

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ, ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ И ИНГИБИТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ХРАНЕНИИ И РАЗМОРАЖИВАНИИ

УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Беларусь

Установлено, что проведение процедуры многократного замораживания-размораживания сыворотки крови, также как и хранение в течение 30 суток при температуре -20°C , не влияет на форму спектров флуоресценции и положение максимума. Однократное размораживание сыворотки крови не приводит к изменениям интенсивности флуоресценции в максимуме спектра и показателей ее протеолитической и ингибиторной активности. Хранение сыворотки крови в течение 30 суток в замороженном состоянии также не влияет на интенсивность флуоресценции и протеолитическую и ингибиторную активность данного биологического материала (за исключением девятых суток хранения).

Ключевые слова: сыворотка крови, флуоресценция, протеолитическая активность

Введение

Исследование влияния длительности хранения и процедуры замораживания-размораживания таких биологических материалов, как сыворотка или плазма крови, имеет, наряду с теоретическим, и большое практическое значение, поскольку данный материал постоянно используется в клинической медицине. Современная техника флуоресцентного анализа позволяет изучать конформационные изменения белков, их обратимость и устойчивость к действию низкой температуры, солей, pH и др.; экспериментально определять зоны температурных изменений и повреждений белков, а также давать практические рекомендации по разработке методов их низкотемпературного хранения.

Особенностью реакции многокомпонентных белковых систем на действие замораживания-размораживания является их неодинаковая чувствительность к указанным факторам. Например, процесс низкотемпературного хранения (при -196°C) приводил к изменениям белков плазмы, которые выражались в частичной дегидратации и агрегации белковых макромолекул (альбуминов, иммуноглобулинов), снижению функциональных свойств глобулиновой фракции, изменению макроструктуры фибриногена [1]. Установлено,

что быстрое замораживание-отогрев влияло на спектральные характеристики белков сыворотки крови и повышало доступность растворителю поверхностных белковых хромофоров. Однако данные изменения не сопровождались существенным изменением функциональных свойств сывороточных белков, тогда как медленный режим замораживания приводил к значительно более выраженным изменениям как спектральных параметров, так и функциональных свойств белков сыворотки. Установлено, что преимущественные изменения происходили в состоянии поверхностных, полярных участков белков плазмы после замораживания-оттаивания [2].

Особенности условий хранения, длительность и процедура размораживания сыворотки крови могут сыграть определяющую роль в проведении того или иного лабораторного теста и негативно отразиться на результатах исследования. Поэтому **целью** данного исследования было установить возможные изменения спектральных характеристик и показателей протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови людей при проведении замораживания-размораживания в обычных клиничко-лабораторных условиях (замораживание в морозильной камере при $t = -20^{\circ}\text{C}$ и размораживание при $t = +20^{\circ}\text{C}$),

а также при хранении в течение 30 суток при $t = -20^{\circ}\text{C}$.

Материалы и методы исследований

Для проведения данного эксперимента использовалась сыворотка крови 120 доноров (60 мужчин и 60 женщин), полученная на базе Витебского областного диагностического центра. Средний возраст обследованных составил $43,5 \pm 7,3$ лет. Из полученных сывороток были сформированы 15 пулов, каждый из которых состоял из 9-10 сывороток, слитых вместе. Затем каждый отдельно взятый пул был распипетирован по аликвотам 1 мл для дальнейшего хранения. Экспериментальную группу составили из 15 образцов – по одному образцу из каждого пула, что обеспечивало однородность исследуемых групп. При исследовании зависимости показателей интенсивности флуоресценции и протеолитической активности сыворотки крови от длительности хранения количество групп (6) определялось сроками хранения биоматериала: 0, 2, 6, 9, 15 и 30 суток хранения. Исследование не подвергавшихся заморозке образцов (нулевые сутки хранения) проводилось непосредственно в день получения сыворотки крови. Остальные сформированные группы сывороток хранились в морозильной камере при $t = -20^{\circ}\text{C}$ необходимое время, затем размораживались и исследовались при комнатной температуре.

Для изучения влияния процедуры замораживания-размораживания сыворотки крови на интенсивность флуоресценции и протеолитическую активность использовались те же пулы сывороток, что и для исследования длительности хранения и тот же принцип формирования групп. Количество групп равнялось 4, что соответствовало количеству процедур замораживания-размораживания образцов: нулевое размораживание (сыворотки, не подвергавшиеся размораживанию), однократное, двукратное и трехкратное размораживание. Размораживание и исследование проводилось при комнатной

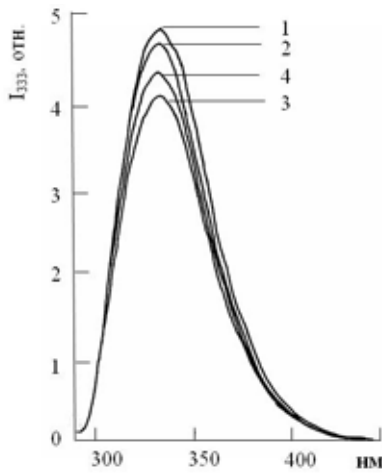
температуре, т. е. в обычных клиничко-лабораторных условиях. Все образцы непосредственно перед флуориметрическим исследованием были разведены 0,89% физиологическим раствором в 20 раз.

Спектры флуоресценции регистрировались непосредственно после разведения при комнатной температуре на спектрофлуориметре CM-2203 (SOLAR, Беларусь) при длине волны возбуждения 286 нм в диапазоне 300-500 нм с использованием кварцевой кюветы размером $1,2 \times 1,2$ см. Ширина входной и выходной щелей монохроматоров составляла соответственно 5 нм и 2 нм [1, 3, 4]. Определение протеолитической активности в сыворотке крови проводилось с использованием в качестве субстратов высокостабильного в растворе низкомолекулярного хромогенного соединения – N- α -бензоил-D,L-аргинин паранитроанилид (БАПНА) и за основу взят метод Erlander V. F. et al. [5, 6]. Основой для определения активности ингибиторов служил метод, предложенный Т.А. Хватовым и В.Б. Беловой [7].

Статистическая обработка результатов экспериментов была проведена с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Описательная статистика включала проверку нормальности распределения количественных показателей с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро-Уилка [8]. Для выявления значимых различий по анализируемому показателю более чем в двух группах, применялся непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок. Критическое значение уровня значимости принималось с учетом поправки Бонферони [9, 10].

Результаты исследования

Анализ спектров собственной флуоресценции сыворотки крови людей показал, что все исследуемые образцы имели аналогичную форму спектра с максимумом при 333 нм, что характерно для хромофорных аминокислотных остатков белков (в основном триптофана и тирозина) (рисунок 1).



- 1 – не подвергавшейся замораживанию и хранению (нулевые сутки хранения),
- 2 – после однократного размораживания,
- 3 – после двукратного размораживания,
- 4 – после трехкратного размораживания

Рисунок 1 – Характерные спектры собственной флуоресценции образцов сыворотки крови людей

Согласно литературным данным [3, 4], такое положение максимума спектра флуоресценции соответствует неполярной форме триптофановых остатков белков (находятся внутