгустки получаются желатиновые и не отделяются чисто. Таким образом, полученная сыворотка часто имеет худшее качество [Wang C. et al., 2008]. В исследованиях сообщалось о влиянии активаторов сгустка на исследования биологических веществ в образцах крови. Так, было показано, что кремнезем или кремнийорганическое поверхностно-активное вещество ложно повышают концентрацию лития, определенную ион-специфическим электродным анализатором, концентрация тестостерона также может повышаться при исследовании образцов в пробирках, содержащих активатор сгустка [Wang C. et al., 2008].

Когда плазма используется для диагностических анализов, необходимо позаботиться о выборе подходящего антикоагулянта. Наиболее часто используемые антикоагулянты в пробирках для сбора крови представляют собой этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), гепарин и цитрат. Антикоагулянты могут быть в жидком или твердом виде (порошкообразном, кристаллизованном или лиофилизированном) и должны добавляться в соответствующих концентрациях для сохранения веществ крови, чтобы предотвратить вмешательство в связывание или осаждение комплексов антиген-антитело. Калия ЭДТА ( $K_2EDTA$ ) является широко используемым хелатирующим агентом, который связывает кальций и предотвращает образование сгустков. Это антикоагулянт выбора для проведения подсчета



клеток крови (CBC). EDTA может связывать ионы металлов, такие как европий, который присутствует в некоторых реагентах для иммуноанализа, или цинк и магний, которые являются общими кофакторами для ферментов (например, щелочной фосфатазы), используемых в качестве реагентов для иммуноанализа [Jones A. M., Honour J. W., 2006]. Таким образом, соотношение крови к EDTA является критическим для оптимальных результатов теста.

Гепарин использовался в сочетании с солями лития, натрия и аммония в качестве антикоагулянта. Растворы гепарина разбавляют образцы, поэтому в пробирках используются сухие соли гепарина. Гепарин может мешать измерению хлорида, потому что электроды хлорид-иона выбирают такие ионы, как гепарин, которые имеют энергию гидратации больше, чем хлорид [Rayana M. S. V. et al., 2006]. При использовании гепарина также возможно ложное занижение уровня альбумина и значительно более высокая активность КФК и ГГТП при нарушении соотношения гепарин/образец [Lippi G. et al., 2012].

Таким образом, качество пробирок для сбора крови также является важным фактором для получения надежных результатов исследования биологических веществ венозной крови. Также выбор пробирки играет важную роль в оказании своевременной помощи людям пожилого и старческого возраста, для которых предпочтительным вариантом являются пробирки для получения плазмы крови, например, с гепаринатом лития, дополнительный уровень стабилизации образца позволит достичь разделительный гель, позволяющий минимизировать контакт жидкой части крови с клеточным компонентом, что особенно важно для людей пожилого и старческого возраста так как повторный сбор образцов может быть затруднен.

### **1.3 Транспортировка и хранение образцов**

Попытки определить стабильность веществ крови на преаналитической стадии исследований биологических веществ крови можно обнаружить в

научных публикациях уже в 1954г. [Goodman R., Vincent J., Rosen I., 1954]. Позже были сформированы рекомендации ВОЗ (Quality of diagnostic samples. Recommendations of the Working Group on Preanalytical Quality of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) и CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests; approved guideline. Document H18-A4). Однако часто эти рекомендации трудно применять в повседневной практике, поскольку описанные интервалы стабильности биологических веществ крови часто несовместимы со временем, затрачиваемым на транспортировку образцов крови от места сбора в лабораторию. Таким образом, часто происходит задержка перед отделением плазмы от эритроцитов, что может также изменять стабильность анализируемых веществ.

Требования к условиям хранения и транспортирования образцов биоматериалов в клиническую лабораторию отражены в ГОСТ Р 53079.4 – 2008. Согласно данным требованиям: «Условия хранения образцов биоматериалов, взятых у пациентов, определяются стабильностью в этих условиях искомых биологических показателей. Максимально допускаемая нестабильность, выраженная в процентном отклонении результата после хранения от исходного уровня, не должна превышать половины размера общей ошибки определения, рассчитываемой из суммы биологической и аналитической вариации данного исследования. Максимально допускаемое время хранения измеряется периодом времени, в течение которого в 95% образцов содержание вещества сохраняется на исходном уровне».

Критерии стабильности показателей крови часто разнятся, например, ВОЗ сообщает, что стабильность калия и фосфата в цельной крови составляет менее 1 часа, однако есть исследования, рекомендующие отделять сыворотку в первые 2 часа для этих веществ [Foucher B. et al., 2005]. Несмотря на имеющиеся публикации встречается мнение о неполной информации о

стабильности анализируемых веществ крови [Oddoze C., Lombard E., Portugal H., 2012]. Иногда публикации имеют недостаточно большую выборку [Zwart S. R. et al., 2009], также образцы центрифугируют, а затем разделяют на аликвоты и замораживают перед тестированием, что может внести смещение в результаты [Evans M. J. et al., 2001]. В исследованиях, наблюдаемые изменения концентрации веществ крови анализируются различными методами: t-критерий Стьюдента [Ono T., 1981], дисперсионный анализ [Imeri F. et al., 2008], тест Уилкоксона [Parent X. et al., 2008], изменение более 10% относительно базовых концентраций [Ellis M. J., Livesey J. H., Evans M. J., 2003] или из аналитического подхода SCL (significant change limits) [Boyanton Jr B. L., Blick K. E., 2002], а также сочетание аналитических и биологических вариаций [Zhang D. J. et al., 1998]. Таким образом, эти исследования дают значительно разные пределы стабильности веществ крови

Многочисленные типы помех и неточностей возникают в результате неправильного хранения образцов в лаборатории, включая неподходящие температуры и время хранения, интерферирующие вещества и чувствительность к свету. Неправильная температура или время хранения чаще всего приводят к деградации образцов в цельной крови и неразделенных образцах сыворотки / плазмы. CLSI рекомендует следующее в качестве «общих» рекомендаций по хранению образцов в лаборатории. Сыворотка / плазма должны быть отделены от клеточных компонентов сразу после центрифугирования, либо путем переноса в новую пробирку, либо с использованием физических сепараторов, таких как гель. Отделенные образцы можно хранить в плотно закрытой крышке, чтобы избежать испарения и изменения концентрации, до 8 часов при комнатной температуре (предпочтительно 20-25 °C) и до 48 часов при 4 °C; через 48 часов образцы должны быть заморожены при -20 °C. Перед анализом образцы следует размораживать при комнатной температуре, так как нагревание может денатурировать исследуемые вещества. Хотя CLSI не рекомендует повторять

циклы замораживания-оттаивания, этот процесс затрагивает очень мало веществ крови [Knowles T. P. et al., 2006]. Несколько веществ крови нельзя хранить в соответствии с «общими» рекомендациями CLSI. Хранение цельной крови зависит от исследуемого вещества. Замораживание цельной крови вызывает гемолиз и не рекомендуется для гематологических или газовых проб крови. В неразделенных образцах плазмы длительное хранение при 4 °С вызывает утечку из клеток и ложно повышает калий. Кривоактивация проренина при длительном хранении на холоде (в холодильнике или на льду) ложно повышает результаты анализа активности ренина в плазме. Образцы, собранные для тестирования изофермента ЛДГ, должны храниться при комнатной температуре до проведения анализа, поскольку замораживание и длительное хранение при 4 °С приводит к потере активности ЛДГ-5 [Lopez J., 2013].

Протромбиновое время значительно увеличивается при длительном хранении в замороженном виде, и эти образцы следует хранить только в холодильнике или при комнатной температуре. Некоторые исследования предполагают, что использование гелевых пробирок устраняет необходимость физического отделения плазмы / сыворотки от клеток для кратковременного хранения в лаборатории. Длительный контакт с гелем мешает некоторым веществам, особенно лекарствам и эстрадиолу, для которых могут наблюдаться пониженные концентрации вследствие абсорбции в гелеобразный полимер. Гелевые разделительные пробирки не должны использоваться для этих исследований. После длительного хранения, барьерные уплотнения должны быть проверены на всех разделительных пробирках перед анализом. Лаборатории должны пользоваться инструкциями производителей для получения списка веществ, которые являются стабильными в тех или иных пробирках в течение длительного хранения. Некоторым веществам требуются консерванты для поддержания стабильности в лаборатории. Катехоламины в моче значительно разлагаются

при 4 °С через 48 часов при рН 6,0, но они стабильно замораживаются или при 4 °С, когда хранятся при рН 2,0-3,0. Добавление ингибиторов протеаз, таких как аprotинин, стабилизирует пептидные гормоны.

Знание стабильности образцов важно для получения правильных результатов исследований. Для точности измерения некоторых веществ необходима защита от света, если образец не может быть немедленно проанализирован. По мнению ряда авторов, к таким веществам относятся: фолат, витамин В12 и билирубин, а также каротин и витамин А. В плазме некоторые лекарства, такие как нифедипин и хлорамфеникол, чувствительны к свету [Koesem A. et al., 2007], [Cuhadar S., 2013]. Часто такие пробы транспортируются и обрабатываются без защиты от света в обычной лабораторной практике. Иногда эти вещества не могут быть изучены немедленно из-за повышенной нагрузки или технических проблем. Кроме того, некоторые лаборатории не проводят ежедневные измерения витамина В12 и фолата, и образцы, как правило, передаются в другие лаборатории или, изучаются через некоторое время при накоплении достаточного количества проб. Образцы, собранные для анализа светочувствительных веществ, следует защищать от света, собирая их в коричневые контейнеры или оборачивая их в алюминиевую фольгу во время транспортировки и хранения в лаборатории.

Транспортировка биологических образцов также может быть источником ошибок на преаналитическом этапе исследования биологических веществ в венозной крови. Продолжающаяся централизация служб лабораторной медицины во всем мире, способствовала возникновению проблем, связанных с оптимальными условиями транспортировки образцов [Lippi G., Šimundić A-M., 2012].

Поддержание хорошо контролируемой транспортной среды имеет важное значение для снижения преаналитических ошибок. Изменение температуры транспортировки может повысить стабильность исследуемого вещества. Более низкие температуры обычно повышают стабильность

веществ, но необходимо соблюдать осторожность, потому что одна температура не подходит для всех исследуемых веществ. Сильная жара денатурирует белки и может снизить активность ферментов. Более низкие температуры подавляют метаболические процессы, такие как гликолиз. Таким образом, большинство показателей более стабильны при 4 ° С. Некоторые вещества должны быть охлаждены, потому что они быстро разлагаются при комнатной температуре, включая аммиак, лактат, пируват, белок, связанный с паратиреоидным гормоном и гастрин. Эти образцы должны быть охлаждены сразу после сбора, и эта температура должна поддерживаться на протяжении всей преаналитической фазы.

Как правило, большинство исследуемых веществ более стабильны при более низких температурах, однако есть несколько заметных исключений. Холод ингибирует гликолиз, который обеспечивает АТФ, необходимый для Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> насосов на клеточной поверхности. Без АТФ внутриклеточный калий начинает выходить из клеток против градиента концентрации с течением времени. Таким образом, внеклеточный калий может быть искусственно повышен в образцах, хранящихся при низких температурах. Аналогично, если образец поддерживается при комнатной температуре, глюкоза потребляется для поддержания гликолиза. Этот процесс поддерживает соответствующую концентрацию калия, но снижает уровень глюкозы. Это затрудняет транспортировку образцов, собранных для широкого спектра тестов, но проблема решается путем отделения плазмы от клеток перед транспортировкой.

Исследования часто намеренно откладываются – например, для анализа партии или для отправки образцов в контрольные лаборатории – и образцы могут быть заморожены для сохранения целостности образца до момента тестирования. Некоторые ферменты чувствительны к замерзанию. При хранении в жидком азоте АСТ, АЛТ, щелочные фосфаты,  $\gamma$ -глутамилтрансфераза и ЛДГ остаются стабильными, тогда как активность

амилазы увеличивается, а КФК снижается. Некоторые вещества, такие как криоглобулины, должны поддерживаться при температуре тела и требовать транзита в емкости с теплой водой при температуре около 37 °С.

CLSI рекомендует использовать ледяную баню для быстрого и эффективного охлаждения образца. Использование смеси льда и воды обеспечит хороший контакт между пробиркой и охлаждающей средой. Следует позаботиться о том, чтобы предотвратить прямой контакт образца со льдом, особенно с сухим льдом, поскольку гемолиз может происходить при экстремальных температурах. При транспортировке образцов на улице следует учитывать особые погодные условия. Например, в очень жаркие дни образцы должны быть запечатаны в пластиковый пакет, а затем погружены в охлажденную среду для обеспечения лучшего охлаждения. С другой стороны, в очень холодном климате охладители могут не требовать дополнительных пакетов со льдом или дополнительной изоляции для предотвращения замерзания образца.

Транспортировка с места отбора в лабораторию для обработки может включать одну или несколько форм перевозки. Образцы часто доставляются курьером в основную лабораторию, курьерские службы являются предпочтительным методом для транспортировки образцов. По сравнению с отправкой по почте, курьеры быстрее и могут обеспечить лучший контроль окружающей среды, как температуры, так и механических воздействий.

Транспортировка на большие расстояния авиатранспортом сопровождается некоторыми негативными факторами воздействия на пробы. Основное значение при такой перевозке будут играть изменение атмосферного давления и вибрация. Было установлено, что снижение давления до 600-200 мбар приводит к более высокому гемолизу образцов крови по сравнению с 1000 мбар (765 мм.рт.ст.) [Klose T. et al., 2010].

Использование пневмонической транспортной системы (ПТС) первоначально сопровождалось проблемой, в основном связанной с возможным повреждением клеток крови из-за высоких ускоряющих и замедляющих сил. Однако эти проблемы были в основном преодолены так, что использование пневмопочты в настоящее время является обычным явлением во многих медицинских учреждениях по всему миру. Единственным недостатком остается потенциальное влияние высокоскоростной транспортировки на активацию тромбоцитов, в то время как о дополнительных проблемах качества образца сообщений в литературе нет [Purk A. et al., 2017]. Другой неотъемлемый и довольно очевидный недостаток ПТС представлен ограниченным диапазоном пространства, что делает эти системы пригодными только для доставки образцов на небольшое расстояние, чаще всего в пределах границ больницы.

Недавно, появился новый способ доставки биологических образцов – дрон, также известный как беспилотный летательный аппарат (БПЛА). Международная организация гражданской авиации (ИКАО) в настоящее время классифицирует беспилотники по двум категориям: автономные БПЛА (управление автономно бортовыми компьютерами) и БПЛА с дистанционным управлением (управляемые пилотом-человеком на земле). Использование транспортных средств первого класса в настоящее время запрещено из-за правовых и имущественных вопросов, в то время как последний класс подлежит гражданскому регулированию в соответствии с ИКАО и согласно соответствующим национальным авиационным стандартам. Существуют исследования [Amukele K. et al., 2015] показывающие приемлемость использования БПЛА для доставки образцов в лабораторию, при этом влияния на точность широкого спектра клинической химии, гематологии и коагулологических тестов не обнаружено. Однако, на данный момент существуют большие риски использования БПЛА в связи с высокой аварийностью. Риск того, что люди будут ранены или даже подвергнуты



биологическому загрязнению в результате столкновения с БПЛА, несущими пробирки с кровью, все еще слишком высок [Drone Crash Database, 2010].

Хранение образцов крови от человека пожилого и старческого возраста представляет собой актуальную задачу для клинических лабораторий по причине частой невозможности повторных взятий образцов у людей этих групп ввиду труднодоступных периферических сосудов, наличия анемии и частой сниженной мобильности, что усложняет повторные визиты в ЛПУ для дополнительных исследований. Учитывая эти факторы, в случае наличия значительного преобладания старших возрастных групп среди обследуемого контингента, представляется необходимым валидация сроков и условия максимального хранения образцов крови по исследуемым в лаборатории ЛПУ веществам с учётом специфики конкретной лаборатории.

#### **1.4 Интерференция: гемолиз, липемия, иктеричность**

Самым частым следствием ошибок на преаналитическом этапе является гемолиз образцов. Гемолиз обычно определяют, как повреждение или полное разрушение эритроцитов в крови. Этот патологический процесс условно подразделяют на две основные категории: гемолиз *in vivo*, когда эритроциты повреждаются из-за наличия гемолитических заболеваний, или гемолиз *in vitro* когда эритроциты повреждаются на любом этапе от сбора крови до анализа. В настоящее время гемолизированные образцы являются основной преаналитической проблемой при исследовании биологических веществ в образцах венозной крови, поскольку высвобождение гемоглобина и других внутриклеточных соединений в сыворотке или плазме вызывают спектр биологических, химических и спектрофотометрических помех, что, в конечном итоге, часто делает результаты тестов ненадежными [Cadamuro J. et al., 2015]. В литературе существуют противоречия относительно того, как лаборатория должна обращаться с гемолизированными образцами [Lippi G., Cervellin G., Plebani M., 2017], однако был достигнут консенсус в отношении

важности этой проблемы. Качество пробы в течение длительного времени оценивалось путем визуального осмотра сыворотки или плазмы с целью выявления гемолиза, помутнения или желтухи. Тем не менее, ряд доказательств в настоящее время свидетельствует о том, что визуальный осмотр образца имеет слишком много недостатков (неточность, сильно зависит от оператора) [Simundic A-M. et al., 2009], а также может поставить под угрозу безопасность человека [Li L. et al., 2018]. Также было показано, что не только визуальное обнаружение, но и решение о том, сообщать или нет о результатах теста с гемолизированными образцами, может существенно различаться у разных людей, основываясь на их индивидуальном суждении [Lippi G., Cadamuro J., 2018]. Чтобы свести к минимуму ошибки, связанные с такой практикой, визуальная оценка уровня гемолиза и управление гемолизированными образцами на основе индивидуального, нестандартизированного субъективного мнения, таким образом, не рекомендуется. Для повышения качества и надежности тестов необходимо использовать автоматизированные системы обнаружения и управления [Lippi G., 2015]. Автоматическая идентификация с использованием индекса гемолиза (HIL) в настоящее время широко распространена. Превосходство данного подхода над традиционным визуальным осмотром центрифугированных образцов было описано Simundic A.M. и соавт. [Simundic A-M. et al., 2009]. Автоматизированные системы не влияют на время оборота (TAT) и являются единственным средством идентификации неподходящих образцов и прямой передачи данных в лабораторную информационную систему (LIS) для лабораторий, использующих полную лабораторную автоматизацию [Harris E. K., Yasaka T., 1983]. Для определения клинически значимых смещений результатов используют RCV (reference change value). RCV является объективным инструментом для оценки значимости различий в серийных лабораторных данных, полученных от одного и того же субъекта. Метод был предложен в 1983 году [Fraser C. G., 2012] и позже был признан в значительной степени [Agarwal S. et al., 2015].

RCV основан на специальной формуле, включающей в себя как биологические вариации (CVI), так и аналитические вариации (CVA). Термины и символы, используемые для определения компонентов биологической вариации и других связанных аспектов, были недавно предложены Simundic et al. и одобрены рабочей группой EFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) по биологической вариации (WG-BV). Применение RCV представляет собой простую концепцию для определения порогов уровня гемолиза в роботах, выше которых чувствительные к гемолизу тесты страдают от «клинически значимого» смещения.

Билирубин и липиды также давно известны как вещества, изменяющие цвет или мутность образца [Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - 6th Edition, 2021]. Они вызывают помехи из-за спектрофотометрических механизмов, эффектов уменьшения объема и физико-химических механизмов (липемия), или с помощью спектрофотометрического механизма и химического взаимодействия билирубина (желтухи) [Luksic A. N. et al., 2018]. Гемолиз в основном происходит во время забора и транспортировки крови, липемия и желтуха связаны с состоянием и характеристиками человека, поэтому их невозможно устранить путем повторного забора крови. Из-за различных механизмов, посредством которых происходит вмешательство, гемолиз, желтуха и липемия не рассматриваются как одно и то же явление. Необходимо также учитывать рекомендации производителя аналитических систем и реактивов относительно гемолизированных проб, по причине не одинаковых эффектов интерференции на различных анализаторах [Gidske G. et al., 2019].

Эндогенные интерференции могут быть значительным источником ошибок при исследованиях биологических веществ венозной крови человека [Agarwal S. et al., 2015]. Связь между липемией и гемолизом пока не очень хорошо охарактеризована, однако есть исследования, связывающие повышение концентрации липидов с частотой гемолиза [Bashir S. et al., 2013].

Хотя низкие уровни липемии обычно не оказывают значительного влияния на исследования биологических веществ в крови, наличие тяжелой липемии, с высокой вероятностью, повлияет на анализ. [Dimeski G., Mollee P., Carter A., 2006].

В отличие от гемолиза, в новых публикациях липемии уделяется гораздо меньше внимания. Общая частота образцов липемии колеблется в пределах 0,5-2,5%, в зависимости от типа больницы и доли стационарных и амбулаторных образцов [Nikolas N., 2014]. Липемия – это помутнение образца, вызванное накоплением частиц липопротеинов. Поскольку липопротеины различаются по размеру, не все классы вносят одинаковый вклад в мутность. Самые крупные частицы, хиломикроны, с размером 70-1000 нм, вносят наибольший вклад в возникновении мутности образца. Накопление мелких частиц, липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) не приводит к липемии образцов [Garvey W. T. et al., 2003]. Наиболее распространенной преаналитической причиной липемии является забор крови после еды [Nikolas N. et al., 2013]. Другой основной причиной является гипертриглицеридемия, вызванная либо первичным нарушением (например, гиперлипидемией Фредриксона I, IV или V типа), либо вторичной причиной. Общие вторичные причины гипертриглицеридемии включают сахарный диабет, алкоголизм, заболевания почек, неалкогольное жировое заболевание печени и лекарственные препараты. Некоторые внутривенные вливания вызывают липемию напрямую, поскольку содержат липидные эмульсии [Boisrame-Helms J. et al., 2015], в качестве противоядия при отравлении определенными лекарствами (например, местных анестетиков) [Nikolas N., 2014], либо в качестве разбавителя для плохо растворимых в воде лекарств [Fahr A., Liu X., 2007]. Сбор крови у людей, которые недавно получили внутривенную липидно-эмульсионную терапию, может привести к получению образцов с чрезвычайно большой липемией [Nikolas N., 2014]. Лекарства, которые могут

косвенно вызывать липемию, включают глюкокортикоиды, антиретровирусные препараты (особенно ингибиторы протеазы) и неселективные антагонисты бета-адренергических препаратов. Кетогенные диеты, используемые при лечении эпилепсии, могут привести к развитию гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии [Zamani G. R. et al., 2016]. Накопление липопротеинов в образце может влиять на измеряемые вещества физическими и химическими взаимодействиями. Липемия может неспецифически вмешиваться в различные иммуноанализы. Липопротеины могут мешать реакции антиген-антитело, блокируя точки связывания на антителах. В зависимости от характера реакции, помехи могут вызывать как ложно повышенный, так и ложно уменьшенный результат [Schiettecatte J., Anckaert E., Smitz J., 2012]. Наиболее распространенным способом воздействия липемии на результаты исследований биологических веществ в крови является интерференция при спектрофотометрии. Частицы липопротеина в образце могут поглощать свет. Количество поглощенного света обратно пропорционально длине волны и уменьшается от 300 до 700 нм, [Endogenous interferences in laboratory tests: icteric, lipaemic and turbid samples - Carys Lippiatt, 2016, ]. Поэтому методы, которые используют более низкие длины волн, больше подвержены влиянию липемии, поскольку поглощение является самым высоким в этой части спектра. Многие вещества клинической химии такие как: аланинаминотрансфераза (ALT), аспаратаминотрансфераза (AST), глюкоза измеряются при длине волны 340 нм, и на большинство из этих методов сильно влияет липемия. Важно, что направление и степень помех будут отличаться при сравнении разных методов и аналитических систем для одного и того же параметра [Nikolac N. et al., 2013].

Существует множество методов оценки липемии в образцах венозной крови. Самым простым является визуальный осмотр образца; однако в этом типе оценки есть значительная неточность и индивидуальные различия [Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - 6th Edition, 2021].

Измерение триглицеридов в сыворотке или плазме также может дать приблизительную оценку степени липемии, но степень мутности не очень хорошо коррелирует с концентрацией триглицеридов, ввиду сложной и нелинейной зависимости [Twomey P. J., Don-Wauchopre A. C., McCullough D., 2003]. Многие аналитические системы обладают способностью определять липемический индекс [Vermeer J. H., Thomassen E., Jonge de N., 2005]. Для автоматического определения липемического индекса проводят разведение образца в физиологическом растворе или буфере, а затем измеряют конкретные длины волн [Nikolas N, 2014]. Есть как преимущества, так и недостатки автоматического обнаружения. Низкая стоимость, высокая скорость и быстрое время анализа являются одними из преимуществ автоматического обнаружения, в то время как некоторые из недостатков заключаются в отсутствии стандартизации среди производителей и ложных срабатываниях из-за мутности образца, не вызванной накоплением липидов.

Высокие концентрации билирубина в сыворотке или плазме могут вызывать помехи в анализах вблизи пика поглощения билирубина ~ 456 нм. Также билирубинемия может влиять на качество теста и химическим взаимодействием, например, с реакциями, катализируемыми пероксидазой. Наиболее широко опубликованные исследования посвящены влиянию интерференции билирубина в методах Яффе для измерения креатинина [Dimeski G. et al., 2008]. Степень помех зависит от производителя и метода. Некоторые анализаторы почти не подвержены влиянию высокой концентрации билирубина, в то время как другие анализаторы чувствительны к этому по многим методам. Часто помехи в определении концентрации креатинина, холестерина и мочевой кислоты отрицательны, то есть дают более низкие результаты, в то время как результаты по бикарбонату положительны, что дает более высокие результаты [Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods - 23rd Edition, 2021]. Исследование CAP (College of American Pathologists) показало, что билирубин может влиять на многие

распространённые тесты, включая ALT, альбумин, щелочную фосфатазу, кальций, креатинин, натрий, глюкозу, липазу, общий белок, креатинкиназу, магний, фосфор, мочевины и мочевую кислоту. Поскольку влияние билирубина зависит от аналитической системы, методологии и состава реагентов, каждая лаборатория должна оценить методы, используемые в их работе [Clinical Chemistry - 5th Edition, 2021].

Визуальный осмотр образцов для выявления гипербилирубинемии не очень чувствителен. Образцы, содержащие гемолиз, делают обнаружение еще более трудным. Автоматическое обнаружение билирубина с помощью анализаторов, которые оценивают присутствие интерферирующих веществ, является рекомендуемым методом для выявления неподходящих образцов. Добавление в реагент ферроцианида калия или билирубиноксидазы может устранить помехи от билирубина в методах, основанных на образовании перекиси водорода.

### **1.5 Влияние метаболизма клеток на результаты анализа**

Немаловажным фактором влияния на исследуемые вещества в процессе хранения и транспортировки образцов становится метаболизм клеток крови.

Исследований о зависимости изменений уровня исследуемых веществ и количества/параметров клеток крови крайне мало. Однако, существуют современные исследования о метаболизме клеток крови. Так, например, активированные лимфоциты резко увеличивают энергетические потребности для поддержки метаболических процессов, необходимых для роста, пролиферации и эффекторной функции [Maciver N. J. et al., 2008], а переход тромбоцитов из состояния покоя в активированное состояние требует кардинальных изменений в доступности АТФ. Тромбоциты обладают молекулярным механизмом, необходимым для генерации АТФ как в процессе гликолиза, так и окислительного фосфорилирования [Aibibula M., Naseem K. M., Sturmeу R. G., 2018].

Связанное с возрастом снижение функции органов коррелирует с изменениями в лабораторных данных (то есть сниженным клиренсом креатинина, толерантностью к глюкозе и регуляцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси), которые могут представлять процессы болезни или её отсутствия. Так с возрастом происходит снижение внутриклеточного уровня окисления глюкозы во всех тканях организма. Возможные причины снижения эффективности инсулина при старении включают: снижение физической активности, дисфункцию митохондрий, гормональные изменения (то есть снижение IGF-1 и DHEA), повышенный окислительный стресс и воспаление [Kalyani R. R., Egan J. M., 2013].

## **1.6 Влияние гендерных различий на результаты анализа**

Пол включает в себя множество сложных эндокринных и метаболических реакций. Гендерные различия в веществах крови могут быть объяснены различными эндокринными функциями, связанными с органами, и массой скелетных мышц [Tipton K. D., 2001]. В среднем концентрации альбумина, кальция, магния, гемоглобина, ферритина и железа у женщин ниже. Снижение концентрации циркулирующего железа частично связано с кровопотерей во время месячных менструаций. Средние концентрации креатинина и цистатина С в сыворотке обычно ниже у девочек-подростков по сравнению с мужчинами. Концентрации альдолазы выше у мужчин после начала полового созревания. Концентрации ALP выше у девочек в возрасте 10-11 лет. У мальчиков в возрасте 12-13, 14-15 и 16-17 лет концентрация ALP выше, чем у девочек соответствующих возрастных категорий. Снижение концентрации ALP начинается после 12 лет для девочек и 14 лет для мальчиков. Менопаузальные женщины имеют более высокие концентрации ALP по сравнению с мужчинами. Концентрации билирубина в сыворотке у женщин ниже из-за снижения концентрации гемоглобина. У женщин концентрация альбумина выше, чем у мужчин того же возраста [Thalacker-Mercer A. E. et al., 2007].



Липидный профиль также сильно зависит от пола. Концентрации общего холестерина варьируются не только с возрастом, но и с полом. Женщины в возрасте до 20 лет имеют более высокие концентрации общего холестерина по сравнению с мужчинами в соответствующем возрасте. Однако в возрасте от 20 до 45 лет мужчины обычно имеют более высокие концентрации общего холестерина, чем женщины. Мужчины также имеют более высокие 24-часовые выделения с мочой адреналина, норадреналина, кортизола и креатинина по сравнению с женщинами [Masi C. M. et al., 2004]. Женщины имеют более высокий уровень ГГТ в сыворотке, количество меди и ретикулоцитов по сравнению с мужчинами.

### **1.7 Влияние рациона питания на результаты исследований**

Рацион питания может влиять на результаты теста, в то же время голод также оказывает глубокое влияние на результаты исследований биологических веществ в венозной крови.

Прием пищи активирует метаболические сигнальные пути *in vivo*, которые существенно влияют на результаты исследований биологических веществ. Во-первых, желудок выделяет HCl в ответ на потребление пищи, что вызывает снижение концентрации хлоридов в плазме. Это слабое метаболическое алкалоидное состояние возникает в результате повышенной концентрации циркулирующего бикарбоната в венозной крови желудка с сопровождающимся снижением уровня ионизированного кальция (на 0,05 ммоль / л, 0,2 мг / дл) [Niv Y., Fraser G. M., 2002]. Также нарушения в печени приводят к повышению активности билирубина и ферментов. В зависимости от содержания принятой пищи воздействие на обычно измеряемые вещества может быть кратковременным или длительным. Таким образом, ночное голодание в течение по меньшей мере 12 часов необходимо для получения точного представления концентраций глюкозы, липидов, железа, фосфора, урата, мочевины *in vivo*. Липемия также может мешать получить достоверные

результаты. Углеводы (повышающие уровень глюкозы и инсулина и снижающие концентрации фосфора) и белковые блюда (повышающие концентрации холестерина и гормона роста в течение 1 часа после приема пищи, а также повышающие концентрации глюкагона и инсулина) оказывают различное влияние на анализируемые вещества в сыворотке. Диеты с высоким содержанием белка значительно влияют на различные вещества, измеренные в 24-часовом анализе мочи. Стандартный 700-калорийный прием пищи заметно повышает триглицериды (~ 50%), АСТ (~ 20%), билирубин и глюкозу (~ 15%), а также концентрации АСТ (~ 10%) [Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - 6th Edition, 2021]. Быстрые изменения концентрации липидов согласуются с изменениями в рационе питания, приемом лекарств или заболеванием. Потребление кофеина оказывает существенное влияние на организм человека. Различные концентрации этого стимулятора присутствуют в различных продуктах (кофе, чай, шоколад, безалкогольные и энергетические напитки). Короткий период полувыведения кофеина (3-7 часов) также варьирует среди людей. Кофеин индуцирует выведение катехоламинов из мозгового вещества надпочечников. Кроме того, повышенный глюконеогенез, который впоследствии увеличивает концентрацию глюкозы и ухудшает толерантность к глюкозе, очевиден после приема кофеина. Кора надпочечников также уязвима к стимулирующему действию кофеина, о чем свидетельствуют повышенные концентрации кортизола, 11-гидрокортикоидов и 5-гидроксиндолеуксусной кислоты. Кофеин ответственен за трехкратное увеличение неэтерифицированных жирных кислот, которые мешают точному количественному определению связанных с альбумином лекарств и гормонов. При приеме кофеина присутствуют чрезвычайно высокие концентрации ионизированного кальция. Кофеин вызывает повышение свободных жирных кислот, вызывая быстрое снижение pH, что освобождает кальций от белка.

Кетогенная диета – это низкоуглеводная (<40 г / день), умеренно-белковая диета с высоким содержанием жиров. При отсутствии достаточного количества углеводов печень превращает жир в жирные кислоты и кетоны. Соблюдение кетогенной диеты приводит к повышению кетонов в крови и моче в течение нескольких дней. По сообщениям, снижение уровня триглицеридов в сыворотке и повышение уровня ЛПВП происходит в течение нескольких недель [Yancy Jr W. S. et al., 2004]. Невегетарианская диета имеет более высокие плазменные концентрации аммиака, мочевой кислоты и мочевины по сравнению с вегетарианской диетой. Эта диета обычно включает насыщенные жирные кислоты. Пальмитиновая кислота, насыщенная жирная кислота, вызывает значительное повышение концентрации холестерина в плазме. Замена насыщенных жирных кислот полиненасыщенными жирами и сложными углеводами может снизить концентрацию ХС-ЛПНП. Потребление омега-3 масел может снизить концентрацию триглицеридов и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Вегетарианцы имеют более низкие концентрации ЛПНП (приблизительно на 37% ниже) и ЛПВП (приблизительно 12%) по сравнению с невегетарианцами. Напротив, лактовегетарианцы (вегетарианцы, которые потребляют молочные продукты) имеют более высокие концентрации ЛПНП (приблизительно на 24% выше) и ЛПВП (приблизительно на 7% выше) по сравнению с вегетарианцами. В течение 20 недель режим лактовегетарианской диеты, сопровождающийся низким содержанием белка и высоким содержанием клетчатки, может снизить адренкортикальную активность. Лактовегетарианцы имеют более высокие концентрации дегидроэпиандростерона сульфата (DHEAS) в плазме по сравнению с невегетарианцами (людьми, которые придерживаются умеренно богатой белком диеты). Кроме того, у лактовегетарианцев снижены показатели экскреции с мочой в течение 24 часов С-пептида, свободного кортизола, DHEAS и общего 17-кетостероида [Remer T., Pietrzik K., Manz F., 1998]. У людей среднего возраста после перехода с мясосодержащей диеты на

вегетарианскую диету наблюдались пониженные показатели экскреции с мочой метаболитов андрогена надпочечников и гонад в течение 24 часов.

Диета ХГЧ состоит из сублингвальных капель или инъекций ХГЧ в сочетании с низкокалорийной диетой. ХГЧ может иметь плацентарное или неплацентарное происхождение. ХГЧ проявляется в трофобластической плаценте (гидатидиформная, хориокарцинома), гонадной (яичниковая, яичковая или внегонадальная тератома), эктопических или нетрофобластических опухолях. Экзогенная ХГЧ может быть обнаружена в организме через 10 дней после инъекции / приема внутрь. Лица на диете ХГЧ, получавшие инъекции ХГЧ, имели заметно повышенные концентрации ХГЧ в сыворотке при отсутствии беременности или злокачественных новообразований [Woolsey C. Goff J., 2012]. Очевидно, что люди на диете ХГЧ могут иметь ненадежные результаты теста. Однако влияние подъязычных капель ХГЧ на исследования биологических веществ в крови неизвестно. У здоровых мужчин инъекции ХГЧ (очищенный мочевой и рекомбинантный ХГЧ) стимулируют клетки Лейдига и вызывают дозозависимое увеличение концентрации тестостерона в сыворотке [Handelsman D. J., 2006].

Голодание вызывает сложные метаболические нарушения. Многие люди постятся в соответствии с культурой и религиозными традициями, поэтому понимание влияния поста на результаты исследований биологических веществ венозной крови имеет первостепенное значение. В течение 3 дней после голодания концентрация глюкозы возрастает на 18 мг / дл, несмотря на скоординированные усилия организма по сохранению белков. Впоследствии инсулин быстро снижается, в то время как секреция глюкагона увеличивается в попытке восстановить уровень глюкозы в крови до концентрации перед голоданием. Постящийся человек подвергается как липолизу, так и печеночному кетогенезу. Состояние метаболического ацидоза включает повышенную сывороточную ацетоуксусную кислоту,  $\beta$ -гидроксibuтират и жирные кислоты и пониженный pH,  $pCO_2$  и бикарбонат.

Сокращенные запасы энергии в организме в основном приводят к значительному снижению до 50% концентрации как общего, так и свободного трийодтиронина. Пост по-разному влияет на концентрацию липидов. В течение 6 дней уровень холестерина и триглицеридов увеличивается, а концентрации ЛПВП снижаются. Резкое увеличение концентрации гормона роста в плазме (в 15 раз) происходит на ранней стадии голодания. В течение 3 дней после голодания концентрация гормона роста в плазме возвращается к предварительному уровню. Концентрации альбумина, преальбумина и комплемента 3 снижаются во время длительного голодания. Однако потребление белка после голодания быстро возвращает альбумин, преальбумин и комплемент 3 к нормальным значениям.

Голод вызывает выброс альдостерона и чрезмерное выделение аммиака, кальция, магния и калия с мочой. Напротив, экскреция фосфора с мочой снижается. После кратковременного голодания в течение 14 часов концентрации в крови ацетоацетата,  $\beta$ -гидроксибутирата, лактата и пирувата начинают расти. Длительное голодание, продолжающееся в течение 40-48 часов, приводит к 30-кратному увеличению  $\beta$ -гидроксибутирата. По сообщениям, голодание в течение 4 недель значительно увеличивало АСТ, креатинин и мочевую кислоту (20-40%) и снижало ГГТ, триглицериды и мочевины (20-50%). При достаточном потреблении калорий организм начинает восстанавливать компоненты крови до концентрации перед голоданием.

В 1989 году доктор Стивен ДеФеличе ввел термин «nutraceutical» от двух слов «nutrition» и «pharmaceutical». Согласно Американской нутрицевтической ассоциации, нутрицевтики включают функциональные продукты с полезными для здоровья и предотвращающими заболевания преимуществами. В этой области отсутствуют строгие исследования безопасности и эффективности. Фармакокинетические свойства коммерчески доступных нутрицевтиков еще предстоит выяснить. Согласно исследованиям,

100 миллионов людей только в Америке регулярно используют пищевые добавки. Хотя нутрицевтики обладают фармакологическим эффектом, пациенты не считают их «лекарственными препаратами» и часто не раскрывают информацию об использовании своим врачам [Hennessy M. et al., 2002]. Как нутрицевтики, так и обычные лекарства оказывают фармакологический эффект в организме, что требует более тщательного изучения. Немногие исследования документировали фармакокинетику нутрицевтиков и их влияние на результаты исследований биологических веществ в венозной крови. [Cohen P., 2012]. Исследования показали, что диета с высоким содержанием белка может привести к гиперальбуминемии и повышению концентрации АСТ и АЛТ. Активность альбумина и печеночных ферментов нормализовалась после прекращения приема препаратов с высоким содержанием белка. Широко используемый в качестве антидепрессанта зверобой (*Hypericum perforatum*) заметно нарушает метаболизм назначаемых лекарств. Зверобой является мощным индуктором Р-гликопротеина и цитохрома Р450 3А4 (СYP3А4) и, в меньшей степени, СYP1А2 и СYP2С9 [Hennessy M. et al., 2002]. Совместное применение зверобоя значительно изменяет концентрации циклоспорина (отторжение трансплантата), индинавира (ингибитор ВИЧ) и дигоксина (переносчик Р-гликопротеина) [John A. et al., 1999]. Маточное молочко, вырабатываемое особыми железами некоторых пчел, является богатой питательными веществами пищей для пчелиных маток. Есть данные что у пожилых проходящих курс терапии варфарином, развилась гематурия и повышенное МНО (7,29) после приема добавок маточного молочка в течение 1 недели. Механизмы, с помощью которых маточное молочко усиливает действие варфарина, не ясны. Валериана, назначаемая по своим антидепрессантным свойствам, вызывает острую гепатотоксичность и повышение уровня АЛТ, АСТ и ГГТ.

По данным литературы у лиц старше 60 лет по сравнению с более молодыми на фоне нарушения питания было констатировано достоверное

увеличение индекса массы тела, обхвата талии и бедер, жировой массы, висцерального жира, уменьшение мышечной массы, снижение энерготрат покоя и как следствие повышение концентрации холестерина, триглицеридов, глюкозы, мочевой кислоты и снижение железа, фолиевой кислоты в сыворотке крови на фоне повышенного уровня артериального давления и сниженной минеральной плотности костной ткани [Пузин С. Н., Погожева А. В., Потапов В. Н., 2018]. По мере старения потребность в энергии уменьшается. В среднем люди старше 60 лет расходуют на 1/3 меньше калорий, чем более молодые, в результате снижения основного обмена вследствие уменьшения мышечной массы и физической активности. В связи с этим энергетическая ценность их рациона должна быть меньше, чем в других возрастных группах, при сбалансированном соотношении белков, жиров и углеводов. Также актуален вопрос о содержании белка в рационе лиц старше 60 лет. Известно, что как избыток, так и недостаток белка в рационе может вызвать патологические изменения в организме. Недостаток белка приводит к нарушению гормонального статуса, функционирования печени, синтеза ферментов, участвующих в обмене макро- и микронутриентов, антител, к прогрессирующей потере мышечной массы при саркопении. Избыточное потребление белка негативно влияет на функцию почек, пищеварительную и нервную систему, способствует канцерогенезу [Гальченко А. В., Морозова Л. Д., Залетова Т. С., 2017]. Однако рекомендации Всемирной организации здравоохранения по содержанию белка в рационе пожилых людей независимы от возраста или пола. Согласно этим рекомендациям, ежедневное потребление белка должно составлять 0,8 г на 1 кг массы тела [WHO, 2007]. Данные рекомендации, построенные по единому возрастному принципу и определяющие количество белка в рационе, не учитывают связанные с возрастом изменения метаболизма, иммунитета, уровня гормонов или нередко возникающую недостаточность питания. Недостаточное поступление с пищей белка по сравнению с физиологическими потребностями лиц старше 60 лет может привести к потере массы тела, особенно мышечной. В результате

пожилые люди имеют значительно более высокий риск возникновения таких заболеваний, как саркопения и остеопороз, чем лица более молодого возраста. В свою очередь саркопения и остеопороз могут нанести большой ущерб пожилым людям, увеличивая частоту падений и переломов, инвалидности и смерти. Эти условия также увеличивают финансовые затраты в системе здравоохранения. Таким образом рацион питания может играть существенную роль в достоверности результатов исследования биологических веществ в крови, особенно у лиц пожилого возраста.

## **1.8 Влияние физической активности на результаты исследований**

Влияние физических упражнений на результаты исследований венозной крови варьирует и сильно коррелирует с состоянием здоровья человека температурой и потреблением пищи. Изменения в функции щитовидной железы происходят во время упражнений высокой интенсивности. Анаэробные упражнения вызывают увеличение Т4, свободного Т4 и тиреотропного гормона и снижение Т3 и свободного Т3 [Ciloglu F. et al., 2005]. Физические упражнения значительно изменяют объем плазмы в результате потери объема жидкости из-за потоотделения и сдвигов жидкости между внутрисосудистыми и интерстициальными отделами тела. Упражнения уменьшают содержание эритроцитов и лейкоцитов в моче, а также объем мочи, увеличивая при этом экскрецию белка с мочой. Повышенный уровень белка в моче нормализуется в течение 24–48 часов. После упражнений происходит временное увеличение лейкоцитов, гематокрита и тромбоцитов параллельно с изменениями электролитов (уровень калия в сыворотке уменьшается на 8%), которые присутствуют из-за измененной гидратации и нормализуются при регидратации. Регулярные активные упражнения повышают уровень ЛПВП и снижают уровень триглицеридов, ЛПОНП и ЛПНП. АСТ, АЛТ, ЛДГ, креатининкиназа (КК) и миоглобин значительно увеличиваются после силовых упражнений и могут оставаться повышенными в течение до 7 дней после тренировки [Pettersson J. et al., 2008]. Эти данные



подчеркивают важность воздержания от поднятия тяжестей до проведения исследований крови.

У пожилых людей физическая активность как правило снижена. По данным статистики пожилые люди относятся к наиболее физически неактивным слоям общества [Paterson D. H., Warburton D. E., 2010]. При старении происходит потеря мышечной массы от 0,5% до 1% в год [Mitchell W. K. et al., 2012], что также вносит вклад в изменение биохимических показателей крови. При снижении физической активности наблюдается повышение уровня общего холестерина и ЛПНП. Таким образом физическая активность является немало важным фактором для результатов биохимических исследований в том числе и у пожилых людей.

### **1.9 Влияние биоритмов человека на результаты исследований**

Предсказуемые закономерности изменения во времени определенных веществ, отражающие закономерности потребностей человека, составляют биологические ритмы. Разные исследуемые вещества имеют разные ритмы, от нескольких часов до нескольких месяцев. Осведомленность о таких изменениях может помочь в правильной интерпретации результатов исследований. Эти изменения можно разделить в зависимости от временного интервала их завершения. В течение 24-часового периода метаболической активности человека определенные тесты будут колебаться между максимальным и минимальным значением. Амплитуда изменения этих циркадных ритмов определяется как половина разницы между максимальным и минимальным значениями. Хотя, как правило, эти вариации происходят последовательно, изменение этих естественных циркадных ритмов может быть вызвано искусственными изменениями циклов сна / бодрствования, такими как изменения, вызванные различными сменами работы. Следовательно, у человека, работающего в ночную смену, повышенный уровень железа в крови, взятый в полночь, будет нормальным для этого

человека; однако, норма для высоких уровней железа должна быть замечена только рано утром.

Паттерны биологической изменчивости, происходящие на циклах менее 24 часов, известны как ультрадианные ритмы. Вещества, которые выделяются пульсирующим образом в течение дня, показывают эту закономерность. Тестостерон, который обычно достигает максимума между 10:00 и 17:00, является примером вещества, показывающего эту картину. Последний образец биологической изменчивости – инфрарадный. Он включает в себя циклы более 24 часов. Наиболее часто упоминаемый пример – месячный менструальный цикл, который занимает приблизительно 28-32 дня. Такие компоненты, как гонадотропин гипофиза, гормоны яичников и простагландины, значительно подвержены влиянию этого цикла.

Биоритмы меняются в онтогенезе; они могут меняться как у детей, так и у пожилых людей. Согласно данным литературы нарушения циркадных ритмов чаще наблюдался у пожилых людей [Weinert D., 2000]. Источником возрастных изменений биоритмов может быть возрастное нарушение восприятия световых стимулов, включая уменьшение количества клеток сетчатки и нейронов в супрахиазматическом ядре. Поскольку различные опубликованные данные демонстрируют индивидуальные различия в изменениях, циркадные ритмы могут зависеть также от качества жизни исследованных лиц. Также есть предположения, что качество биоритмов является прогностическим фактором долголетия, поскольку потеря временной структуры у пожилых людей связана с плохим состоянием здоровья и сокращением продолжительности жизни, а также характеризуется уменьшением циркадной амплитуды [Berger J., 2003]. Исходя из приведенных выше данных можно сделать вывод о возможности влияния биоритмов на результаты исследований венозной крови, также стоит учитывать более частое нарушение циркадных ритмов у пожилых людей, что поможет избежать неправильной интерпретации результатов.

## Заключение

Таким образом, из приведенного обзора литературы следует, что возраст человека как фактор преаналитического этапа биохимических исследований имеет важное значение для дальнейшей валидации результатов, однако в доступной литературе мало данных по данной теме. Таким образом актуальность настоящего исследования обусловлена важностью понимания геронтологических аспектов и ключевых закономерностей биологических процессов преаналитического этапа биохимических исследований.

Дальнейшее изучение эндогенных и экзогенных факторов преаналитического этапа лабораторных исследований позволит создать и проработать алгоритмы оценки смещения концентрации исследуемых веществ в венозной крови человека на преаналитическом этапе, что существенно повысит качество диагностики и лечения в целом.

## ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материал для исследований

Исследование проводили на базе клинико-диагностической лаборатории СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2». Для работы было исследовано 58136 образцов крови людей в возрасте от 21 года до 94 лет, проходивших плановое лечение в стационаре.

Критериями исключения являлись диабет, онкологические и аутоиммунные заболевания.

I. Исследование оценки влияния возрастного фактора на стабильность биологических веществ в венозной крови с учетом температурного и временного режимов хранения образцов проведено в два этапа:

1. Исследование изменений уровня биохимических веществ крови при различных условиях хранения биоматериала с учетом клинической значимости (сравнение величин критической разницы (Reference Change Value – RCV)).

2. Исследование влияния возраста человека на уровень биохимических веществ в крови при хранении биоматериала, анализ клинической значимости (RCV), так как величина статистической значимости не всегда оказывает влияние на принятие клинических решений.

II. Исследование оценки влияния эндогенных факторов (характеристик клеток крови) на стабильность концентрации глюкозы в различных возрастных группах проведено в два этапа:

1. Исследование корреляционной зависимости влияния гематологических показателей на изменения уровня глюкозы.

2. Сравнительный статистический анализ смещений уровня глюкозы при разделении общей выборки проб на 3 равные части (терцели) в зависимости от величины каждого исследуемого показателя.

III. Оценка влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб, поступающих в лабораторию, проведена в четыре этапа:

1. Анализ количества гемолизированных проб аппаратным и визуальным методом для определения приемлемого метода детекции.

2. Исследование влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб.

3. Ретроспективная оценка влияния возраста на количество проб с критическими значениями уровня калия (K<sup>+</sup>) и натрия (Na<sup>+</sup>) как одних из наиболее чувствительных к гемолизу исследуемых веществ.

4. Оценка эффективности разработанных методических рекомендаций по индивидуальному подбору игл для венепункции у лиц пожилого и старческого возраста.

Биохимические исследования проведены на автоматическом биохимическом анализаторе Abbott Architect c8000 реактивами производителя оборудования.

Гематологические исследования проведены на автоматическом гематологическом анализаторе Abbott CELL-DYN Ruby реактивами производителя оборудования.

В целях данного исследования полученная выборка разделялась на 4 группы согласно возрасту: 1 группа – люди в возрасте от 21 до 34 лет (средний возраст I половина); 2 группа – люди в возрасте от 35 до 59 лет (средний возраст II половина); 3 группа – люди в возрасте от 60 до 74 лет (пожилой возраст); 4 группа – люди в возрасте от 75 лет и старше (старческий возраст).

## **2.2 Методология и методы исследования при оценке влияния возрастного фактора на стабильность биологических веществ в крови человека**

### **2.2.1 Исследование изменений уровня биохимических веществ крови при различных условиях хранения биоматериала с учетом клинической значимости (RCV)**

Отобрано 60 образцов крови от 30 человек в возрасте от 40 до 94 лет, проходивших плановое лечение в стационаре. Материал был собран в пробирки типа Vacutainer с активатором свертывания крови. Пробы подвергались центрифугированию при 1200g 10 мин что соответствует ГОСТ Р53079.4 – 2008. Далее образцы для достижения цели исследования разделили на две группы: 1-я группа – образцы сыворотки аликвотировали и исследовали согласно протоколу; 2-я – образцы сыворотки исследовали без аликвотирования (клеточный компонент не отделялся). Необходимые вещества в пробах были исследованы на автоматическом биохимическом анализаторе Abbott Architect c8000 реактивами производителя.

Данные, которые были получены при первом исследовании, приняты за нулевую точку. Затем образцы были помещены в соответствующие температурные условия (4, 23 и 30 °С). По прохождению 4, 24, 48, 72 ч для 1-й группы и 4, 8, 24, 48 ч для 2-й группы проводили измерение следующих веществ в пробах: АСТ, АЛТ, глюкоза, билирубин общий, ЛДГ, креатинин, КФК, мочевины, калий, натрий, хлориды, триглицериды, фосфатаза щелочная, общий белок, холестерин.

Метод определения аланинаминотрансферазы (АЛТ) заключался в следующем: присутствующая в образце АЛТ катализирует перенос аминокетогруппы из L-аланина в  $\alpha$ -кетоглутарат с образованием пирувата и L-глутамата. Пируват в присутствии NADH и лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

восстанавливается до L-лактата. В этой реакции NADH окисляется до NAD. В реакции измеряется скорость уменьшения оптической плотности при 340 нм в результате окисления NADH до NAD.

Аспаратаминотрансферазу (АСТ) в образцах определяли по следующей методике: присутствующая в образце АСТ катализирует перенос аминогрупп от L-аспартата до  $\alpha$ -кетоглутарата, образуя оксалоацетат и L-глутамат. В присутствии NADH и малатдегидрогеназы (MDH) оксалоацетат восстанавливается до L-малата. При этой реакции NADH окисляется до NAD. Данная реакция контролировалась измерением скорости понижения оптической плотности при 340 нм ввиду окисления NADH до NAD.

Уровень общего билирубина определялся с помощью реакции билирубина с диазореагентом, с образованием окрашенного соединения азобилирубин. Диазореакция может катализироваться добавлением различных химических веществ. Общий (конъюгированный и неконъюгированный) билирубин соединяется в присутствии сурфактанта с диазореагентом, с образованием азобилирубина. Диазореакция катализируется добавлением сурфактанта в качестве солюбилизирующего агента. Увеличение оптической плотности при 548 нм, вызванное азобилирубином, прямо пропорционально концентрации общего билирубина.

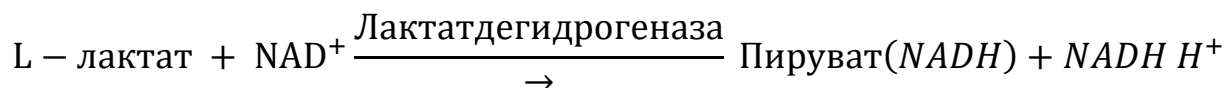
Методика определения уровня глюкозы: в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ) и ионов магния происходит фосфорилирование глюкозы с помощью гексокиназы (HK), в результате чего образуются глюкозо-6-фосфат (G-6-P) и аденозиндифосфат (ADP). Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G-6-PDH) специфически окисляет G-6-P до 6-фосфоглюконата с одновременным восстановлением никотинамидаденин динуклеотида (NAD) до восстановленного никотинамидаденин динуклеотида (NADH). На каждый микромоляр глюкозы образуется один микромоляр NADH. Увеличение оптической плотности, связанное с образованием NADH, измеряли спектрофотометрически при 340 нм.

Электролиты (K, Na, Cl) определяли ион селективным методом. В ионоселективных электродах для натрия, калия и хлорида используются мембраны, селективные для каждого из этих ионов. Электрический потенциал (напряжение) развивается через мембраны между электродом сравнения и измерительным электродом в соответствии с уравнением Нернста. Напряжение сравнивается с ранее определенными напряжениями калибратора и преобразуется в концентрацию ионов.

Методика определения уровня креатинина: при щелочной рН среде креатинин в образце реагирует с пикратом, образуя комплекс креатинин-пикрат. Скорость увеличения оптической плотности при 500 нм в результате образования этого комплекса прямо пропорциональна концентрации креатинина в образце.

Креатинфосфокиназа в образцах определялась следующим образом. Креатинкиназа (КК), присутствующая в образце, катализирует перенос высокоэнергетической фосфатной группы с креатинфосфата на АДФ. При этом образуется АТФ, который затем участвует в фосфорилировании глюкозы и образовании глюкоза-6-фосфата (G-6-P) в присутствии гексокиназы. Затем G-6-P окисляется с помощью глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (G-6-PDH) с одновременным восстановлением никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADP) до никотинамидадениндинуклеотидфосфата, восстановленного (NADPH). Скорость образования NADPH, определяемая при 340 нм, пропорциональна активности КК в образце. Эти реакции происходят в присутствии N-ацетил-L-цистеина (NAC), который является ферментным реактиватором.

Лактатдегидрогеназа. Лактатдегидрогеназа является ферментом, переносящим водород, который катализирует окисление L-lactate в пируват с участием NAD<sup>+</sup> в качестве акцептора водорода.





Таким образом данным методе использовалась рекомендуемая IFCC прямая реакция - лактат в пируват.

Использованный в исследовании метод определения уровня мочевины является модификацией полностью ферментативного исследования, впервые описанного Talke и Schubert [Talke H., Schubert G. E., 1965]. Тест включает кинетическое измерение, в котором начальная скорость реакции сохраняет линейность в течение ограниченного периода времени. Мочевина в образце гидролизуется уреазой с образованием аммиака и диоксида углерода. Во второй реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой (GLD), аммиак и  $\alpha$ -кетоглутарат превращаются в глутамат и воду с одновременным окислением восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH) до никотинамидадениндинуклеотида (NAD). На каждый моль мочевины окисляются два моля NADH. Первичное уменьшение оптической плотности, измеряемой при 340 нм, пропорционально концентрации мочевины в образце.

Для определения уровня общего белка использовался биуретовый метод. Полипептиды, содержащие по крайней мере две пептидные связи, вступают в реакцию с биуретовым реагентом. В физиологическом растворе ион меди образует координационный комплекс с белковым азотом с очень незначительной разницей между альбумином и глобулином на белково-азотистой основе.

Уровень триглицеридов определяли глицеринфосфатоксидазным методом. Под воздействием липазы происходит ферментный гидролиз триглицеридов, что приводит к высвобождению жирных кислот и глицерина. Глицерин фосфорилируется аденозинтрифосфатом (АТФ) под действием глицерокиназы (ГК), образуя глицерин-3-фосфат и аденозиндифосфат (АДФ). Глицерин-3-фосфат окисляется глицеринфосфатоксидазой (ГФО) до дигидроксиацетон фосфата (ДАФ), образуя пероксид водорода ( $H_2O_2$ ). В цветной реакции, катализируемой пероксидазой,  $H_2O_2$  реагирует с 4-аминоантипирином (4-ААП) и 4-хлорфенолом (4-ХФ), образуя краситель

красного цвета. Оптическая плотность красителя пропорциональна концентрации триглицеридов, присутствующих в образце.

Для определения активности щелочной фосфатазы было использовано несколько субстратов, таких как: глицерофосфат, фенилфосфат и р-нитрофенил фосфат. Щелочная фосфатаза в образце катализирует гидролиз бесцветного р-нитрофенил фосфата (р-NPP), образуя р-нитрофенол и неорганический фосфат. При рН методики (щелочная среда) р-нитрофенол находится в желтой феноксидной форме. Скорость увеличения оптической плотности при 404 нм прямо пропорциональна активности щелочной фосфатазы в образце. Оптимизированные концентрации ионов цинка и магния присутствуют для активации щелочной фосфатазы в образце.

Уровень холестерина в образцах определяли ферментативным методом. Эфиры холестерина гидролизуются под воздействием фермента холестеринэстеразой до холестерина и свободных жирных кислот. Свободный холестерин, включая исходный, окисляется холестеролоксидазой до холест-4-эн-3-он и пероксида водорода. Пероксид водорода взаимодействует с гидроксibenзойной кислотой (HBA) и 4-аминоантипирином, образуя хромофор (краситель хинонэмин), определяемый количественно при 500 нм.

Оценка клинической значимости изменений уровня концентрации веществ выполнена на основании сравнения величин критической разницы (Reference Change Value - RCV). RCV рассчитывался по следующей формуле:  $RCV = \sqrt{2} * Z * \sqrt{CVa^2 + CVi^2}$ , где CVa - долгосрочный коэффициент вариации исследуемых веществ (260 точек), полученный из данных внутрилабораторного контроля, а CVi - коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации для исследуемого вещества [Steindel, Howanitz, 2001]. Z – уровень доверительной вероятности, для 95% = 1,96. (80% = 1,28) Данные, по которым вычислялся RCV, представлены в таблице 1.

## RCV для исследуемых веществ

Вещество	CV (долгосрочный), %	CV внутри индивидуальный*	RCV 95%, %	RCV 80%, %
АЛТ	3,1	19,4	54,4	35,6
АСТ	2,3	12,3	34,7	22,7
Билирубин общий	4,1	21,8	61,5	40,2
Глюкоза	2,5	5,6	17,0	11,1
Калий	1,7	4,6	13,6	8,9
Креатинин	2,8	6,0	18,3	11,9
КФК	2,4	22,8	63,5	41,5
ЛДГ	4,0	8,6	26,3	17,2
Мочевина	3,1	12,1	34,6	22,6
Натрий	1,4	0,6	4,3	2,8
Общий белок	1,3	2,8	8,4	5,5
Триглицериды	1,7	20,0	55,4	36,2
Фосфатаза щелочная	3,9	6,5	20,9	13,6
Хлор	2,9	1,2	8,6	5,6
Холестерин	1,3	6,0	16,9	11,1

\*<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

После получения результатов для оценки изменения уровня концентрации веществ был проведен анализ с использованием формулы для определения статистической погрешности в показаниях средства измерения:

$$B = \frac{X_i - ЦЗ}{ЦЗ} * 100\%, \text{ где } B \text{ смещение, } X_i \text{ - значение концентрации исследуемого}$$

вещества у каждого человека, ЦЗ - целевое значение. В данном случае за ЦЗ принималось значение показателя каждого человека на нулевой точке измерения.

Статистическая обработка результатов исследования проведена при помощи пакета программ статистической обработки «Statistica 10.0» и программы «Microsoft Office Excel». Показатели проверяли на соответствие нормальному распределению с применением критерия Шапиро-Уилка. Для определения статистической значимости различий между двумя связанными группами был использован критерий Вилкоксона для непараметрических выборок. Пороговое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

2.2.2. Исследование влияния возраста человека на уровень биохимических веществ в крови при хранении биоматериала, анализ клинической значимости (RCV).

Для достижения цели исследования были сформированы 3 группы по 40 образцов согласно возрасту каждого человека: группа 1 - образцы венозной крови людей в возрасте от 35 до 59 лет (средний возраст II половина); группа 2 - образцы венозной крови людей в возрасте от 60 до 74 лет (пожилой возраст); группа 3 - образцы венозной крови людей старше 75 лет (старческий возраст). Таким образом, изучено 120 образцов крови от 60 человек в возрасте от 35 до 84 лет, проходивших лечение в стационаре. Сразу после центрифугирования в образцах венозной крови были измерены уровни калия и глюкозы, эти данные приняты за нулевую точку измерений. Затем образцы были разделены на группы согласно температурным условиям хранения +4 и +23 °С соответственно.

После 24 и 48 часов хранения проводили измерения уровня глюкозы и калия в пробах. Методы определения концентрации веществ и способы обработки данных были описаны выше.

### **2.3 Методология и методы исследования оценки влияния эндогенных факторов (характеристик клеток крови) на стабильность концентрации глюкозы в различных возрастных группах**

При исследовании влияния эндогенных факторов на уровень концентрации веществ в пробах сыворотки крови различных возрастных групп на примере глюкозы было отобрано 115 образцов крови от людей в возрасте от 21 до 90 лет, находившихся на плановом лечении в стационаре на базе офтальмологического, терапевтического и хирургического отделений СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», в пробирках типа Vacutainer с активатором свертывания крови. Критериями исключения являлись патологические показатели крови при онкологических заболеваниях.

Пробы были подвергнуты центрифугированию при 1200 g 10 минут согласно ГОСТ Р 53079.4 – 2008. Исследование включало два этапа. На первом была проведена оценка корреляционной зависимости влияния гематологических показателей на изменения уровня глюкозы. Для оценки влияния использовались такие гематологические параметры, как скорость оседания эритроцитов (СОЭ), количество лейкоцитов (WBC), количество нейтрофилов (NEUT), процентное содержание нейтрофилов (NEUT%), количество лимфоцитов (LYM), процентное содержание лимфоцитов (LYM%), количество моноцитов (MON), процентное содержание моноцитов (MON%), количество эозинофилов (EOS), процентное содержание эозинофилов (EOS%), количество базофилов (BAS), процентное содержание базофилов (BAS%), содержание гемоглобина (HGB), гематокрит (HCT), количество эритроцитов (RBC), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), средний объем эритроцита (MCV), коэффициент вариации распределения эритроцитов по объему (RDW-CV), количество тромбоцитов (PLT), тромбоцитрит (PCT), средний объем тромбоцитов (MPV), распределение тромбоцитов по объему (PDW). Интерпретация коэффициента корреляции производилась исходя из уровня силы связи:  $0,01 \leq r \leq 0,29$  – слабая связь,  $0,30 \leq r \leq 0,69$  – средняя связь.

Для определения вышеупомянутых параметров использовался гематологический анализатор CELL-DYN Ruby. Работа данного анализатора основана на технологии проточной цитометрии, которая используется для исследования эритроцитов/тромбоцитов, лейкоцитов и оптического подсчета ядер.

Проточная цитометрия представляет собой процесс, при котором каждая отдельная клетка или другая биологическая частица, выстроенные в один ряд в потоке жидкости, сосчитываются при прохождении через луч света. Датчики измеряют физические и химические характеристики клеток или частиц по снижению интенсивности света и его рассеиванию. Проточная цитометрия

позволяет быстро пропустить большое количество клеток и выполнить количественное исследование клеток, выстроенных в один ряд.

Принцип метода заключается в следующем:

Источником вертикально поляризованного света является гелий-неоновый лазер мощностью 10 милливатт с длиной волны 632,8 нм. Лазерный луч проходит через цилиндрические линзы, которые изменяют форму луча с круглой формы до эллипсообразной. Затем луч пропускается через щель 125 микрометров, которая отсекает внешние границы. В результате этой процедуры луч становится однородным по интенсивности приблизительно 80 микрометров шириной, в результате чего поток клеток слегка отклоняет его в проточной кювете, но на поток клеток попадает свет все той же интенсивности. Зеркальные линзы центрируют сфокусированный лазерный луч внутри кварцевой проточной кюветы.

Шприц подачи образца впрыскивает различные разведения образца в поток фокусирующего реактива в оптической проточной кювете. Образец подвергается гидродинамической фокусировке до тонкого потока примерно 30 микрометров в диаметре. Этот сфокусированный поток заставляет выстраиваться клетки в один ряд, в таком виде они пересекают луч света, что позволяет измерять клетки по отдельности системой детекторов.

Так как средний диаметр клеток меньше сфокусированного луча, то клетки не сильно рассеивают лазерный свет. Ослабленный нерассеянный свет улавливается детекторами  $0^\circ$  и  $10^\circ$  (расположенными спереди по ходу луча) и усиливается электроникой. Затемненная пластина блокирует прямолинейно нерассеянный луч света под углом  $0^\circ - 1^\circ$ . Прямолинейно рассеянный свет направляется на перфорированное зеркало. Рассеянный под углом  $0^\circ$  ( $1^\circ - 3^\circ$ ) свет проходит через зеркало на фотодиодный кремниевый детектор  $0^\circ$ . Рассеянный под углом  $10^\circ$  ( $7^\circ - 10^\circ$  или меньший угол) свет отражается от зеркала на фотодиодный кремниевый детектор  $10^\circ$ .

Рассеянный под прямым углом свет направляется через щель шириной 700 микрометров, которая блокирует рассеивание от стенок проточной кюветы. Разделитель луча разделяет рассеянный под прямым углом свет на две части. Одна часть направляется на фотоумножительную трубку (ФУТ)  $90^\circ$ . Другая часть пропускается через горизонтальный поляризатор. Только тот свет, который изменился под влиянием поляризации (деполяризованный свет) может пройти через поляризатор на ФУТ  $90^\circ$  деполяризованного света.

Световые сигналы, собираемые каждым из детекторов, преобразуются в электрические сигналы или импульсы. Импульсы оцифровываются в зависимости от интенсивности и сортируются в 256 каналах для каждого угла измеренного света.

Если импульс выше порога чувствительности в детекторах  $0^\circ$  и  $10^\circ$ , клетка, давшая этот импульс, сосчитывается и принимается для последующей обработки. Импульсы, ниже порога чувствительности, исключаются из подсчета.

Информация, получаемая от каждого детектора, собирается в режиме перечня. Этот формат сохраняет информацию от каналов по каждому из четырех измерений. Затем данные используются для определения лейкоцитарной формулы и для подсчета эритроцитов, тромбоцитов и оптического подсчета ядер.

В проточном цитометре клеточная суспензия подается из камеры смешивания по системе трубок в специальную проточную камеру. Затем суспензия впрыскивается в поток жидкости, не содержащей клеток, движущийся с большой скоростью (фокусирующий раствор). Так как два вида жидкости движутся с разной скоростью, они не перемешиваются. Особая геометрическая форма проточной кюветы и большая скорость фокусирующего раствора заставляют выстраиваться клетки в один ряд. Этот процесс называется гидродинамической фокусировкой.

Когда клетки поступают в специальную просмотровую зону, они пересекаются с лазерным лучом. Разные типы клеток рассеивают свет лазера под разными углами, тем самым, давая информацию о размере клетки, внутренней структуре, зернистости и морфологии поверхности. Оптические сигналы от клеток улавливаются и преобразуются в электрические импульсы, которые сохраняются и обрабатываются компьютером.

В основном проточные цитометры измеряют два угла рассеивания. Направленный вперед угол рассеивания света служит для измерения размера клетки. Боковой угол (перпендикулярный) рассеивания света служит для исследования поверхности клетки и ее внутренней структуры, но в основном – для измерения внутренней зернистости (гранулярности). Сочетание информации от двух измеренных направлений рассеивания позволяют проводить более точную дифференцировку между популяциями клеток, нежели от одного измерения.

Оптический канал служит для исследования лейкоцитов. В процессе аспирации порция образца объемом 20 мкл отделяется в распределительном клапане для исследования лейкоцитов. Шприц лейкоцитов диспенсирует 0,973 мл лизирующего реактива для лейкоцитов в распределительный клапан. Образец и лизирующий реактив поступают в камеру смешивания лейкоцитов/нагреватель лейкоцитарного оптического канала, где происходит перемешивание разведения, давая в конечном итоге степень разведения 1:50.

Насос подачи образца подает разведение лейкоцитов из камеры смешивания в подающую насадку в оптической проточной кювете. В то же время фокусирующий реактив под действием постоянного давления, имеющегося в резервуаре фокусирующего реактива, подается в насадку фокусирующего реактива в оптической проточной кювете и впрыскивается в кювету. Одновременно с этим мерный шприц образца впрыскивает 46,5 мкл разведения лейкоцитов внутрь потока фокусирующего реактива. Поток образца проходит гидродинамическую фокусировку, заставляя клетки при



прохождении оптической проточной кюветы (оптически чистая кварцевая камера) выстраиваться в один ряд. Источником вертикально поляризованного света является гелий-неоновый лазер. Эта технология обозначается как MAPSS (многоугловое разделение рассеянного поляризованного света). Различные комбинации этих четырех измерений используются для классификации субпопуляций лейкоцитов и выставления сигнальных знаков морфологии.

Уровень глюкозы в образцах исследовали глюкозооксидазным методом на биохимическом анализаторе Abbott Architect c8000. Данные, полученные при первом исследовании, были приняты за нулевую точку. Уровень глюкозы исследовали через 24 и 48 ч хранения при температуре +4°C. Гематологические параметры определяли на гематологическом анализаторе Abbott CELL-DYN Ruby реагентами производителя оборудования.

Для определения уровня смещения (В%) глюкозы в пробах за 24 и 48 ч была использована формула:  $V = (x_i - ЦЗ) / ЦЗ * 100\%$ , где В – смещение,  $x_i$  – значение концентрации исследуемого вещества каждого человека, ЦЗ – целевое значение, которым было принято значение уровня глюкозы каждого человека на нулевой точке измерения. При оценке значимости смещения учитывались значения неопределенности измерений (НИ) для каждой аналитической системы по формуле:  $НИ = \sqrt{CV^2 + d(B)^2 + \frac{|B|}{\sqrt{3}}}$ , где CV – коэффициент вариации внутрिलाбораторного контроля качества за 6 мес.; d(B) – среднеквадратичное отклонение относительной величины смещения по данным внешней оценки качества за тот же период;  $|B^-|$  – абсолютное значение среднего смещения по данным внешней оценки качества за тот же период (6 мес).

На втором этапе проведен сравнительный статистический анализ смещений уровня глюкозы при разделении общей выборки проб на 3 равные

части (терцели) в зависимости от величины каждого исследуемого показателя. (таблица 9).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась при помощи пакета программ статистической обработки «IBM SPSS Statistics» и «Microsoft Office Excel». Все показатели проверялись на соответствие нормальному распределению по критерию Колмогорова-Смирнова. Для определения статистической значимости различий между двумя группами использовался критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Пороговое значение уровня значимости принимали  $p \leq 0,05$ . Корреляционная зависимость оценивалась по критерию Спирмена для непараметрических данных.

## **2.4 Оценка влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб, поступающих в лабораторию**

### **2.4.1. Анализ количества гемолизированных проб аппаратным и визуальным методом для определения приемлемого метода детекции**

При проведении оценки проблем выявления гемолизированных проб на преаналитическом этапе биохимических исследований венозной крови проанализировано 3500 проб крови людей, проходящих плановое лечение в условиях стационара. В работе использовали два основных метода оценки гемолиза: визуальный и инструментальный. С помощью каждого метода проводили исследование всех образцов сыворотки и плазмы крови в течение месяца. Степень гемолиза измеряли инструментальным методом на автоматическом анализаторе Abbott Architect c8000 с использованием специального протокола для HIL-индексов.

Определение индексов интерференции в образцах включало снятие характеристик образца при различных длинах волн после разбавления изотоническим раствором. В результате получали полуколичественные

значения индекса и качественную оценку присутствия гемолиза в образцах сыворотки.

В связи с тем, что гемолиз является следствием преаналитических ошибок, наряду с визуальной оценкой степени гемолиза была проведена оценка следующих параметров: отсутствие прокола в крышке пробирки, нарушенное соотношение кровь/антикоагулянт, пенообразование, сгустки.

Для верификации эффективности визуальной оценки гемолиза проведен опрос сотрудников лаборатории. Использовали 10 сывороток с различной степенью гемолиза, предварительно измеренных полуколичественно аппаратным методом по 5-балльной шкале от 0 до 4+. Современные технологии позволяют вместо визуальной оценки применять биохимические анализаторы с функцией качественного и полуколичественного определения гемолиза в сыворотке или плазме крови. Индексы интерференции в образцах применяют для получения полуколичественного измерения и качественной оценки присутствия гемолиза в образцах сыворотки или плазмы крови. Определение индексов интерференции в образцах включает снятие характеристик образца при разных длинах волн. Результаты исследования, полученные этим методом, отображаются в виде полуколичественных значений с возможностью указания качественной интерпретации (1+, 2+ и т.д.)

Для сравнения полученных результатов с визуальным методом мы также использовали метод 6 $\sigma$ . Минимальное требование для процессов в промышленности 3 $\sigma$ , что составляет 6,68% дефектов от общего количества (таблица 2). В системе здравоохранения способность процессов на уровне от 3,6 сигм рассматривается в качестве приемлемой [Choppin J., 1995].

Таблица 2.

## Количество дефектов по методу «Шесть сигм» \*

Уровень сигма	Количество дефектов на миллион	Количество дефектов на тысячу	% дефектов от общего количества.
6	3,4	0,0034	0,00034%
5	233	0,233	0,0233%
4	6210	6,210	0,621%
3	66807	66,807	6,68%
2	308537	308,537	30,85%
1	691462,5	691,462,5	69,15%

\* [https://en.wikipedia.org/wiki/Six\\_Sigma](https://en.wikipedia.org/wiki/Six_Sigma)

2.4.2. Исследование влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб

Для оценки возрастного фактора проведено проспективное исследование на 19864 пробах крови человека, поступающих в лабораторию ГМПБ №2 г. Санкт – Петербурга в течении 6 месяцев. Вся выборка была поделена на 4 группы согласно возрасту: 1 группа – люди в возрасте от 21 до 34 лет (средний возраст I половина); 2 группа – люди в возрасте от 35 до 59 лет (средний возраст II половина); 3 группа – люди в возрасте от 60 до 74 лет (пожилой возраст); 4 группа – люди в возрасте от 75 лет и старше (старческий возраст). После чего был произведен расчет доли гемолизированных проб за каждый месяц в каждой возрастной группе. Наличие гемолиза определялось аппаратным методом на автоматическом биохимическом анализаторе Abbott architect c8000. Далее для сравнения долей, полученных в возрастных группах, применили критерий Манна – Уитни как метод статистической обработки для непараметрических данных в несвязанных группах. Также была рассчитана ранговая корреляция (по методу Спирмена) количества гемолизированных

образцов и возраста человека. Для статистической обработки использовался пакет программ IBM SPSS Statistics и MS Excel.

2.4.3. Ретроспективная оценка влияния возраста на количество проб с критическими значениями уровня калия (K<sup>+</sup>) и натрия (Na<sup>+</sup>)

Ретроспективно проведена оценка количества проб с критическими значениями уровня K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup> как одних из наиболее чувствительных к гемолизу исследуемых веществ. Выборка состояла из 33653 образцов, поступающих в лабораторию ГМПБ №2 г. Санкт – Петербурга. Вся выборка была поделена на 4 группы согласно возрасту: 1 группа – люди в возрасте от 21 до 34 лет (средний возраст I половина); 2 группа – люди в возрасте от 35 до 59 лет (средний возраст II половина); 3 группа – люди в возрасте от 60 до 74 лет (пожилой возраст); 4 группа – люди в возрасте от 75 лет и старше (старческий возраст). После чего был произведен расчет доли высоких и низких критических значений [Волчков В. А. и др., 2019] в каждой возрастной группе. Далее для сравнения величин уровня электролитов в возрастных группах применили критерий Манна – Уитни как метод статистической обработки для непараметрических данных в несвязанных группах.

2.4.4. Оценка эффективности разработанных методических рекомендаций по индивидуальному подбору игл для венепункции у лиц пожилого и старческого возраста.

Для оценки эффективности внедренных методических рекомендаций по индивидуальному подбору игл для венепункции у лиц пожилого и старческого возраста на наличие гемолиза проанализировано первично (до внедрения методики) 576 образцов в течении 1 рабочей недели, вторично (после внедрения методики) через календарный месяц исследовано 485 проб в течении 1 рабочей недели.

Методика индивидуального подбора игл для флеботомии у лиц пожилого и старческого возраста основана на визуальной оценке состояния

вен, далее происходил подбор средств венепункции по следующим критериям:

1. Если при визуальной оценке средняя локтевая вена легко обнаруживается и ее диаметр больше 5 мм, следует использовать иглы от 1,2 мм (G18) до 0,9 мм (G20); 2. Если при визуальной оценке диаметр вены от 3 до 5 мм, следует использовать иглы от 0,7 мм (G22) до 0,9 мм (G20); 3. Если при визуальной оценке диаметр вены от 2 мм и меньше, следует использовать иглы от 0,45 мм (G27) до 0,55 мм (G24); 4. При глубоком залегании локтевых вен и невозможности оценить диаметр вен, целесообразно использовать иглы от G22 до G20 с визуальной камерой.

Все исследованные образцы получены от людей в возрасте от 60 лет и старше, проходящих плановое лечение в стационаре.

Оценка эффективности внедренной методики проводилась по средствам сравнения количества гемолизированных проб при помощи метода бс.

Проведена оценка финансовой целесообразности внедренной методики.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Результаты исследования оценки влияния возрастного фактора на стабильность биологических веществ в венозной крови с учетом температурного и временного режимов хранения образцов проведено в два этапа

3.1.1. Исследование изменений уровня биохимических веществ крови при различных условиях хранения биоматериала с учетом клинической значимости (RCV).

Результаты статистической обработки для 1й и 2й групп приведены в таблице 3 и 4.

Показатели смещения (В, %) для исследуемых веществ в первой группе, представленные в таблице 3, показывают результаты хранения проб сыворотки крови без клеточного компонента. Уровень АЛТ при 4°С изменялся от 1,25% (4ч) до -6,44 (72ч); при 23°С от -1,39% (4ч) до -8,46% (72ч); при 30°С от -1,22 (4ч) до -23,89%(72ч). Уровень АСТ при 4°С изменялся от 2,92% (4ч) до -0,51% (72ч); при 23°С от 2,97% (4ч) до -0,16% (72ч); при 30°С от 3,41% (4ч) до -6,43% (72ч). Уровень общего билирубина изменялся при 4°С от -5,45% (4ч) до -5,23% (72ч); при 23°С от -5,98% (4ч) до -6,25% (72ч); при 30°С от -3,61% (4ч) до -17,09% (72ч). Уровень глюкозы при 4°С изменялся от -3,41% (4ч) до -3,16% (72ч); при 23°С от -4,06% (4ч) до -4,83 (72ч); при 30°С от -5,9% (4ч) до -6,97% (72ч). Уровень калия при 4°С изменялся от 0,31% (4ч) до 0,6% (72ч); при 23°С от 0,88% (4ч) до 1,36% (72ч); при 30°С от 0,46% (4ч) до 1,24% (72ч). Уровень креатинина при 4°С изменялся от 0,39% (4ч) до -1,22% (72ч); при 23°С от 1,62% (4ч) до 0,02% (72ч); при 30°С от 1,13% (4ч) до 0,18% (72ч). Уровень КФК при 4°С изменялся от -1,17% (4ч) до 2,13% (72ч); при 23°С от -0,55% (4ч) до 1,58% (72ч); при 30°С от -0,51% (4ч) до -4,45% (72ч). Уровень ЛДГ при 4°С изменялся от 1,52% (4ч) до -0,69% (72ч); при 23°С от 2,78% (4ч) до 4,99% (72ч); при 30°С от 5,1% (4ч) до 10,33% (72ч).

Таблица 3.

## Показатели среднего смещения (В, %) исследуемых веществ в группе 1

Вещество	4°C				23°C				30°C			
	4ч	24ч	48ч	72ч	4ч	24ч	48ч	72ч	4ч	24ч	48ч	72ч
АЛТ	1,25 ди 95% [0,08;2,41]	-1,72 ди 95% [-3,02;-0,43]	-4,36 ди 95% [-9;0,29]	-6,44 ди 95% [-7,85;-5,03]*	-1,39 ди 95% [-2,87;0,1]	-2,24 ди 95% [-4;-0,48]	-3,63 ди 95% [-5,6;-1,67]	-8,46 ди 95% [-9,61;-7,3]*	-1,22 ди 95% [-2,83;0,4]	-6,31 ди 95% [-8,04;-4,58]*	-13,57 ди 95% [-15,16;-11,98]*	-23,89 ди 95% [-26,17;-21,6]*
АСТ	2,92 ди 95% [1,56;4,28]*	0,29 ди 95% [- 1,36;1,93]	2,74 ди 95% [1,12;4,35]*	-0,51 ди 95% [-1,84;0,83]	2,97 ди 95% [1,85;4,09]*	2,04 ди 95% [0,29;3,8]	0,27 ди 95% [- 1,34;1,88]	-0,16 ди 95% [-2,25;1,93]	3,41 ди 95% [0,95;5,86]*	2,55 ди 95% [0,03;5,07]*	-2,43 ди 95% [-4,47;-0,38]*	-6,43 ди 95% [-8,31;-4,54]*
Билирубин общий	-5,45 ди 95% [-7,87;-3,04]*	-6,87 ди 95% [-9,31;-4,44]*	-5,32 ди 95% [-8,58;-2,21]*	-5,23 ди 95% [-7,63;-2,83]*	-5,98 ди 95% [-7,39;-2,56]*	-6,33 ди 95% [-8,66;-3,01]*	-5,77 ди 95% [-7,46;-2,08]*	-6,25 ди 95% [-8,07;-2,42]*	-3,61 ди 95% [-12,17;4,97]*	-9,07 ди 95% [-11,48;-6,66]*	-11,57 ди 95% [-13,82;-9,32]*	-17,09 ди 95% [-20,22;-13,95]*
Глюкоза	-3,41 ди 95% [-4,79;-2,03]*	-2,6 ди 95% [- 3,88;-1,32]*	-3,12 ди 95% [-4,86;-1,38]*	-3,16 ди 95% [-4,45;-1,86]*	-4,06 ди 95% [-5,62;-2,5]*	-2,94 ди 95% [-4,6;-1,27]*	-4,77 ди 95% [-6,78;-2,75]*	-4,83 ди 95% [-7,71;-1,95]*	-5,9 ди 95% [- 10,25;-1,54]*	-4,65 ди 95% [-6,81;-2,48]*	-7,29 ди 95% [-9,81;-4,78]*	-6,97 ди 95% [-9,51;-4,43]*
Калий	0,31 ди 95% [- 0,22;0,84]	2,07 ди 95% [1,61;2,53]*	2,99 ди 95% [2,24;3,74]*	0,6 ди 95% [0,12;1,08]	0,88 ди 95% [0,48;1,28]	3,13 ди 95% [2,52;3,74]*	3,31 ди 95% [2,67;3,96]*	1,36 ди 95% [0,94;1,77]	0,46 ди 95% [- 0,67;1,58]	2,74 ди 95% [1,97;3,51]*	2,84 ди 95% [1,92;3,77]*	1,24 ди 95% [0,26;2,21]
Креатинин	0,39 ди 95% [- 0,43;1,2]	0,1 ди 95% [- 0,48;0,68]	-0,71 ди 95% [-1,41;-0,01]	-1,22 ди 95% [-1,88;-0,56]	1,62 ди 95% [0,97;2,26]*	0,78 ди 95% [0,32;1,24]	-0,58 ди 95% [-1,34;0,2]	0,02 ди 95% [- 0,67;0,7]	1,13 ди 95% [0,35;1,91]	1,11 ди 95% [0,25;1,97]	-1,2 ди 95% [- 1,82;-0,58]	0,18 ди 95% [- 0,28;0,62]
КФК	-1,17 ди 95% [-1,95;-0,39]	-1,11 ди 95% [-2,06;-0,16]	1,93 ди 95% [0,68;3,18]*	2,13 ди 95% [1,46;2,8]*	-0,55 ди 95% [-1,47;0,37]	-0,74 ди 95% [-1,2;-0,27]	1,24 ди 95% [0,34;2,15]	1,58 ди 95% [1,02;2,13]	-0,51 ди 95% [-2;0,98]	-1,2 ди 95% [- 2,43;0,04]	-2,54 ди 95% [-3,63;-1,45]*	-4,45 ди 95% [-6,06;-2,84]*
ЛДГ	1,52 ди 95% [- 0,02;3,05]	1,92 ди 95% [0,19;3,65]	1,7 ди 95% [- 0,79;4,18]	-0,69 ди 95% [-2,64;1,26]	2,78 ди 95% [0,64;4,93]*	4,88 ди 95% [3,14;6,62]*	4,21 ди 95% [1,73;6,7]*	4,99 ди 95% [2,03;7,94]*	5,1 ди 95% [1,86;8,35]*	8,93 ди 95% [5,96;11,9]*	8,83 ди 95% [5,22;12,43]*	10,33 ди 95% [6,85;13,82]*
Мочевина	-1,22 ди 95% [-1,89;-0,56]	-2,52 ди 95% [-3,32;-1,72]	-0,85 ди 95% [-3,09;1,41]	0,47 ди 95% [- 0,1;1,03]	-1,06 ди 95% [-1,89;-0,22]	-1,57 ди 95% [-2,22;-0,93]*	1,8 ди 95% [1,22;2,38]*	1,58 ди 95% [0,87;2,28]*	-0,91 ди 95% [-1,73;-0,08]	-0,67 ди 95% [-1,37;0,04]	3,39 ди 95% [2,61;4,18]*	3,64 ди 95% [2,86;4,42]*
Натрий	0,25 ди 95% [0,01;0,48]	1,26 ди 95% [1,05;1,48]*	1,84 ди 95% [1,56;2,13]*	0,78 ди 95% [0,53;1,03]	0,73 ди 95% [0,51;0,95]	1,69 ди 95% [1,5;1,88]*	1,94 ди 95% [1,7;2,17]*	1,17 ди 95% [0,97;1,36]*	1,11 ди 95% [0,82;1,41]*	2,52 ди 95% [2,22;2,81]*	2,71 ди 95% [2,47;2,94]*	2,03 ди 95% [1,88;2,18]*
Общий белок	0,18 ди 95% [- 0,06;0,4]	0,76 ди 95% [0,61;0,92]*	0,27 ди 95% [- 0,25;0,78]	0,75 ди 95% [0,54;0,96]*	0,72 ди 95% [0,54;0,91]*	1,57 ди 95% [1,32;1,82]*	1,22 ди 95% [0,91;1,52]*	1,52 ди 95% [1,29;1,75]*	0,9 ди 95% [0,45;1,36]*	1,76 ди 95% [1,48;2,04]*	1,96 ди 95% [1,75;2,17]*	2,28 ди 95% [2,01;2,54]*
Триглицериды	-0,91 ди 95% [-1,64;-0,18]	-0,33 ди 95% [-1,03;0,38]	-4,09 ди 95% [-9,84;1,67]*	1,41 ди 95% [0,51;2,31]*	0,15 ди 95% [- 0,49;0,78]	1,34 ди 95% [0,51;2,16]*	7,11 ди 95% [- 0,26;14,48]*	2,43 ди 95% [1,22;3,64]*	1,38 ди 95% [- 4,99;7,74]*	2,38 ди 95% [1,37;3,41]*	3,95 ди 95% [2,56;5,35]*	6,46 ди 95% [4,8;8,12]*
Фосфатаза щелочная	1,64 ди 95% [1,02;2,26]*	-0,19 ди 95% [-1,08;0,72]	-1,3 ди 95% [- 2,5;-0,1]	4,21 ди 95% [3,52;4,91]*	1,86 ди 95% [1,16;2,56]*	0,87 ди 95% [0,02;1,72]	-0,42 ди 95% [-1,46;0,63]	5,48 ди 95% [4,72;6,24]*	2,52 ди 95% [1,52;3,52]*	2,01 ди 95% [0,78;3,24]*	0,91 ди 95% [0,06;1,75]	7,55 ди 95% [6,61;8,5]*
Хлор	-0,01 ди 95% [-0,27;0,26]	0,65 ди 95% [0,4;0,9]	1,42 ди 95% [1,05;1,79]	0,06 ди 95% [- 0,15;0,27]	0,44 ди 95% [0,27;0,62]	1,23 ди 95% [0,95;1,51]	1,35 ди 95% [1,17;1,52]	0,39 ди 95% [0,22;0,57]	0,81 ди 95% [0,48;1,15]	1,73 ди 95% [1,46;1,99]*	1,92 ди 95% [1,66;2,19]*	1,13 ди 95% [0,88;1,39]*
Холестерин	0,03 ди 95% [- 0,3;0,34]	0,03 ди 95% [- 0,31;0,35]	-2,72 ди 95% [-6,38;0,95]*	0,21 ди 95% [- 0,14;0,55]	0,69 ди 95% [0,43;0,95]	0,88 ди 95% [0,57;1,19]	0,92 ди 95% [0,57;1,27]	1,39 ди 95% [1,06;1,73]*	2,14 ди 95% [0,93;3,35]*	1,82 ди 95% [1,44;2,2]*	1,77 ди 95% [1,46;2,09]*	1,67 ди 95% [1,34;2]*

\* Статистически значимый результат ( $p < 0.05$ )



Таблица 4.

## Показатели среднего смещения (В, %) исследуемых веществ в группе 2

Вещество	4°C				23°C				30°C			
	4ч	8ч	24ч	48ч	4ч	8ч	24ч	48ч	4ч	8ч	24ч	48ч
АЛТ	0,86 ДИ 95% [-1,77;3,49]	-0,57 ДИ 95% [-1,6;0,47]	-0,03 ДИ 95% [-2,15;2,1]	-1,39 ДИ 95% [-3,55;0,78]	-0,67 ДИ 95% [-2;0,67]	-3,11 ДИ 95% [-5,07;-1,16]	-3,89 ДИ 95% [-5,47;-2,32]	-8,5 ДИ 95% [-10,51;-6,49]	0,13 ДИ 95% [-2,05;2,31]	-3,09 ДИ 95% [-4,35;-1,84]	-8,43 ДИ 95% [-11,42;-5,43]*	-13,93 ДИ 95% [-15,8;-12,06]*
АСТ	-1,76 ДИ 95% [-3,6;0,08]	-3,67 ДИ 95% [-4,84;-2,5]*	-1,72 ДИ 95% [-2,96;-0,48]	-2,99 ДИ 95% [-4,14;-1,85]*	-0,26 ДИ 95% [-2,1;1,6]	0,15 ДИ 95% [-1,61;1,91]	-3,23 ДИ 95% [-4,5;-1,97]*	-6,89 ДИ 95% [-9,47;-4,32]*	-2,59 ДИ 95% [-4,05;-1,14]	-3,9 ДИ 95% [-6,49;-1,31]*	-7,37 ДИ 95% [-9,66;-5,09]*	-12,87 ДИ 95% [-15,04;-10,69]*
Билирубин общий	-4,76 ДИ 95% [-6,08;-3,45]*	-4,38 ДИ 95% [-5,74;-3,03]*	4,72 ДИ 95% [0,26;9,17]*	-0,97 ДИ 95% [-2,84;0,91]*	-9,4 ДИ 95% [-12,9;-7,91]*	-7,81 ДИ 95% [-12,42;-5,2]*	-6,34 ДИ 95% [-8,49;-3,18]*	-9,64 ДИ 95% [-12,91;-7,38]*	-9,69 ДИ 95% [-17,81;-1,56]*	-7,7 ДИ 95% [-10,03;-5,37]*	-6,18 ДИ 95% [-8,57;-3,79]*	-17,47 ДИ 95% [-20,68;-14,26]*
Глюкоза	-2,86 ДИ 95% [-3,87;-1,86]*	-7,3 ДИ 95% [-8,58;-6,01]*	-10,77 ДИ 95% [-13,28;-8,27]*	-21,09 ДИ 95% [-24,92;-17,25]***	-2,06 ДИ 95% [-3,13;-0,99]*	-6,86 ДИ 95% [-8,39;-5,34]*	-16,15 ДИ 95% [-19,28;-13,03]**	-31,36 ДИ 95% [-36,12;-26,6]***	-3,04 ДИ 95% [-4,25;-1,83]*	-8,45 ДИ 95% [-10,21;-6,69]*	-20,44 ДИ 95% [-23,98;-16,89]***	-39,4 ДИ 95% [-44,48;-34,33]***
Калий	0,93 ДИ 95% [0,4;1,46]	2,09 ДИ 95% [1,13;3,05]	13,94 ДИ 95% [10,87;17,01]***	38,83 ДИ 95% [33,09;44,56]***	0,29 ДИ 95% [-1,09;1,66]	-0,87 ДИ 95% [-2,36;0,62]	0,42 ДИ 95% [-1,31;2,15]	21,16 ДИ 95% [17,97;24,34]***	-0,47 ДИ 95% [-1,63;0,69]	-1,38 ДИ 95% [-2,62;0,13]	4,37 ДИ 95% [2,57;6,17]*	45,08 ДИ 95% [40,69;49,47]***
Креатинин	2,26 ДИ 95% [1,44;3,08]	-0,78 ДИ 95% [-1,67;0,12]	-1,12 ДИ 95% [-2,07;-0,17]	-0,51 ДИ 95% [-1,33;0,31]	1,19 ДИ 95% [0,59;1,79]	-0,12 ДИ 95% [-0,75;0,52]	0,92 ДИ 95% [-0,2;2,02]	1,66 ДИ 95% [0,79;2,53]	-0,04 ДИ 95% [-1,13;1,05]	2,1 ДИ 95% [1,26;2,93]	-1,52 ДИ 95% [-2,25;-0,79]	1,35 ДИ 95% [0,75;1,95]
КФК	-2,22 ДИ 95% [-3,42;-1,01]	-2,81 ДИ 95% [-4,26;-1,36]	3,17 ДИ 95% [1,46;4,87]*	2,39 ДИ 95% [1,4;3,38]*	0,58 ДИ 95% [-0,92;2,08]	-0,94 ДИ 95% [-1,43;-0,45]	-0,66 ДИ 95% [-2,26;0,94]	1,29 ДИ 95% [0,23;2,36]	-1,05 ДИ 95% [-2,52;0,43]	-1,62 ДИ 95% [-3,15;-0,09]	-3,08 ДИ 95% [-4,66;-1,5]*	-2,64 ДИ 95% [-5,66;0,39]*
ЛДГ	2,41 ДИ 95% [0,73;4,09]	-0,59 ДИ 95% [-2,67;1,51]	2,2 ДИ 95% [0,98;3,41]	1,83 ДИ 95% [0,19;3,48]	2,91 ДИ 95% [-0,12;5,94]	1,79 ДИ 95% [-0,32;3,88]	5,51 ДИ 95% [2,61;8,41]*	4,98 ДИ 95% [2,24;7,71]*	1,41 ДИ 95% [-0,93;3,74]	0,56 ДИ 95% [-1,78;2,89]	2,87 ДИ 95% [0,37;5,38]	5,88 ДИ 95% [3,1;8,66]*
Мочевина	-1,66 ДИ 95% [-2,55;-0,77]	-1,5 ДИ 95% [-2,31;-0,7]	-2,32 ДИ 95% [-3,16;1,48]	1,48 ДИ 95% [0,92;2,04]	-0,68 ДИ 95% [-1,63;0,28]	-0,79 ДИ 95% [-1,49;-0,09]	2,17 ДИ 95% [1,57;2,76]	2,54 ДИ 95% [1,8;3,28]*	-1,63 ДИ 95% [-2,75;-0,52]	-0,64 ДИ 95% [-1,33;0,05]	3,81 ДИ 95% [2,79;4,83]*	4,12 ДИ 95% [3,4;4,85]*
Натрий	0,29 ДИ 95% [0,13;0,46]	-0,36 ДИ 95% [-0,62;-0,1]	1,37 ДИ 95% [1;1,74]	0,73 ДИ 95% [0,23;1,22]	0,94 ДИ 95% [0,79;1,1]	0,29 ДИ 95% [0,07;0,51]	2,24 ДИ 95% [1,89;2,59]*	2,46 ДИ 95% [1,94;2,99]*	0,8 ДИ 95% [0,62;0,97]	0,72 ДИ 95% [0,47;0,98]	2,38 ДИ 95% [1,98;2,77]*	1,95 ДИ 95% [1,39;2,52]*
Общий белок	-0,12 ДИ 95% [-0,51;0,28]	-1,41 ДИ 95% [-1,77;-1,04]	0,18 ДИ 95% [-0,09;0,45]	0,25 ДИ 95% [-0,2;0,69]	0,1 ДИ 95% [-0,55;0,74]	-0,78 ДИ 95% [-1,45;-0,11]	0,11 ДИ 95% [-0,51;0,71]	0,67 ДИ 95% [0,05;1,29]	0,08 ДИ 95% [-0,78;0,92]	-0,26 ДИ 95% [-1,07;0,55]	-0,12 ДИ 95% [-0,96;0,72]	0,56 ДИ 95% [-0,27;1,37]
Триглицериды	-0,74 ДИ 95% [-2,14;0,68]	-0,31 ДИ 95% [-1,33;0,73]	-1,19 ДИ 95% [-3,87;1,51]	-0,97 ДИ 95% [-2,07;0,14]	-0,62 ДИ 95% [-1,07;-0,17]	0,97 ДИ 95% [-0,31;2,25]	0,79 ДИ 95% [0,48;0,91]	-0,27 ДИ 95% [-2,07;1,53]	-1,42 ДИ 95% [-5,42;2,59]	3,13 ДИ 95% [1,93;4,33]*	1,94 ДИ 95% [-0,52;4,39]*	5,89 ДИ 95% [4,34;7,43]*
Фосфатаза щелочная	3,17 ДИ 95% [2,59;3,75]	-0,17 ДИ 95% [-1,84;1,52]	2,48 ДИ 95% [0,13;4,84]	2,02 ДИ 95% [1,16;2,88]	1,32 ДИ 95% [0,25;2,39]	-0,55 ДИ 95% [-1,69;0,6]	0,41 ДИ 95% [-1,19;2]	5,73 ДИ 95% [4,6;6,86]*	-0,08 ДИ 95% [-1,23;1,09]	0,72 ДИ 95% [-1,02;2,45]	-1,11 ДИ 95% [-2,05;-0,17]	6,47 ДИ 95% [5,12;7,82]*
Хлор	0,12 ДИ 95% [-0,14;0,37]	0,95 ДИ 95% [0,7;1,19]	2,2 ДИ 95% [1,67;2,74]	-0,1 ДИ 95% [-0,37;0,18]	0,55 ДИ 95% [0,4;0,69]	1,82 ДИ 95% [1,46;2,17]	1,51 ДИ 95% [1,38;1,63]	1,03 ДИ 95% [0,81;1,25]	0,45 ДИ 95% [0,15;0,74]	1,71 ДИ 95% [1,3;2,12]	2,06 ДИ 95% [1,76;2,37]	1,14 ДИ 95% [0,87;1,41]
Холестерин	-0,05 ДИ 95% [-0,34;0,25]	1,03 ДИ 95% [0,75;1,32]	2,15 ДИ 95% [1,56;2,74]*	0,07 ДИ 95% [-0,2;0,32]	0,65 ДИ 95% [0,54;0,77]	1,09 ДИ 95% [0,78;1,4]	1,59 ДИ 95% [1,47;1,7]	1,18 ДИ 95% [0,95;1,41]	0,7 ДИ 95% [0,31;1,09]	1,24 ДИ 95% [0,83;1,64]	1,77 ДИ 95% [1,63;1,91]	0,93 ДИ 95% [0,67;1,19]

\* Статистически значимый результат ( $p < 0.05$ )\*\* Клинически значимый результат ( $B > RCV 80\%$ )\*\*\* Клинически значимый результат ( $B > RCV 95\%$ )

Уровень мочевины при 4°C изменялся от -1,22% (4ч) до 0,47% (72ч); при 23°C от -1,06% (4ч) до 1,58% (72ч); при 30°C от -0,91% (4ч) до 3,64% (72ч). Уровень натрия при 4°C изменялся от 0,25% (4ч) до 0,78% (72ч); при 23°C от 0,73% (4ч) до 1,17% (72ч); при 30°C от 1,11% (4ч) до 2,03% (72ч). Уровень общего белка при 4°C изменялся от 0,18% (4ч) до 0,75% (72ч); при 23°C от 0,72% (4ч) до 1,52% (72ч); при 30°C от 0,9% (4ч) до 2,28% (72ч). Уровень триглицеридов при 4°C изменялся от -0,91% (4ч) до 1,41% (72ч); при 23°C от 0,15% (4ч) до 2,43% (72ч); при 30°C от 1,38% (4ч) до 6,46% (72ч). Уровень щелочной фосфатазы при 4°C изменялся от 1,64% (4ч) до 4,21% (72ч); при 23°C от 1,86% (4ч) до 5,48% (72ч); при 30°C от 2,52% (4ч) до 7,55% (72ч). Уровень хлора при 4°C изменялся от -0,01% (4ч) до 0,06% (72ч); при 23°C от 0,44% (4ч) до 0,39% (72ч); при 30°C от 0,81% (4ч) до 1,13% (72ч). Уровень холестерина при 4°C изменялся от 0,03% (4ч) до 0,21% (72ч); при 23°C от 0,69% (4ч) до 1,39% (72ч); при 30°C от 2,14% (4ч) до 1,67% (72ч).

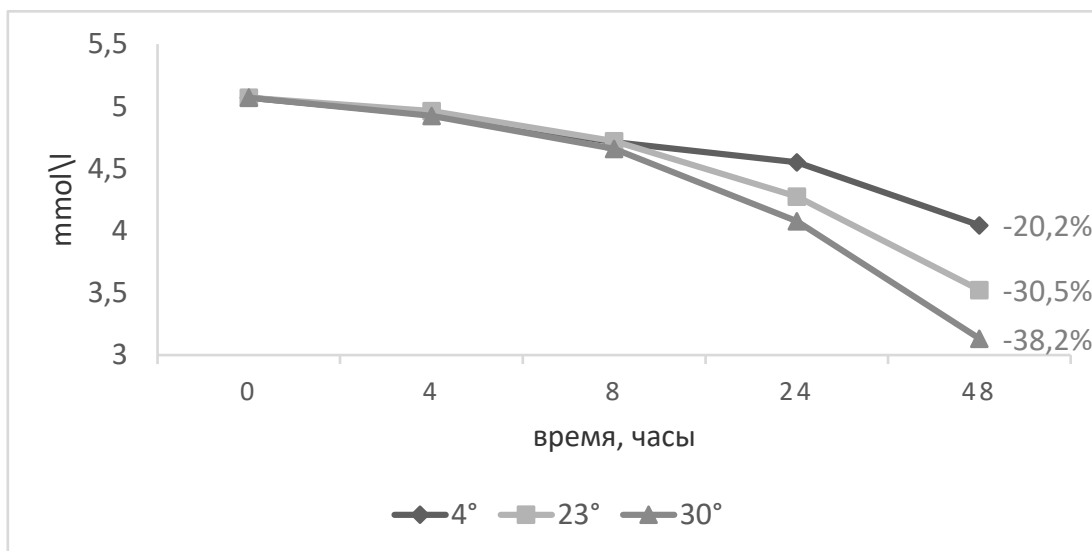
В течение 72 часов, не происходит клинически значимых изменений уровня исследуемых веществ, в том числе при 30°C на всем протяжении наблюдения. Статистически значимые изменения уровней АСТ, общего билирубина, глюкозы, щелочной фосфатазы происходили уже после 4ч хранения образцов.

Показатели смещения (В, %) исследуемых веществ в группе 2, представленные в таблице 4, показывают результаты хранения проб сыворотки с клеточным компонентом крови. Уровень АЛТ при 4°C изменялся от 0,86% (4ч) до -1,39% (48ч); при 23°C от -0,67% (4ч) до -8,5% (48ч); при 30°C от 0,13% (4ч) до -13,93% (48ч). Уровень АСТ при 4°C изменялся от -1,76% (4ч) до -2,99% (48ч); при 23°C от -0,26% (4ч) до -6,89% (48ч); при 30°C от -2,59% (4ч) до -12,87% (48ч). Уровень общего билирубина при 4°C изменялся от -4,76% (4ч) до -0,97% (48ч); при 23°C от -9,4% (4ч) до -9,64% (48ч); при 30°C от -9,69% (4ч) до -17,47% (48ч). Уровень глюкозы при 4°C изменялся от -2,86% (4ч) до -21,09% (48ч); при 23°C от -2,06% (4ч) до -31,36% (48ч); при 30°C от -

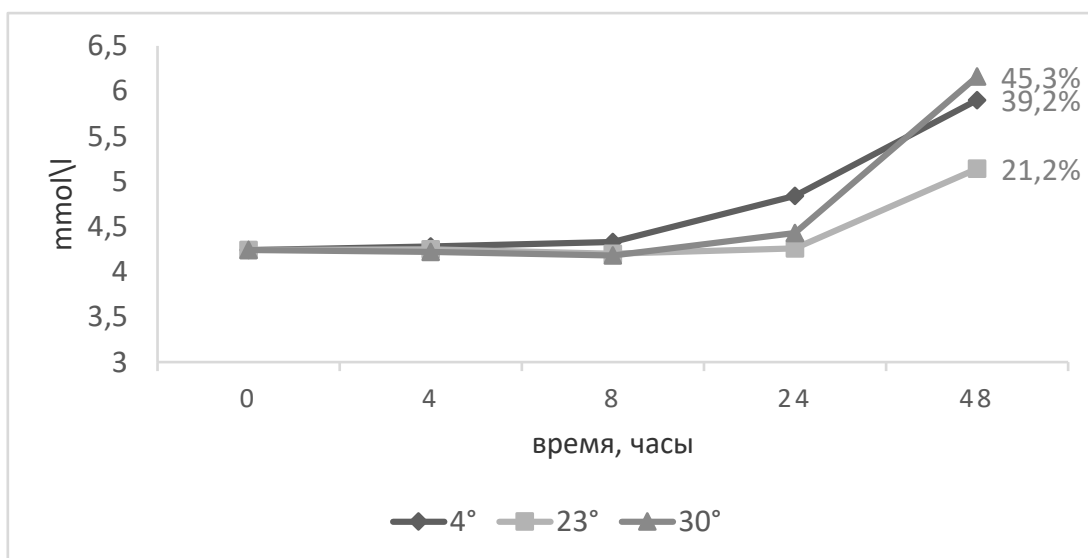
3,04% (4ч) до -39,4% (48ч). Уровень калия при 4°C изменялся от 0,93% (4ч) до 38,83% (48ч); при 23°C от 0,29% (4ч) до 21,16% (48ч); при 30°C от -0,47% (4ч) до 45,08% (48ч). Уровень креатинина при 4°C изменялся от 2,26% (4ч) до -0,51% (48ч); при 23°C от 1,19% (4ч) до -1,66% (48ч); при 30°C от -0,04% (4ч) до 1,35% (48ч). Уровень КФК при 4°C изменялся от -2,22% (4ч) до 2,39% (48ч); при 23°C от -0,58% (4ч) до 1,29% (48ч); при 30°C от -1,05% (4ч) до -2,64% (48ч). Уровень ЛДГ при 4°C изменялся от 2,41% (4ч) до 1,83% (48ч); при 23°C от 2,91% (4ч) до 4,98% (48ч); при 30°C от 1,41% (4ч) до 5,88% (48ч). Уровень мочевины при 4°C изменялся от -1,66% (4ч) до 1,48% (48ч); при 23°C от -0,68% (4ч) до 2,54% (48ч); при 30°C от -1,63% (4ч) до 4,12% (48ч). Уровень натрия при 4°C изменялся от 0,29% (4ч) до 0,73% (48ч); при 23°C от 0,94% (4ч) до 2,46% (48ч); при 30°C от 0,8% (4ч) до 1,95% (48ч). Уровень общего белка при 4°C изменялся от -0,12% (4ч) до 0,25% (48ч); при 23°C от 0,1% (4ч) до 0,67% (48ч); при 30°C от 0,08% (4ч) до 0,56% (48ч). Уровень триглицеридов при 4°C изменялся от -0,74% (4ч) до -0,97% (48ч); при 23°C от -0,62% (4ч) до -0,27% (48ч); при 30°C от -1,42% (4ч) до 5,89% (48ч). Уровень щелочной фосфатазы при 4°C изменялся от 3,17% (4ч) до 2,02% (48ч); при 23°C от 1,32% (4ч) до 5,73% (48ч); при 30°C от -0,08% (4ч) до 6,47% (48ч). Уровень хлора при 4°C изменялся от 0,12% (4ч) до -0,1% (48ч); при 23°C от 0,55% (4ч) до 1,03% (48ч); при 30°C от 0,45% (4ч) до 1,14% (48ч). Уровень холестерина при 4°C изменялся от -0,05% (4ч) до 0,07% (48ч); при 23°C от 0,65% (4ч) до 1,18% (48ч); при 30°C от 0,7% (4ч) до 0,93% (48ч).

Из данных приведенных в таблице 4 можно увидеть, как результаты во многом схожи с группой 1. Статистически значимые изменения концентраций выявляются уже после 4ч хранения по следующим веществам: общий билирубин, глюкоза. Как видно из таблицы 4, клинически значимые изменения концентраций произошли по калию и глюкозе. Уровень глюкозы клинически значимо изменялся в результате хранения 48ч при 4С°; (24ч при RCV 80%) 48ч при 23С°; 24ч и 48ч при 30С° (рисунок 1).

Уровень калия клинически значимо изменился в результате хранения 24ч и 48ч при температуре 4С°; 48ч при 23С° и 30С° (рисунок 2).



**Рисунок 1.** Динамика уровня глюкозы в зависимости от температуры и времени хранения образца, группа 2.



**Рисунок 2.** Динамика уровня калия в зависимости от температуры и времени хранения образца, группа 2.

### 3.1.2. Результаты исследования влияния возраста человека на уровень биохимических веществ в крови при хранении биоматериала, анализ клинической значимости (RCV)

По результатам анализа влияния возрастного фактора выявлены статистически значимые отличия уровня смещения глюкозы при сравнении возрастных групп. Статистически значимые смещения уровня калия при сравнении возрастных групп не выявлено (табл. 5, 6, 7, 8).

Таблица 5.

Среднее смещение уровня калия в возрастных группах, %

Группы	t=4°C, T=24ч	t=23°C, T=24ч	t=4°C, T=48ч	t=23°C, T=48ч
1	+11,9	+5,3	+46,1	+10,5
2	+11,7	+5,0	+46,1	+11,0
3	+13,8	+4,8	+46,6	+9,7

\*клинически значимое смещение (RCV 95%)

Таблица 6.

Значение критерия Манна-Уитни при сравнении возрастных групп по смещению уровня калия

Группы сравнения	t=4 °C, T=24ч	t=23°C, T=24ч	t=4°C, T=48ч	t=23°C, T=48ч
1 и 2	0,968	0,499	0,914	0,570
2 и 3	0,184	0,681	0,961	0,809
1 и 3	0,161	0,668	0,972	0,755

Таблица 7.

Среднее смещение уровня глюкозы в возрастных группах, %

Группы	t=4 °С, Т=24ч	t=23°С, Т=24ч	t=4°С, Т=48ч	t=23°С, Т=48ч
1	-16,09	-25,28	-23,45	-28,14
2	-11,28	-16,96	-16,48	-21,6
3	-9,4	-12,3	-12,69	-15,9

\*клинически значимое смещение (RCV 95%)

Таблица 8.

Значение критерия Манна-Уитни при сравнении возрастных групп по смещению уровня глюкозы

Группы сравнения	t=4 °С, Т=24ч	t=23°С, Т=24ч	t=4°С, Т=48ч	t=23°С, Т=48ч
1 и 2	0,003*	0,006*	0,041*	0,048*
2 и 3	0,307	0,454	0,134	0,267
1 и 3	0,001*	0,002*	0,001*	0,036*

Примечание: \* $p \leq 0,05$  отклонение нулевой гипотезы и статистически значимое отличие сравниваемых групп.

### 3.2. Результаты оценки влияния эндогенных факторов на уровень концентрации биологических веществ в пробах крови людей различных возрастных групп.

Оценка смещения уровня глюкозы была проведена с учетом данных о неопределенности измерений исследуемых параметров в используемых аналитических системах (таблица 10). Неопределенность измерений для исследуемых параметров составила: глюкоза 4,02%; HCT 4,02%; HGB 3,02%; MCH 5,05%; MCHC 3,66%; MCV 4,35%; PLT 7,36%; WBC 7,67; RDW 4,7%; RBC 3,51%.

По результатам анализа корреляционной зависимости (таблица 11) выявлено: обратная слабая и средняя корреляционные связи наблюдаются среди показателей: лимфоциты (-0,261 для 24ч и -0,287 для 48ч); эозинофилы (-0,253 для 24ч и -0,237 для 48ч); тромбоциты (-0,254 для 24ч и -0,312 для 48ч); тромбоцит ( -0,185 для 24ч и -0,246 для 48ч). Прямая слабая и средняя корреляционные связи наблюдаются среди показателей: средний объем тромбоцитов (0,285 для 24ч и 0,333 для 48ч); относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму (0,315 для 24ч и 0,361 для 48ч). Также слабая корреляционная взаимосвязь обнаружена и по возрасту человека (0,258 для 24ч и 0,282 для 48ч). Слабая корреляционная связь берется во внимание для проверки дополнительных статистических разработок. Увеличение корреляционных индексов в зависимости от времени хранения образцов возможно связано с нелинейностью корреляционной зависимости.

Выборка была поделена на 3 равные части (терцели) в зависимости от величины каждого исследуемого показателя (таблица 9)

Для дальнейшего изучения проведен сравнительный статистический анализ сформированных групп, наиболее информативным было сравнение групп 1 и 3, так как это группы с минимальными и максимальными значениями исследуемых параметров. Полученные данные представлены в таблице 12.

По данным таблицы 12 прослеживаются статистически значимые отличия (в группах 1 и 3) изменения уровня глюкозы в зависимости от уровня представленных показателей: лимфоциты (0,05 для 24ч и 0,025 для 48ч); эозинофилы (0,001 для 24ч и 0,003 для 48ч); тромбоциты (0,008 для 24ч и 0,001 для 48ч); тромбоцит (0,012 для 24ч и 0,002 для 48ч); средний объем

тромбоцитов (0,01 для 24ч и 0,001 для 48ч); относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму (0,001 для 24ч и 48ч);  $p \leq 0,05$ , что свидетельствует о статистической значимости. Статистически значимые отличия (в группах 1 и 3) обнаружены также и по возрасту человека (0,014 для 24ч и 0,012 для 48ч).

### **3.3. Оценка влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб, поступающих в лабораторию.**

#### **3.3.1. Анализ количества гемолизированных проб аппаратным и визуальным методом для определения приемлемого метода детекции.**

При визуальной и инструментальной оценке было исследовано 3553 проб. При визуальной оценке выявлена 61 проба (1,73%) с гемолизом различной степени интенсивности (таблица 13). При инструментальной оценке выявлена 91 проба с гемолизом что составляет 2,56%. С целью оценки значимости полученных данных использовали метод  $6\sigma$  [Six Sigma Tutorial - Tutorialspoint, ]. Применяли подсчет количества ошибок на миллион, после чего переводили в значение сигма: для визуальной оценки –  $1,73\% \times 106/100\% = 17300$ , полученное значение равно  $3,7\sigma$ ; для инструментальной оценки –  $2,56\% \times 106/100\% = 25600$ , полученное значение равно  $3,5\sigma$ . Таким образом аппаратный метод определения гемолиза в пробах предпочтительнее ввиду обнаружения незаметных визуально гемолизированных проб.



Таблица 9.

## Разделение исследуемых показателей по группам

Параметр	Возраст (г)			Lym (10 <sup>9</sup> /л)			EOS (10 <sup>9</sup> /л)			PLT (10 <sup>9</sup> /л)			PCT (%)			MPV (фл)			PDW (%)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Группы	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
количество образцов	38	38	39	38	38	38	38	38	39	38	38	39	38	38	39	38	38	39	38	38	39
Диапазон значений	21 - 58	58 - 72	72 - 90	0,4 - 1,66	1,66 - 2,35	2,36 - 5,62	0- 0,11	0,11- 0,23	0,24- 1,3	71 - 175	175- 418	424- 981	0,06- 0,14	0,15- 0,25	0,25- 0,79	4,5- 6,6	6,6- 7,8	7,9- 12,8	17,1- 19,1	19,2- 20,5	20,5- 24,8

Таблица 10.

## Неопределённость измерений исследуемых параметров

Исследуемый параметр	Gluc	HCT	HGB	MCH	MCHC	MCV	PLT	WBC	RDW	RBC
Неопределённость измерений (%)	4,02	4,02	3,02	5,05	3,66	4,35	7,36	7,67	4,70	3,51

Таблица 11.

## Корреляционная зависимость гематологических параметров и изменения уровня глюкозы

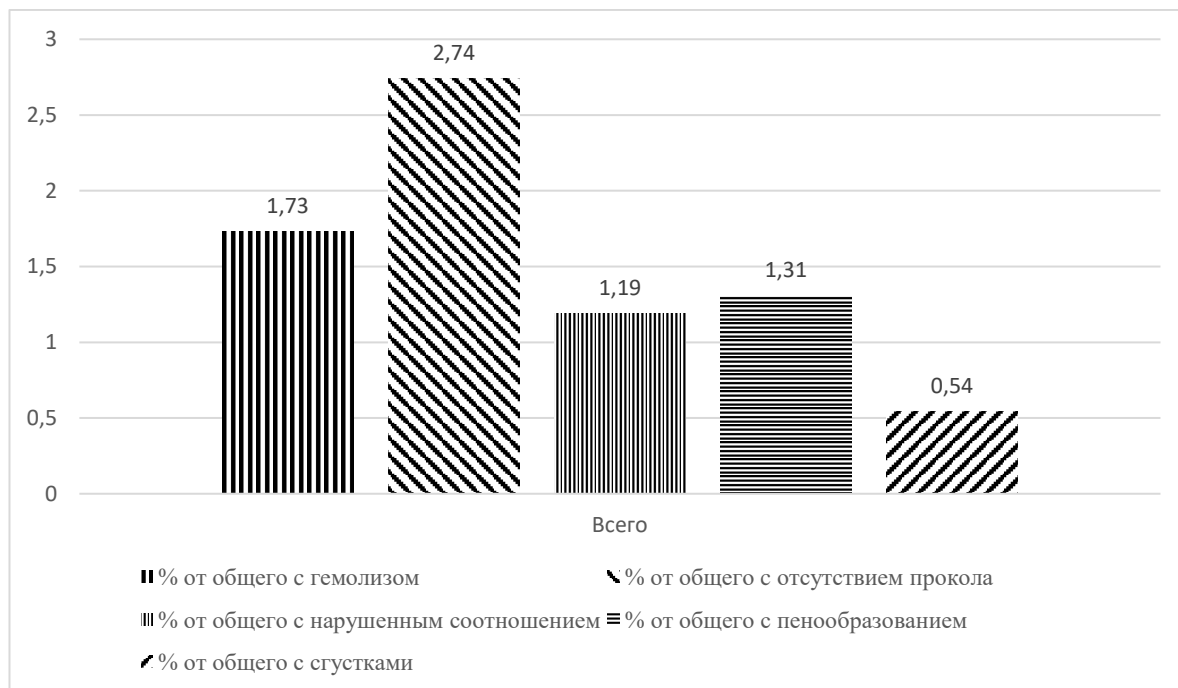
Параметр	Возраст	СОЭ	WBC	NEUT	NEUT%	LYM	LYM%	MON	MON%	EOS	EOS%	BAS	BAS%	HGB	HCT	RBC	MCH	MCHC	MCV	RDW-CV	PLT	PCT	MPV	PDW
Смещение 24 ч	0,258	- 0,061	- 0,135	-0,076	0,066	- 0,261	-0,067	- 0,128	-0,02	- 0,253	-0,133	- 0,156	-0,017	0,028	0,112	0,078	0,094	0,146	0,067	-0,044	- 0,254	- 0,185	0,285	0,315
Смещение 48 ч	0,282	- 0,076	- 0,196	-0,137	0,034	- 0,287	-0,049	- 0,158	0,11	- 0,237	-0,082	-0,21	0,029	0,048	0,037	0,021	0,09	0,129	0,058	0,038	- 0,312	- 0,246	0,333	0,361

Таблица 12.

## Расчеты статистической значимости сравнения исследуемых групп

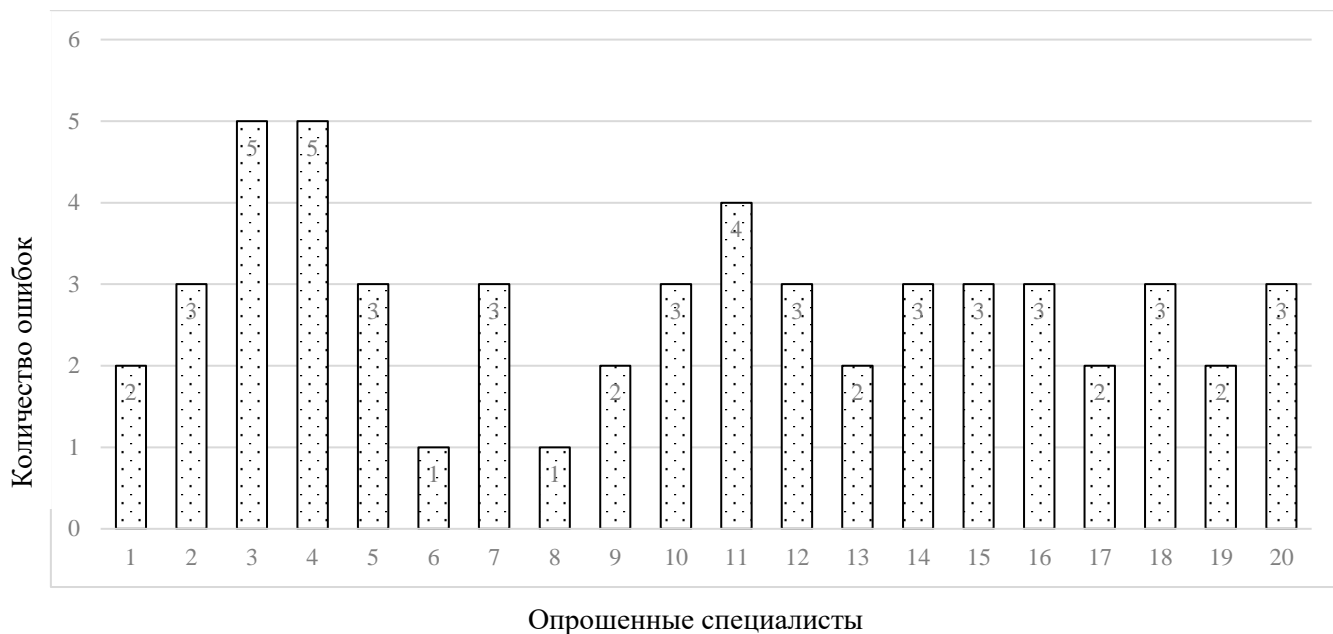
Параметр	Возраст			Lym			EOS			PLT			PCT			MPV			PDW		
	1&2	1&3	2&3	1&2	1&3	2&3	1&2	1&3	2&3	1&2	1&3	2&3	1&2	1&3	2&3	1&2	1&3	2&3	1&2	1&3	2&3
Смещение 24 ч	0,061	0,014	0,67	0,807	0,05	0,119	0,004	0,001	0,983	0,014	0,008	0,787	0,009	0,012	0,901	0,366	0,01	0,071	0,016	0,001	0,232
Смещение 48 ч	0,076	0,012	0,375	0,24	0,025	0,225	0,009	0,003	0,923	0,002	0,001	0,702	0,002	0,002	0,866	0,467	0,001	0,009	0,028	0,001	0,068

По другим параметрам получены следующие результаты: Отсутствие прокола 2,74%; пенообразование 1,31; сгустки 0,54%, нарушенное соотношение кровь/антикоагулянт 1,19% (рисунок 3).



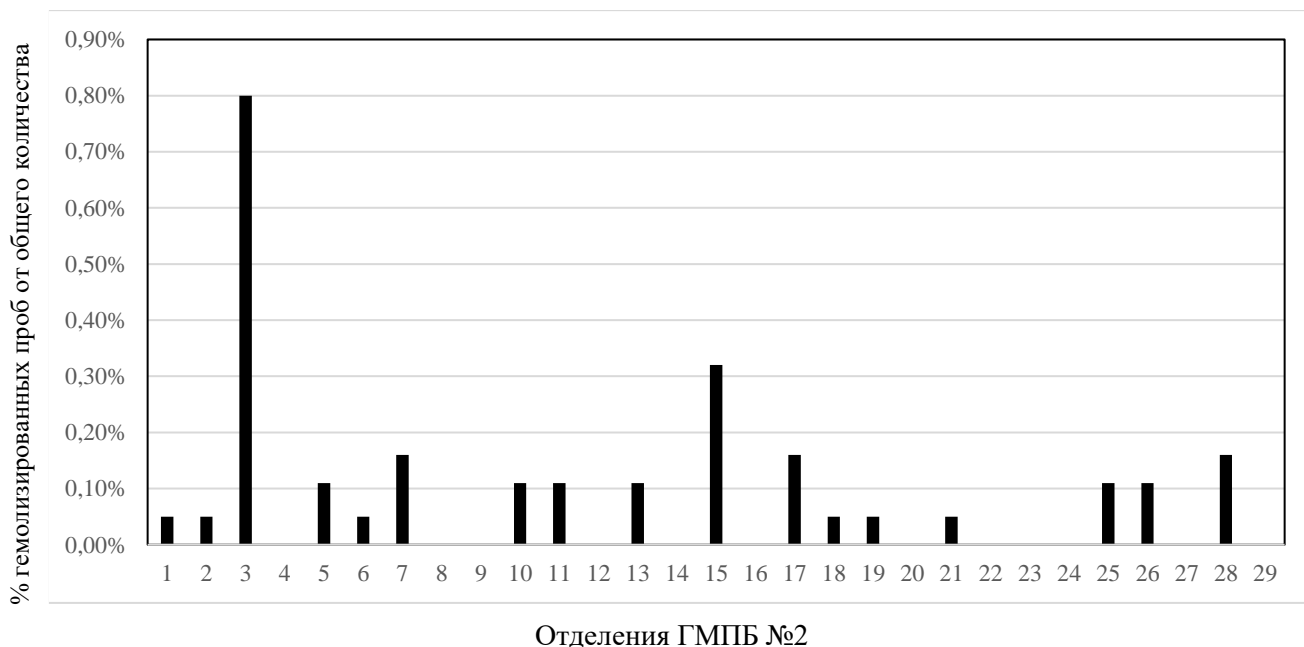
**Рисунок 3.** Ошибки преаналитического этапа, выявленные визуальным методом.

Проведенный нами тест верификации эффективности визуальной оценки гемолиза выявил ошибки определения степени гемолиза (рисунок 4), среднее количество ошибок составило 2,8 (28%). Среди ошибок в результатах визуальной оценки наблюдалась тенденция к завышению степени гемолиза, что потенциально может приводить к ложной выбраковке биоматериалов.



**Рисунок 4.** Результаты опроса специалистов.

Инструментальным методом за месяц было исследовано 3553 проб, 91 (2,56%) из которых с гемолизом различной степени интенсивности. Максимальный процент гемолизированных образцов составляет 8,77% (рисунок 5).



**Рисунок 5.** Результаты инструментального метода исследования.

Результаты визуальной оценки проб и таких параметров как: отсутствие прокола в крышке пробирки, нарушенное соотношение кровь/антикоагулянт, пенообразование, сгустки представлены в таблице 13.

Из отделений поступило в общем 3553 пробирок из них: 62 (1,73%) с гемолизом, 98 (2,74%) с отсутствием прокола в крышке вакутейнера, 43 (1,19%) с нарушенным соотношением объема, 47 (1,31%) с пенообразованием, 19 (0,54%) с лентовидными сгустками.

Результаты опроса сотрудников лаборатории для верификации эффективности визуальной оценки гемолиза с использованием 10 сывороток с различной степенью гемолиза, измеряемой полуколичественно на анализаторе Architect с8000, Abbott по пятибалльной шкале от 0 до 4+ представлены в таблице 14. Из 10 проб среднее число ошибок составило 2,8 или 28%.

Результаты инструментальной оценки проб и статистические данные выявленных гемолизированных образцов представлены в таблице 15. Для инструментальной оценки было использовано 3553 проб из них с гемолизом 91 что составляет 2,56%. Применяли подсчет количества ошибок на миллион, после чего переводили в значение сигма:  $2,56\% * 10^6 / 100\% = 25600$ . Полученное значение равно  $3,5\sigma$  (при визуальной оценке  $3,7\sigma$ ).

## Результаты визуального метода исследования

Отделение №	Общее кол-во проб	С гемолизом	% от общего кол –ва	Отсутствие прокола	% от общего кол –ва	Нарушенное соотношение	% от общего кол –ва	Пенообразование	% от общего кол –ва	Сгустки	% от общего кол –ва
1	109	19	0,54	21	0,60	2	0,06	0	0	0	0
2	155	6	0,18	2	0,06	4	0,12	2	0,06	0	0
3	264	6	0,18	13	0,36	9	0,24	9	0,24	0	0
4	119	4	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0
5	177	4	0,12	11	0,30	2	0,06	0	0	0	0
6	23	4	0,12	0	0	6	0,18	4	0,12	0	0
7	264	4	0,12	13	0,36	0	0	6	0,18	0	0
8	132	2	0,06	4	0,12	2	0,06	11	0,30	0	0
9	89	2	0,06	0	0	2	0,06	0	0	0	0
10	160	2	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0
11	145	2	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0
12	72	2	0,06	0	0	0	0	0	0	2	0,06
13	183	2	0,06	4	0,12	6	0,18	0	0	0	0
14	109	0	0	0	0	2	0,06	6	0,18	0	0
15	379	0	0	0	0	0	0	2	0,06	11	0,30
16	98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	136	0	0	15	0,42	2	0,06	0	0	0	0
18	47	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,18
19	55	0	0	0	0	2	0,06	0	0	0	0
20	117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	64	0	0	2	0,06	0	0	0	0	0	0
25	123	0	0	13	0,36	2	0,06	4	0,12	0	0
26	117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	128	0	0	0	0	0	0	2	0,06	0	0
Всего	3553	62	1,73	98	2,74	43	1,19	47	1,31	19	0,54

Таблица 14.

## Результаты опроса специалистов

Специалист	№ пробы (степень гемолиза)										Количество ошибок
	1(3+)	2(2+)	3(4+)	4(1+)	5(3+)	6(2+)	7(0+)	8(0+)	9(3+)	10(2+)	
1	3+	2+	4+	2+	3+	2+	0+	0+	3+	3+	2
2	3+	1+	4+	0+	2+	2	0+	0+	3+	2+	3
3	3+	1+	4+	0+	2+	1+	0+	0+	3+	3+	5
4	3+	1+	4+	0+	2+	1+	0+	0+	2+	2+	5
5	4+	2+	4+	1+	3+	3+	0+	0+	3+	3+	3
6	3+	2+	4+	0+	3+	2+	0+	0+	3+	2+	1
7	3+	2+	4+	0+	3+	2+	0+	0+	4+	4+	3
8	3+	1+	4+	1+	3+	2+	0+	0+	3+	2+	1
9	3+	1+	4+	1+	3+	2+	0+	0+	3+	3+	2
10	3+	2+	4+	1+	3+	2+	1+	1+	3+	3+	3
11	3+	1+	3+	0+	2+	2+	0+	0+	3+	2+	4
12	3+	1+	4+	0+	3+	2+	0+	0+	3+	3+	3
13	3+	2+	4+	1+	2+	1+	0+	0+	3+	2+	2
14	3+	1+	4+	0+	3+	2+	0+	0+	3+	3+	3
15	3+	1+	4+	0+	2+	2+	0+	0+	3+	2+	3
16	4+	1+	4+	0+	3+	2+	0+	0+	3+	2+	3
17	3+	1+	4+	0+	3+	2+	0+	0+	3+	2+	2
18	3+	1+	4+	1+	2+	2+	0+	0+	2+	2+	3
19	3+	2+	4+	1+	3+	3+	0+	0+	3+	3+	2
20	3+	1+	4+	0+	2+	2+	0+	0+	3+	2+	3
Среднее количество ошибок:											2,8 (28%)

*Выделенные результаты являются ошибочными ответами сотрудников.*

Таблица 15.

## Результаты инструментального метода исследования

Отделение	Всего проб	Гемолизированных проб	% от числа проб с отделения	% от общего числа проб
1	68	2	2,78	0,05
2	117	2	1,61	0,05
3	324	28	8,77	0,80
4	53	0	0	0
5	218	4	1,74	0,11
6	27	2	7,14	0,05
7	170	6	3,33	0,16
8	134	0	0	0
9	61	0	0	0
10	134	4	2,81	0,11
11	136	4	2,78	0,11
12	57	0	0	0
13	188	4	2,02	0,11
14	72	0	0	0
15	339	11	3,35	0,32
16	97	0	0	0
17	134	6	4,23	0,16
18	57	2	3,33	0,05
19	83	2	2,27	0,05
20	55	0	0	0
21	102	2	1,85	0,05
22	38	0	0	0
23	44	0	0	0
24	80	0	0	0
25	80	4	4,76	0,11
26	63	4	6,06	0,11
27	95	0	0	0
28	127	6	4,48	0,16
29	402	0	0	0
Всего	3553	91		2,56



### 3.3.2. Исследование влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб

В результате обработки данных выявлено общее относительное количество гемолизированных проб по возрастам за исследуемый период времени (таблица 16). Средний процент получения гемолизированной пробы в группе 1 составил 0,85%, в группе 2 – 1,40%, в группе 3 – 0,92%, в группе 4 – 1,75%. Статистически значимое отличие количества гемолизированных проб было обнаружено между 3 и 4 группой (асимптотическая значимость. 0,016).

Таблица 16.

Количество гемолизированных проб в исследуемых группах

Группа (возраст, лет)	1 (21 -34 лет)	2 (35 -59 лет)	3 (60 – 74 лет)	4 (75+ лет)
% гем. за июль	0,41	0,67	0,59	1,18
% гем. за август	0,91	1,15	0,68	2,47
% гем. за сентябрь	1,53	1,94	0,68	1,83
% гем. за октябрь	0,35	1,13	0,69	1,49
% гем. за ноябрь	0,00	1,68	1,56	1,78
% гем. за декабрь	1,92	1,80	1,30	1,73
Средний %	0,85	1,40	0,92	1,75
Асимптотическая значимость	0,150		0,149	0,016*

*\*Асимптотическая значимость, не превышающая 0,05 говорит об отклонении нулевой гипотезы и статистически значимом отличии сравниваемых групп.*

Коэффициент корреляции величины возраста человека и количества гемолизированных проб составил 0,299.

### 3.3.3. Ретроспективная оценка влияния возраста на количество проб с критическими значениями уровня калия (K<sup>+</sup>) и натрия (Na<sup>+</sup>) как одних из наиболее чувствительных к гемолизу исследуемых веществ

В результате оценки критических значений уровня K<sup>+</sup> рассчитаны средние величины количества встречаемости критических значений в исследуемых группах (таблица 17).

Таблица 17.

Количество проб с критическими значениями K<sup>+</sup> в исследуемых группах

Группа (возраст, лет)	1 (21 -34)	2 (35 -59)	3 (60 – 74)	4 (75 и более)
Количество проб	537	3921	7942	5950
K <sup>+</sup> >6.2	1	2	36	48
% K <sup>+</sup> >6.2	0,19	0,05	0,45	0,81
K <sup>+</sup> <2.6	0	5	18	20
% K <sup>+</sup> <2.6	0,00	0,13	0,23	0,34
Асимптотическая значимость	0,001*		0,001*	0,012*

*\*Асимптотическая значимость, не превышающая 0,05 говорит об отклонении нулевой гипотезы и статистически значимом отличии сравниваемых групп.*

В результате оценки критических значений уровня Na<sup>+</sup> рассчитаны средние величины количества встречаемости критических значений в исследуемых группах (таблица 18).

Таблица 18.

Количество проб с критическими значениями Na<sup>+</sup> в исследуемых группах

Группа (возраст, лет)	1 (21 -34)	2 (35 -59)	3 (60 – 74)	4 (75 и более)
Количество проб	506	3319	6617	4785
Na <sup>+</sup> >155	0	2	7	14
% Na <sup>+</sup> >155	0,00	0,06	0,11	0,29
Na <sup>+</sup> <120	0	1	5	7
% Na <sup>+</sup> <120	0,00	0,03	0,08	0,15
Асимптотическая значимость	0,702		0,001*	0,001*

*\*Асимптотическая значимость, не превышающая 0,05 говорит об отклонении нулевой гипотезы и статистически значимом отличии сравниваемых групп.*

### 3.3.4. Оценка эффективности разработанных методических рекомендаций по индивидуальному подбору игл для венепункции у лиц пожилого и старческого возраста

Результаты оценки эффективности внедренных методических рекомендаций по подбору игл для венепункции представлены в таблице 19.

Таблица 19.

Сравнение первичной и вторичной оценки количества гемолизированных проб

	Количество исследованных проб	Доля гемолизированных проб (%)	Значение $\sigma$
Первичная оценка	576	2,56	3,4
Вторичная оценка	485	1,53	3,6

При первичной оценке доля гемолизированных проб составила 2,6%, что составляет 3,4  $\sigma$ . При вторичной оценке после индивидуального подбора игл для венепункции доля гемолизированных проб составила 1,57%, что соответствует 3,6 сигма. Таким образом, после внедрения методики индивидуального подбора игл получен существенный прирост в качестве процесса флеботомии.

При подсчете изменений экономических затрат составлен перечень расходных материалов, необходимых для выполнения одной процедуры венепункции, и подсчитана стоимость одной процедуры по данным СПб Городской многопрофильной больницы № 2 (таблица 20).

Учитывая вышеизложенное составлена, таблица предполагаемого снижения экономических затрат за счет уменьшения повторных заборов крови по причине гемолиза (таблица 21).

Таблица 20.

#### Стоимость расходных материалов

Год	2019	2020	2021
Стоимость (руб.)	55,23	57,1	60,83

Таблица 21.

#### Финансовые затраты на процедуру флеботомии

Год	Количество процедур венепункции	Стоимость расходных материалов (руб.)	Предполагаемая финансовая выгода (руб.)
2019	119721	6612227	68105
2020	122993	7022900	72335
2021	129441	7873936	81101

Исходя из полученной предполагаемой финансовой целесообразности произведен расчет сэкономленных процедур венепункции (таблица 22).

Таблица 22.

Результаты расчёта финансовой целесообразности

Год	Предполагаемая финансовая выгода (руб.)	Исключённые процедуры венепункции
2019	68105	1233
2020	72335	1266
2021	81101	1333

## **ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **4.1. Оценка влияния возрастного фактора на стабильность биологических веществ в венозной крови с учетом температурного и временного режимов хранения образцов проведено в два этапа**

#### **4.1.1 Исследование изменений уровня биохимических веществ крови при различных условиях хранения биоматериала с учетом клинической значимости (RCV)**

Попытки определить стабильность биохимических веществ в крови человека были неоднократно предприняты и ранее. Наиболее известное исследование было опубликовано в 1981 году в журнале *Clinical Chemistry* [Оно Т. et al., 1981]. В этом исследовании выявили клинически значимые изменения по следующим веществам: натрий при 30° и длительности хранения 48ч; калий после 48 часов при 4°, 23° и 30°; глюкоза при хранении 48 часов при 4°, 23° и 30°. Для натрия клинически значимым авторы считали смещение в 3%, что несколько ниже критерия, выбранного по условиям нашего исследования – 4,3% (таблица 3). В остальном полученные данные оказались сопоставимы.

Несмотря на статистически значимые изменения в исследуемых группах образцов крови (Таблицы 2, 3), клинически значимые изменения были выявлены только в редких случаях. Отсутствие клинически значимых изменений уровня исследуемых веществ в группе 1 (Таблица 2) можно объяснить менее выраженным влиянием клеточного компонента на сыворотку крови. В группе 2 (Таблица 3) клинически значимые изменения выявили по уровню калия и глюкозы. Изменение уровня калия происходит в результате ингибирования натрий-калиевого насоса и повышения проницаемости мембран эритроцитов, что приводит к выходу ионов калия против градиента концентрации, более активно эти процессы протекают при низкой температуре, что показано на графике 1. Изменения уровня глюкозы

наблюдаются в результате использования ее клеточной массой в качестве источника энергии.

На примере глюкозы во второй группе образцов мы получили различные сроки приемлемого хранения образца в зависимости от степени достоверности клинически значимого смещения (RCV 95% и 80%). Необходимо отметить, что в ряде случаев 80% степени достоверности достаточно для регистрации неблагоприятной тенденции, в литературе такие результаты отмечаются терминами *указывающий* и *обращающий внимание на* [Biologic Variation: Principles and Practice - Westgard, ].

В различных рекомендациях по хранению и транспортировке образцов крови встречается фраза о том, что сыворотку/плазму необходимо отделить от клеточных элементов не позднее двух часов после забора крови [Lima-Oliveira G. et al., 2015]. Однако, указанные утверждения касаются далеко не всех исследуемых веществ, что подтверждают результаты нашего исследования, в тоже время соблюдение такого временного интервала часто бывает трудно достижимо.

#### **4.1.2 Исследование влияния возраста человека на уровень биохимических веществ в крови при хранении биоматериала, анализ клинической значимости (RCV)**

Влияние возрастного фактора на вещества в крови человека при хранении и транспортировке образцов изучено мало, однако, такие данные могут представлять практический интерес для лабораторий в связи с тенденцией к централизации лабораторных исследований и связанной с ней разработкой логистических решений. Ряд веществ более подвержен влиянию внешних и внутренних факторов при длительном хранении и транспортировке, в том числе калий и глюкоза, что показано в ГОСТ Р 53079.4–2008. и научных публикациях [Гудер В. Г. и др., 2010; Мошкин А. В., Долгов В. В., 2004]. Таким образом, наше исследование позволило расширить

границы понимания влияния такого мало изученного фактора влияния как возраст на стабильность веществ в сыворотке крови. Представленные данные показывают отсутствие какой-либо зависимости смещения уровня калия в образцах и возраста человека. Данных, утверждающих обратное, в научных публикациях нами обнаружено не было. Смещение уровня глюкозы, как видно из таблиц 7 и 8, имеет значимую зависимость от возрастного фактора. Это можно объяснить снижением с возрастом внутриклеточного уровня окисления глюкозы во всех тканях организма. А также снижением физической активности, дисфункцией митохондрий, гормональными изменениями, повышенным окислительным стрессом и воспалением [Kalyani R. R., Egan J. M., 2013]. Также в наших данных прослеживается зависимость – отсутствие статистически значимых отличий смещения уровня глюкозы между группами 2 и 3. Возможно, это связано с менее активными изменениями метаболизма глюкозы на рубеже от 60 до 75 лет и старше [Chia C. W., Egan J. M., Ferrucci L., 2018].

#### **4.2. Оценка влияния эндогенных факторов (характеристик клеток крови) на стабильность концентрации глюкозы в различных возрастных группах**

Традиционно снижение уровня глюкозы в пробах объясняют процессом гликолиза в эритроцитах. Однако результаты данного исследования свидетельствуют о незначительном влиянии эритроцитарных индексов крови на уровень снижения глюкозы в пробах, очевидно это связано с образованием сгустка в пробирке и препятствовании доступа глюкозы к красным клеткам крови.

Обнаружение корреляционной зависимости и статистически значимых отличий при сравнении смещения глюкозы у 2х групп с разными уровнями лимфоцитов свидетельствует о влиянии количества лимфоцитов на уровень смещения глюкозы в пробах. По результатам исследования Maciver N. J. и



соавторов [Maciver N. J. et al., 2008] активированные лимфоциты резко увеличивают энергетические потребности для поддержки метаболических процессов, необходимых для роста, пролиферации и эффекторной функции. Таким образом, вклад лимфоцитов в снижение уровня глюкозы в пробах выглядит вполне логичным.

По данным исследования L. Porter и соавторов [Porter L. et al., 2018] нейтрофилы по сравнению с эозинофилами демонстрируют значительно более активное базальное митохондриальное АТФ-связанное дыхание, максимальную запасную и дыхательную способность. Кроме того, эозинофилы имеют гораздо меньшие запасы гликогена по сравнению с нейтрофилами. Результаты нашего исследования логично подтверждают эти данные и свидетельствуют о влиянии количества эозинофилов на смещение глюкозы в пробах.

Корреляционная взаимосвязь смещения глюкозы и тромбоцитарных индексов, на первый взгляд, выглядит достаточно странно. Однако по данным M. Aibibula и соавторов [Aibibula M., Naseem K. M, Sturmeу R. G., 2018] переход тромбоцитов из состояния покоя в активированное состояние требует кардинальных изменений в доступности АТФ. Тромбоциты обладают молекулярным механизмом, необходимым для генерации АТФ как в процессе гликолиза, так и окислительного фосфорилирования. Учитывая вышеизложенное, можно предположить о наличии влияния тромбоцитарных параметров на стабильность уровня концентрации глюкозы во время хранения образцов, что подтверждает наше исследование.

С возрастом происходит снижение внутриклеточного уровня окисления глюкозы во всех тканях организма. Возможные причины снижения эффективности инсулина при старении включают: снижение физической активности, дисфункцию митохондрий, гормональные изменения (то есть снижение IGF-1 и DHEA), повышенный окислительный стресс и воспаление [Kalyani R. R., Egan J. M., 2013]. Обнаруженная нами корреляция уменьшения

уровня смещения глюкозы в пробах у людей более старших возрастных групп также подтверждает имеющиеся литературные данные.

### **4.3. Оценка влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб, поступающих в лабораторию**

#### **4.3.1. Анализ количества гемолизированных проб аппаратным и визуальным методом для определения приемлемого метода детекции**

Наличие клеточных компонентов в образце сыворотки и / или плазмы, высвобождаемых при повреждении клеток крови, а именно эритроцитов, может вызвать значительное смещение в результатах измерения веществ в крови человека [Lippi G. et al., 2006].

Если интерференция превышает допустимые пределы (установленные производителем реактивов и/или прибора), вероятнее всего произойдет клинически значимое смещение в измерении. Как упоминалось ранее, причиной гемолиза *in vitro* являются нарушения алгоритмов венепункции, транспорта и обработки образцов. Таким образом, сбор образцов крови можно считать одной из наиболее важных процедур на преаналитическом этапе биохимических исследований.

Как показывает наше исследование, визуальный подход является довольно субъективным, не стандартизированным и не воспроизводимым. Персонал лаборатории не может достоверно оценить степень интерференции гемоглобина в сыворотке или плазме. Таким образом, визуальная оценка степени фактической концентрации гемолиза является ненадежной, в то время как автоматическое определение сывороточного гемолиза, несомненно, превосходит визуальное обнаружение, что подтверждается рядом авторов [Lippi G et al., 2018]. Кроме того, аппаратный метод существенно улучшает обнаружение умеренно гемолизированных образцов, в которых концентрация

сывороточного свободного гемоглобина колеблется от 0,3 до 0,6 г / л (то есть, показатель визуального обнаружения).

Предположительно, такой подход снизит частоту ошибок, повысит качество оказываемой медицинской помощи и надежность результатов измерений.

#### **4.3.2. Исследование влияния возрастного фактора на количество гемолизированных проб**

В доступных публикациях статистических данных о влиянии возраста человека на возникновение гемолиза в пробах крайне мало, если не сказать отсутствуют. Однако, такие данные интересны с точки зрения повышения качества преаналитического этапа и минимизации искажений результатов биохимического анализа крови. По результатам нашего исследования можно предположить о частичном влиянии возраста на возникновение гемолизированных проб. Согласно полученным данным процент гемолизированных проб существенно выше в 4 группе. Истинную причину таких результатов установить весьма затруднительно, по нашему мнению, ключевую роль в этом играет совокупность факторов от более сложной процедуры венепункции у пожилых [ГОСТ Р 52623.4-2015 Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств - docs.cntd.ru, ] до коморбидности этой группы людей [Arahata M., Asakura H., 2018]. В целом же если рассматривать возрастную шкалу от 21 до 75 и старше влияние возрастного фактора на частоту возникновения гемолизированных проб не существенно, коэффициент корреляции составляет всего 0,299 что можно интерпретировать как слабую зависимость. Таким образом более внимательное отношение к процедуре венепункции у пожилых может снизить количество гемолизированных проб, поступающих в лабораторию. Снижение количества гемолизированных проб при больших объёмах работы

лаборатории позволят получить экономическую выгоду за счет уменьшения тестов, назначаемых повторно.

#### **4.3.3. Ретроспективная оценка влияния возраста на количество проб с критическими значениями уровня калия ( $K^+$ ) и натрия ( $Na^+$ )**

Результаты исследования критических значений электролитов показывают увеличение встречаемости таких результатов с возрастом человека. Также значения уровней рассматриваемых электролитов статистически значимо отличаются в рассматриваемых группах. Такие результаты возможны по причине прогрессирующих с возрастом инволютивных изменений чашечно-лоханочной системы почек. Согласно данным литературы с возрастом, происходит потеря массы и ухудшение функции почек [Toyama T. et al., 2020]. По нашему мнению, гемолиз также вносит вклад в результаты измерения электролитов в полученной выборке, но его влияние в данном случае не является определяющим. В тоже время стоит понимать важность каждой пробы и правильность интерпретации результатов, выводы на основе полученных данных могут повлиять на жизнь человека.

#### **4.3.4. Оценка эффективности разработанных методических рекомендаций по индивидуальному подбору игл для венепункции у лиц пожилого и старческого возраста**

По данным нашего исследования внедрение методики по индивидуальному подбору игл для венепункции у лиц старческого возраста достоверно улучшает показатели качества процесса флеботомии. Это показывает улучшение качества процесса с 3,4 до 3,6  $\sigma$ . В результате этого представляется возможным оценить количество средств, не затраченных на повторные тесты в результате гемолиза проб (таблица 22). Приведенные экономические показатели являются примерными и не учитывают затраты на оплату работы медицинского персонала и реактивы при запуске в работу

гемолизированных проб. Таким образом при индивидуальном подборе игл для венепункции можно на 40% сократить количество гемолизированных проб у лиц старших возрастных групп, что позволяет снизить затраты /на расходные материалы за счёт исключения повторных тестов.

## ВЫВОДЫ

1. Уровень калия в образцах с клеточным компонентом увеличивается при температуре хранения 4°C через 24 часа, при температурах 23°C и 30°C - через 48 часов. Уровень глюкозы в образцах с клеточным компонентом начинает уменьшаться при температуре хранения 4°C через 48 часов, при температурах 23°C и 30°C - через 24 часа.

2. Клинически значимых изменений уровня АЛТ, АСТ, общего билирубина, глюкозы, калия, креатинина, КФК, ЛДГ, мочевины, натрия, общего белка, триглицеридов, щелочной фосфатазы, хлора, холестерина в образцах без клеточного компонента выявлено не было.

3. Смещение уровня глюкозы статистически значимо отличается между возрастными группами от 35 до 59 (средний возраст II половина) и от 60 до 74 лет (пожилой возраст). Также, снижение уровня глюкозы при температуре хранения образцов 4°C в течение 24 ч у лиц старческого возраста ниже на 45% по сравнению с людьми среднего возраста.

4. Изучение стабильности концентрации глюкозы в сыворотке крови при температуре хранения образцов +4°C в течение 24 ч и 48 ч позволило выявить статистически значимое влияние температуры и сроков хранения на образцы. Снижение уровня концентрации глюкозы в пробах связано с увеличением таких показателей, как возраст, количество лимфоцитов (LYM), эозинофилов (EOS), тромбоцитов (PLT), тромбокрита (PCT), и уменьшением таких показателей, как величины среднего объема тромбоцитов (MPV), относительной ширины распределения тромбоцитов по объёму (PDW).

5. Для тестов, чувствительных к гемолизу, важен аппаратный контроль на преаналитическом этапе, что позволит снизить на 33% количество ошибок, связанных с гемолизом, и тем самым повысить качество оказываемой медицинской помощи.

6. У людей в возрасте от 75 лет и старше статистически значимо чаще возникает гемолиз в пробах венозной крови. У лиц старческого возраста

количество гемолизированных биологических проб больше в среднем на 51,5% по сравнению с аналогичным показателем у лиц среднего возраста. Отличие в количестве гемолизированных образцов у лиц пожилого возраста по сравнению с средним возрастом статистически не значимо

7. Индивидуальный подбор игл у лиц пожилого и старческого возраста калибром от G18 (1,2 мм) до G27 (0,45 мм) при визуальном определении диаметра вен от 5 мм и более до 2 мм и менее существенно увеличивает качество процесса и экономическую эффективность флеботомии.

8. Экономические расчеты показали, что экономия при обследовании лиц пожилого и старческого возраста составила: 68 105 за 2019 год, 72 335 рублей за 2020 год и 81 101 за 2021 год, за счет 1233, 1266 и 1333 процедур флеботомии, соответственно, у людей пожилого и старческого возраста, которые не выполнялись повторно. Экономическая выгода достигается за счет сокращения использования расходных материалов при повторных процедурах флеботомии в связи с некачественными образцами крови.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики:

1. Экономически обосновано применение индивидуального подбора игл при венепункции у лиц пожилого и старческого возраста.
2. Рекомендуется внедрить автоматизированное измерение индекса гемолиза во всех образцах сыворотки крови, поступивших в лабораторию, что позволит снизить до минимума количество ошибок и, как результат, повысит качество оказываемой медицинской помощи.
3. Для повышения качества преаналитического этапа при проведении исследований крови биохимического профиля необходимо учитывать, как экзогенные, так и эндогенные факторы (индивидуальный подбор игл при венепункции у лиц старших возрастных групп, время и температура хранения образцов, клеточный состав крови при длительном хранении).



## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Дальнейшее изучение темы должно быть направлено на всестороннее изучение возрастного фактора и влияния на преаналитический этап лабораторных исследований.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ЛПУ - лечебно-профилактическое учреждение

TAT - turn around time

CLSI - clinical & laboratory standards institute

ЭДТА (EDTA) – этилендиаминтетрауксусная кислота

КФК (СК) – креатинфосфокиназа

ГГТП (GGT) - гамма-глутамилтранспептидаза

ЛДГ (LDH) – лактатдегидрогеназа

АТФ – аденозинтрифосфат

АСТ (AST) – аспаратаминотрансфераза

АЛТ (ALT) – аланинаминотрансфераза

ПТС – пневмоническая транспортная система

БПЛА – беспилотный летательный аппарат

ICAO - International Civil Aviation Organization

HIL - Hemolysis, icterus, lipemia

LIS - laboratory information system

RCV - reference change value

CVI - Intraindividual coefficient of variation

CVA - Analytical coefficient of variation

EFLM - European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

CAP - College of American Pathologists

IGF 1 - insulin-like growth factor 1

DHEA – dehydroepiandrosterone

NCS - National Children's Study

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

ЛГ - лютеинизирующий гормон

ХГЧ - хорионический гонадотропин человека

ЩФ (ALP) – щелочная фосфатаза

DHEAS - дегидроэпиандростерон-сульфат

МНО - международное нормализованное отношение

NADH - nicotinamide-adenine-dinukleotidehidride

MDH - malate dehydrogenase

HK – hexokinase

G-6-P - Glucose 6-phosphate

ADP - adenosine diphosphate

НАС - N-ацетил-L-цистеин

GLD – глутаматдегидрогеназа

4-ААП - 4-аминоантипирин

4-ХФ - 4-хлорфенол

p-NPP - p-нитрофенил фосфат

HBA - гидроксibenзойная кислота

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

WBC - количество лейкоцитов

NEUT - количество нейтрофилов

NEUT% - процентное содержание нейтрофилов

LYM - количество лимфоцитов

LYM% - процентное содержание лимфоцитов

MON - количество моноцитов

MON% - процентное содержание моноцитов

EOS - количество эозинофилов

EOS% - процентное содержание эозинофилов

BAS - количество базофилов

BAS% - процентное содержание базофилов

HbG - содержание гемоглобина

HCT – гематокрит

RBC - количество эритроцитов

MCH - среднее содержание гемоглобина в эритроците

MCHC - средняя концентрация гемоглобина в эритроците

MCV - средний объем эритроцита

RDW-CV - коэффициент вариации распределения эритроцитов по объему

PLT - количество тромбоцитов

PCT – тромбокрит

MPV - средний объем тромбоцитов

PDW - распределение тромбоцитов по объему

ФУТ – фотоумножительная трубка

MAPSS - многоугловое разделение рассеянного поляризованного света

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гальченко А. В. Оценка потребности в белке и аминокислотах, исходя из биосинтетических потребностей и показателей азотистого баланса / А. В. Гальченко, Л. Д. Морозова, Т. С. Залетова // Вопросы Диетологии. 2017. Т. 7. № 2. С. 64–68.
2. ГОСТ Р 52623.4-2015 Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств - docs.cntd.ru [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200119182> (дата обращения: 11.04.2021).
3. Гудер В. Г. Пробы: от пациента до лаборатории: влияние факторов преаналитического этапа на качество результатов лабораторных исследований / В. Г. Гудер, С. Нарайанан, Г. Виссер, Б. Цавта. // Москва: Лабора, 2010. Вып. 4. 118 с.
4. Мошкин А. В., Долгов В. В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике // Медиздат, 2004.
5. Персонафикация управления критическими значениями лабораторных показателей неотложных состояний пациентов многопрофильного стационара / В. А. Волчков, А. С. Пушкин, С. А. Рукавишникова, Е. В. Волчкова, А. А. Бояркин // Анестезиология И Реаниматология. 2019. № 5. С. 69–74.
6. Пузин С. Н. Оптимизация питания пожилых людей как средство профилактики преждевременного старения / С. Н. Пузин, А. В. Погожева, В. Н. Потапов // Вопросы Питания. 2018. Т. 87. № 4.
7. Agarwal S. Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays / S. Agarwal, G. Vargas, C. Nordstrom, E. Tam, G. J. Buffone, S. Devaraj // Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. 2015. Vol. 438. P. 241–245.

8. Aibibula M. Glucose metabolism and metabolic flexibility in blood platelets / M. Aibibula, K. M. Naseem, R. G. Sturmev // *J. Thromb. Haemost.* 2018. Vol. 16. № 11. P. 2300–2314.
9. Amukele T. K. Can unmanned aerial systems (drones) be used for the routine transport of chemistry, hematology, and coagulation laboratory specimens? / T. K. Amukele, L. J. Sokoll, D. Pepper, D. P. Howard, J. Street // *PloS One.* 2015. Vol. 10. № 7. P. e0134020.
10. Arahata M. Antithrombotic therapies for elderly patients: handling problems originating from their comorbidities / M. Arahata, H. Asakura // *Clin. Interv. Aging.* 2018. Vol. 13. P. 1675.10. Ashavaid T. F. и др. Influence of blood specimen collection method on various preanalytical sample quality indicators // *Indian J. Clin. Biochem.* 2008. Vol. 23. № 2. P. 144–149.
11. Bashir S. Lipaemic plasma induces haemolysis in resuspended red cell concentrate / S. Bashir, M. Wiltshire, R. Cardigan, S. Thomas // *Vox Sang.* 2013. Vol. 104. № 3. P. 218–224.
12. Berger J. Why do circadian biorhythms age // *J Appl Biomed.* 2003. Vol. 1. P. 77–84.
13. Berk S. I. False Reduction in Serum Methadone Concentrations by BD Vacutainer® Serum Separator Tubes (SST (TM)) / S. I. Berk, A. H. Litwin, Y. Du and G. Cruikshank // *Clin. Chem.* 2006. Vol. 52. № 10. P. 1972.
14. Biologic Variation: Principles and Practice - Westgard [Electronic resource]. URL: <https://www.westgard.com/guest19.htm> (last access: 24.03.2021).
15. Boisrame-Helms J. Lipid emulsions for parenteral nutrition in critical illness / J. Boisrame-Helms, F. Toti, M. Hasselmann, F. Meziani // *Prog. Lipid Res.* 2015. Vol. 60. P. 1–16.

16. Bowen R. A. Effect of Blood Collection Tubes on Total Triiodothyronine and Other Laboratory Assays / R. A. Bowen, Y. Chan, J. Cohen, N. N. Rehak, G. L. Hortin, G. Csako and A. T. Remaley // *Clin. Chem.* 2005. Vol. 51. № 2. P. 424–433.
17. Bowen R. A. R. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays / R. A. R. Bowen, G. L. Hortin, G. Csako, O. H. Otañez, A. T. Remaley // *Clin. Biochem.* 2010. Vol. 43. № 1. P. 4–25.
18. Boyanton Jr B. L. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum / B. L. Boyanton Jr, K. E. Blick // *Clin. Chem.* 2002. Vol. 48. № 12. P. 2242–2247.
19. Cadamuro J. The economic burden of hemolysis / J. Cadamuro, H. Wiedemann, C. Mrazek, T. K. Felder, H. Oberkofler, G. M. Fiedler, E. Haschke-Becher // *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM.* 2015. Vol. 53. № 11. P. e285–e288.
20. Chang T. M. S. Use of finger-prick human blood samples as a more convenient way for in-vitro screening of modified hemoglobin blood substitutes for complement activation: a preliminary report / T. M. S. Chang, C. W. Lister // *Biomater. Artif. Cells. Immobilization Biotechnol.* 1993. Vol. 21. № 5. P. 685–690.
21. Chia C. W. Age-related changes in glucose metabolism, hyperglycemia, and cardiovascular risk / C. W. Chia, J. M. Egan, L. Ferrucci // *Circ. Res.* 2018. Vol. 123. № 7. P. 886–904.
22. Choppin J. Total quality people – a fifth conversation // *Manag. Serv. Qual. Int. J.* 1995. Vol. 5. № 2. P. 10–12.
23. Chung H.-J. Analysis of turnaround time by subdividing three phases for outpatient chemistry specimens / H.-J. Chung, W. Lee, S. Chun, H.-I. Park and W.-K. Min // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2009. Vol. 39. № 2. P. 144–149.



24. Ciloglu F. Exercise intensity and its effects on thyroid hormones / F. Ciloglu, I. Peker, A. Pehlivan, K. Karacabey, N. İlhan, O. Saygin, R. Ozmerdivenli // *Neuroendocrinol. Lett.* 2005. Vol. 26. № 6. P. 830–834.
25. *Clinical Chemistry - 5th Edition* [Electronic resource]. URL: <https://www.elsevier.com/books/clinical-chemistry/kaplan/978-0-323-03658-0> (last access: 17.03.2021).
26. Cohen P. Herbal Supplements: Efficacy, Toxicity, Interactions with Western Drugs, and Effects on Clinical Laboratory Tests // *Focus Altern. Complement. Ther.* 2012. Vol. 17.
27. Cornelis R. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine / R. Cornelis, B. Heinzow, R. F. M. Herber, J. M. Christensen, O. M. Poulsen, E. Sabbioni, D. M. Templeton, Y. Thomassen, M. Vahter, O. Vesterberg // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1996. Vol. 10. № 2. P. 103–127.
28. Cornes M. The CRESS checklist for reporting stability studies: on behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE)/ M. Cornes, A. M. Simundic, J. Cadamuro, S. J. Costelloe, G. Baird, G. B. Kristensen, R. G. Rioja // *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM.* 2021. Vol. 59. № 1. P. 59–69.
29. Cornes M. P. Monitoring and reporting of preanalytical errors in laboratory medicine: the UK situation/ M. P. Cornes, J. Atherton, G. Pourmahram, H. Borthwick, B. Kyle, J. West, S. J. Costelloe // *Ann. Clin. Biochem.* 2016. Vol. 53. № 2. P. 279–284.
30. Cuhadar S. Preanalytical variables and factors that interfere with the biochemical parameters: a review // *OA Biotechnol.* 2013. Vol. 2. № 2. P. 19.

31. Dasgupta A. Time-Dependent Absorption of Therapeutic Drugs by the Gel of the Greiner Vacuette Blood Collection Tube / A. Dasgupta, M. A. Yared, A. Wells // *Ther. Drug Monit.* 2000. Vol. 22. № 4.
32. Dimeski G. Extent of bilirubin interference with Beckman creatinine methods / G. Dimeski, P. Mollee, A. Carter // *Ann. Clin. Biochem.* 2008. Vol. 45. № Pt 1. P. 91–92.
33. Dimeski G. Effects of hyperlipidemia on plasma sodium, potassium, and chloride measurements by an indirect ion-selective electrode measuring system / G. Dimeski, P. Mollee, A. Carter // *Clin. Chem.* 2006. Vol. 52. № 1. P. 155–156.
34. Drone Crash Database [Electronic resource]. URL: <https://dronewars.net/drone-crash-database/> (last access: 16.03.2021).
35. Dubrowny N. E. Collection device / N. E. Dubrowny, A. J. Harrop // 2004.
36. Dugan L. Factors affecting hemolysis rates in blood samples drawn from newly placed IV sites in the emergency department / L. Dugan, L. Leech, K. G. Speroni, J. Corriher // *Journal of Emergency Nursing.* 2005. Vol. 31. №. 4. P. 338-345.
37. Ellis M. J. Hormone stability in human whole blood / M. J. Ellis, J. H. Livesey, M. J. Evans // *Clin. Biochem.* 2003. Vol. 36. № 2. P. 109–112.
38. Endogenous interferences in laboratory tests: icteric, lipaemic and turbid samples - Carys Lippiatt, 2016 [Electronic resource]. URL: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0004563215598419> (last access: 17.03.2021).
39. Er T. K. Selected analyte values in serum versus heparinized plasma using the SYNCHRON LX PRO assay methods/instrument / T. K. Er, L. Y. Tsai, Y. J. Jong, B. H. Chen // *Lab. Med.* 2006. Vol. 37. № 12. P. 731–732.

40. Ernst D. J., Phlebotomy tools of the trade / D. J. Ernst., C. Ernst //Home Healthcare Now. 2002. Vol. 20. №. 3. P. 151-153.
41. Evans E. Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes / E. Evans, V. Heinrich, F. Ludwig, W. Rawicz // Biophysical journal. 2003. Vol. 85. №. 4. P. 2342-2350.
42. Evans M. J. Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones / M. J. Evans, J. H. Livesey, M. J. Ellis and T. G. Yandle // Clin. Biochem. 2001. Vol. 34. № 2. P. 107–112.
43. Fahr A. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs / A. Fahr and X. Liu // Expert Opin. Drug Deliv. 2007. Vol. 4. № 4. P. 403–416.
44. Foucher B. Influence of temperature and delayed centrifugation: stability studies of 28 analytes currently analysed / B. Foucher, G. Pina, G. Desjeux, J. M. Prevosto, J. F. Chaulet and V. Cheminel // Annales de biologie clinique. , 2005. P. 93–100.
45. Fraser C. G. Reference change values // Clin. Chem. Lab. Med. 2012. Vol. 50. № 5. P. 807–812.
46. Garvey W. T. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance / W. T. Garvey, S. Kwon, D. Zheng, S. Shaughnessy, P. Wallace, A. Hutto, K. Pugh, A. J. Jenkins, R. L. Klein, Y. Liao // Diabetes. 2003. Vol. 52. № 2. P. 453–462.
47. Gidske G. Handling of hemolyzed serum samples in clinical chemistry laboratories: the Nordic hemolysis project / G. Gidske, K. M. Aakre, P. Rustad, S. Sandberg, A. Norling, J. Pelanti, G. Henriksen, I. Thorsteinsdottir, G. B. Kristensen // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2019. Vol. 57. № 11. P. 1699–1711.
48. Goodman J. R. Serum Potassium Changes in Blood Clots / J. R. Goodman, J. Vincent, I. Rosen // Am. J. Clin. Pathol. 1954. Vol. 24. № 1\_ts. P. 111–113.

49. Handelsman D. J. Clinical review: The rationale for banning human chorionic gonadotropin and estrogen blockers in sport // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006. Vol. 91. № 5. P. 1646–1653.
50. Harris E. K. On the calculation of a «reference change» for comparing two consecutive measurements / E. K. Harris, T. Yasaka // *Clin. Chem.* 1983. Vol. 29. № 1. P. 25–30.
51. Hennessy M. St John's Wort increases expression of P-glycoprotein: Implications for drug interactions / M. Hennessy, D. Kelleher, J. P. Spiers, M. Barry, P. Kavanagh, D. Back, F. Mulcahy, J. Feely // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2002. Vol. 53. № 1. P. 75–82.
52. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods - 23rd Edition [Electronic resource]. URL: <https://www.elsevier.com/books/henrys-clinical-diagnosis-and-management-by-laboratory-methods/mcpherson/978-0-323-41315-2> (last access: 17.03.2021).
53. Ialongo C. Phlebotomy, a bridge between laboratory and patient / C. Ialongo, S. Bernardini // *Biochem. Medica.* 2016. Vol. 26. № 1. P. 17–33.
54. Imeri F. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100 / F. Imeri, R. Herklotz, L. Risch, C. Arbetsleitner, M. Zerlauth, G. M. Risch, A. R. Huber // *Clin. Chim. Acta.* 2008. Vol. 397. № 1. P. 68–71.
55. Johne A. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*) / A. Johne, J. Brockmöller, S. Bauer, A. Maurer, M. Langheinrich, I. Roots // *Clin. Pharmacol. Ther.* 1999. Vol. 66. № 4. P. 338–345.

56. Jones A. M. Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist / A. M. Jones, J. W. Honour // *Clin. Endocrinol.-Oxf.-*. 2006. Vol. 64. № 3. P. 234.
57. Kalyani R. R., Egan J. M. Diabetes and Altered Glucose Metabolism with Aging // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2013b. Vol. 42. № 2. P. 333–347.
58. Kimori K. Investigation of vasculature characteristics to improve venepuncture techniques in hospitalized elderly patients / K. Kimori, J. Sugama // *Int. J. Nurs. Pract.* 2016. Vol. 22. № 3. P. 300–306.
59. Klose T. Current concepts for quality assured long-distance transport of temperature-sensitive red blood cell concentrates / T. Klose, H. H. Borchert, A. Pruss, W. K. Roth, H. R. Bohnen, M. Putzker // *Vox Sang.* 2010. Vol. 99. № 1. P. 44–53.
60. Knowles T. P. Effects of syringe material, sample storage time, and temperature on blood gases and oxygen saturation in arterialized human blood samples / T. P. Knowles, R. A. Mullin, J. A. Hunter F. H. Douce // *Respir. Care.* 2006. Vol. 51. № 7. P. 732–736.
61. Koesem A. Effect of light on serum vitamin B-12 and folate levels / A. Koesem, M. Senes, C. Topkaya D. Yucel // *Turk. J. Biochem.-TURK Biyokim. Derg.* 2007. Vol. 32. № 2. P. 61–64.
62. Kratz A. A comparison of glass and plastic blood collection tubes for routine and specialized coagulation assays: a comprehensive study / A. Kratz, N. Stanganelli, E. M. Van Cott // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006. Vol. 130. № 1. P. 39–44.
63. Li L. Making sense of a haemolysis monitoring and reporting system: a nationwide longitudinal multimethod study of 68 Australian laboratory participant organisations / L. Li, E. Vecellio, S. Gay, R. Lake, M. Mackay, L. Burnett, D.

Chesher, S. Braye, T. Badrick, J. I. Westbrook, A. Georgiou // Clin. Chem. Lab. Med. 2018. Vol. 56. № 4. P. 565–573.

64. Lima-Oliveira G. Laboratory Diagnostics and Quality of Blood Collection / G. Lima-Oliveira, G. Lippi, G. L. Salvagno, G. Picheth, G. C. Guidi // J. Med. Biochem. 2015. Vol. 34. № 3. P. 288–294.

65. Lippi G. Influence of the needle bore size used for collecting venous blood samples on routine clinical chemistry testing / G. Lippi, G. L. Salvagno, M. Montagnana, G. Brocco, G. C. Guidi // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2006. Vol. 44. № 8. P. 1009–1014.

66. Lippi G. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing / G. Lippi, G. L. Salvagno, M. Montagnana, G. Brocco, G. C. Guidi // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2006. Vol. 44. № 3. P. 311–316.

67. Lippi G. Incomplete filling of lithium heparin tubes affects the activity of creatine kinase and  $\gamma$ -glutamyltransferase / G. Lippi, P. Avanzini, M. Cosmai, R. Aloe, D. Ernst // Br. J. Biomed. Sci. 2012. Vol. 69. № 2. P. 67–70.

68. Lippi G. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE) / G. Lippi, G. Banfi, S. Church, M. Cornes, G. De Carli, K. Grankvist, G. B. Kristensen, M. Ibarz, M. Panteghini, M. Plebani // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2015. Vol. 53. № 3. P. 357–370.

69. Lippi G. Systematic assessment of the hemolysis index: pros and cons // Adv. Clin. Chem. 2015. Vol. 71. P. 157–170.

70. Lippi G. Practical recommendations for managing hemolyzed samples in clinical chemistry testing / G. Lippi, J. Cadamuro, A. von Meyer, A.-M. Simundic // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2018. Vol. 56. № 5. P. 718–727.

71. Lippi G. The future of laboratory medicine in the era of precision medicine/ G. Lippi, A. Bassi, C. Bovo // 2016. 2016. Vol. 1. № 3.
72. Lippi G. Re-engineering laboratory diagnostics for preventing preanalytical errors. / G. Lippi, R. Bowen, D. M. Adcock // Clin. Biochem. 2016. Vol. 49. № 18. P. 1313–1314.
73. Lippi G. Novel opportunities for improving the quality of preanalytical phase. A glimpse to the future? / G. Lippi, J. Cadamuro // J. Med. Biochem. 2017. Vol. 36. № 4. P. 293–300.
74. Lippi G. Visual assessment of sample quality: quo usque tandem? / G. Lippi J. Cadamuro // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2018. Vol. 56. № 4. P. 513–515.
75. Lippi G. Reporting altered test results in hemolyzed samples: is the cure worse than the disease? / G. Lippi, G. Cervellin, M. Plebani // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2017. Vol. 55. № 8. P. 1112–1114.
76. Lippi G. Laboratory medicine does matter in science (and medicine)... yet many seem to ignore it / G. Lippi, M. Plebani // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2015. Vol. 53. № 11. P. 1655–1656.
77. Lippi G. Laboratory networking and sample quality: a still relevant issue for patient safety / G. Lippi A.M. Šimundić // Clin. Chem. Lab. Med. 2012. Vol. 50. № 10. P. 1703–1705.
78. Lopez J. Bruns (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis (5th edition) / J. Lopez, Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. // Indian J. Clin. Biochem. 2013. Vol. 28. № 1. P. 104–105.
79. Luksic A. H. Visual assessment of hemolysis affects patient safety / A. H. Luksic, N. N. Gabaj, M. Miler, L. Dukic, A. Bakliza, A.-M. Simundic // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2018. Vol. 56. № 4. P. 574–581.

80. Maciver N. J. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival / N. J. Maciver, S. R. Jacobs, H. L. Wieman, J. A. Wofford, J. L. Coloff and J. C. Rathmell // *J. Leukoc. Biol.* 2008. Vol. 84. № 4. P. 949–957.
81. Masi C. M. Gender and ethnic differences in urinary stress hormones: the population-based Chicago Health, Aging, and Social Relations Study / C. M. Masi, E. M. Rickett, L. C. Hawkley, J. T. Cacioppo // *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985. 2004. Vol. 97. № 3. P. 941–947.
82. Miles R. R. Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes / R. R. Miles, R. F. Roberts, A. R. Putnam, W. L. Roberts // *Clin. Chem.* 2004. Vol. 50. № 9. P. 1704–1706.
83. Mitchell W. K. Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review / W. K. Mitchell, J. Williams, P. Atherton, M. Larvin, J. Lund, M. Narici // *Front. Physiol.* 2012. Vol. 3. P. 260.
84. Nikolac N. Heterogeneity of manufacturers' declarations for lipemia interference--an urgent call for standardization / N. Nikolac, A.-M. Simundic, M. Miksa, G. Lima-Oliveira, G. L. Salvagno, B. Caruso, G. C. Guidi // *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 2013. Vol. 426. P. 33–40.
85. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management // *Biochem. Medica.* 2014. Vol. 24. № 1. P. 57–67.
86. Niv Y. The alkaline tide phenomenon / Y. Niv, G. M. Fraser // *J. Clin. Gastroenterol.* 2002. Vol. 35. № 1. P. 5–8.
87. Oddoze C. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma / C. Oddoze, E. Lombard, H. Portugal // *Clin. Biochem.* 2012. Vol. 45. № 6. P. 464–469.



88. Ono T. Serum-constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. / T. Ono, K. Kitaguchi, M. Takehara, M. Shiiba, K. Hayami // Clin. Chem. 1981a. Vol. 27. № 1. P. 35–38.
89. Ouweland J. M. van den. High Total Protein Impairs Appropriate Gel Barrier Formation in BD Vacutainer Blood Collection Tubes / M. van den Ouweland, S. Church // Clin. Chem. 2007. Vol. 53. № 2. P. 364–365.
90. Parent X. Delayed measurement of PTH in patients with CKD: storage of the primary tube in the dialysis unit, which temperature? Which kind of tube? / X. Parent, F. Alenabi, P. Brignon, J.-C. Souberbielle // Nephrol. Ther. 2008. Vol. 5. № 1. P. 34–40.
91. Paterson D. H. Physical activity and functional limitations in older adults: a systematic review related to Canada's Physical Activity Guidelines / D. H. Paterson, D. E. Warburton // Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act. 2010. Vol. 7. P. 38.
92. Pettersson J. Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men / J. Pettersson, U. Hindorf, P. Persson, T. Bengtsson, U. Malmqvist, V. Werkström, M. Ekelund // Br. J. Clin. Pharmacol. 2008. Vol. 65. № 2. P. 253–259.
93. Porter L. Metabolic Profiling of Human Eosinophils / L. Porter, N. Toepfner, K. R. Bashant, J. Guck, M. Ashcroft, N. Farahi, E. R. Chilvers // Front. Immunol. 2018. Vol. 9. P. 1404.
94. Prabhu S. Needles and needleless devices for infusion of anti-haemophilic factor concentrate: impact on protein structure and function / S. Prabhu, T. Kazarian, N. Hakobyan, A. Jabbar, T. Dunham, L. A. Valentino // Haemophilia. 2006. Vol. 12. № 1. P. 58–61.
95. Pupek A. Comparison of pneumatic tube system with manual transport for routine chemistry, hematology, coagulation and blood gas tests / A. Pupek, B.

Matthewson, E. Whitman, R. Fullarton, Y. Chen // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2017. Vol. 55. № 10. P. 1537–1544.

96. Raman G. Update on emerging genetic tests currently available for clinical use in common cancers / G. Raman, E. E. Avendano and M. Chen // 2015.

97. Rayana M. C. B. Recommendation for measuring and reporting chloride by ISEs in undiluted serum, plasma or blood: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC): IFCC Scientific Division, Committee on Point of Care Testing and Working Group on Selective Electrodes / C. B. Rayana, R. W. Burnett, A. K. Covington, P. D’Orazio, N. Fogh-Andersen, E. Jacobs, R. Katakya, W. R. Külpmann, K. Kuwa and L. Larsson // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2006. Vol. 44. № 3. P. 346–352.

98. Remer T. Short-term impact of a lactovegetarian diet on adrenocortical activity and adrenal androgens / T. Remer, K. Pietrzik, F. Manz // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998. Vol. 83. № 6. P. 2132–2137.

99. Rohr U.P. The value of in vitro diagnostic testing in medical practice: a status report / U.-P. Rohr, C. Binder, T. Dieterle, F. Giusti, C. G. M. Messina, E. Toerien, H. Moch, H. H. Schäfer // PloS One. 2016. Vol. 11. № 3. P. e0149856.

100. Russia - Age distribution 2019 [Electronic resource]. URL: <https://www.statista.com/statistics/271344/age-distribution-in-russia/> (last access: 15.03.2021).

101. Schiettecatte J. Interferences in Immunoassays / J. Schiettecatte, E. Anckaert, J. Smits // Adv. Immunoass. Technol. 2012.

102. Shepherd A. J. A Scottish study of heel-prick blood sampling in newborn babies / A. J. Shepherd, A. Glenesk, C. A. Niven, J. Mackenzie // Midwifery. 2006. Vol. 22. № 2. P. 158–168.

103. Simundic A.-M. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? / A.-M. Simundic, N. Nikolac, V. Ivankovic, D. Ferenec-Ruzic, B. Magdic, M. Kvaternik // 2009.
104. Simundic A.-M. Survey of national guidelines, education and training on phlebotomy in 28 European countries: an original report by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PA) / A.-M. Simundic, M. Cornes, K. Grankvist, G. Lippi, M. Nybo, S. Kovalevskaya, L. Sprongl, Z. Sumarac, S. Church // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2013. Vol. 51. № 8. P. 1585–1593.
105. Simundic A.-M. Preanalytical Phase—an updated review of the current evidence // Biochem. Medica. 2014. Vol. 24. № 1. P. 6–6.
106. Simundic A.-M. Compliance of blood sampling procedures with the CLSI H3-A6 guidelines: An observational study by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PRE) / A.-M. Simundic, S. Church, M. P. Cornes, K. Grankvist, G. Lippi, M. Nybo, N. Nikolac, E. van Dongen-Lases, P. Eker, S. Kovalevskaya // Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 2015. Vol. 53. № 9. P. 1321–1331.
107. Six Sigma Tutorial - Tutorialspoint [Electronic resource]. URL: [https://www.tutorialspoint.com/six\\_sigma/index.htm](https://www.tutorialspoint.com/six_sigma/index.htm) (last access: 11.04.2021).
108. Spiritus T. Iodinated contrast media interfere with gel barrier formation in plasma and serum separator tubes / T. Spiritus, Z. Zaman, W. Desmet // Clin. Chem. 2003. Vol. 49. № 7. P. 1187.
109. Stankovic A. K. Elevated serum potassium values: the role of preanalytic variables / A. K. Stankovic, S. Smith // Pathol. Patterns Rev. 2004. Vol. 121. № suppl\_1. P. S105–S112.

110. Steindel S. J. Physician satisfaction and emergency department laboratory test turnaround time: observations based on College of American Pathologists Q-Probes studies / S. J. Steindel, P. J. Howanitz // Arch. Pathol. Lab. Med. 2001. Vol. 125. № 7. P. 863–871.
111. Talke H. [ENZYMATIC UREA DETERMINATION IN THE BLOOD AND SERUM IN THE WARBURG OPTICAL TEST] / H. Talke, G. E. Schubert // Klin. Wochenschr. 1965. Vol. 43. P. 174–175.
112. Thalacker-Mercer A. E. Nutrient Ingestion, Protein Intake, and Sex, but Not Age, Affect the Albumin Synthesis Rate in Humans / A. E. Thalacker-Mercer, C. A. Johnson, K. E. Yarasheski, N. S. Carnell, W. W. Campbell // J. Nutr. 2007. Vol. 137. № 7. P. 1734–1740.
113. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - 6th Edition [Electronic resource]. URL: <https://www.elsevier.com/books/tietz-textbook-of-clinical-chemistry-and-molecular-diagnostics/rifai/978-0-323-35921-4> (last access: 16.03.2021).
114. Tipton K. D. Gender differences in protein metabolism // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2001. Vol. 4. № 6. P. 493–498.
115. Toyama T. Age differences in the relationships between risk factors and loss of kidney function: a general population cohort study / T. Toyama, K. Kitagawa, M. Oshima, S. Kitajima, A. Hara, Y. Iwata, N. Sakai, M. Shimizu, A. Hashiba, K. Furuichi // BMC Nephrol. 2020. Vol. 21. № 1. P. 1–9.
116. Twomey P. J. Unreliability of triglyceride measurement to predict turbidity induced interference / P. J. Twomey, A. C. Don-Wauchope, D. McCullough // J. Clin. Pathol. 2003. Vol. 56. № 11. P. 861–862.

117. Vermeer H. J. Automated processing of serum indices used for interference detection by the laboratory information system / H. J. Vermeer, E. Thomassen, N. de Jonge // *Clin. Chem.* 2005. Vol. 51. № 1. P. 244–247.
118. Wang C. Validation of a testosterone and dihydrotestosterone liquid chromatography tandem mass spectrometry assay: interference and comparison with established methods / C. Wang, S. Shiraishi, A. Leung, S. Baravarian, L. Hull, V. Goh, P. W. Lee, R. S. Swerdloff // *Steroids*. 2008. Vol. 73. № 13. P. 1345–1352.
119. Weinert D. Age-dependent changes of the circadian system // *Chronobiol. Int.* 2000. Vol. 17. № 3. P. 261–283.
120. WHO J. Protein and amino acid requirements in human nutrition // World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 2007. № 935. P. 1.
121. Wilde C. Chapter 6.1 - Sample Collection, Including Participant Preparation and Sample Handling / C. Wilde, D. Out, S. Johnson, D. A. Granger // *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)* / под ред. D. Wild. Oxford: Elsevier, 2013. P. 427–440.
122. Woolsey C., Goff J. The Effects of hCG Diet Injections on Common Pregnancy Tests / C. Woolsey, J Goff, //2012 NCUR Password Protected Papers.
123. Yancy Jr W. S. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial / W. S. Yancy Jr, M. K. Olsen, J. R. Guyton, R. P. Bakst, E. C. Westman // *Ann. Intern. Med.* 2004. Vol. 140. № 10. P. 769–777.
124. Zamani G. R. The effects of classic ketogenic diet on serum lipid profile in children with refractory seizures / G. R. Zamani, M. Mohammadi, M. R. Ashrafi, P. Karimi, M. Mahmoudi, R. S. Badv, A. R. Tavassoli, R. A. Malamiri // *Acta Neurol. Belg.* 2016. Vol. 116. № 4. P. 529–534.

125. Zhang D. J. Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results / D. J. Zhang, R. K. Elswick, W. G. Miller, J. L. Bailey // Clin. Chem. 1998. Vol. 44. № 6. P. 1325–1333.

126. Zwart S. R. Stability of analytes related to clinical chemistry and bone metabolism in blood specimens after delayed processing / S. R. Zwart, M. Wolf, A. Rogers, S. Rodgers, P. L. Gillman, K. Hitchcox, K. L. Ericson, S. M. Smith // Clin. Biochem. 2009. Vol. 42. № 9. P. 907–910.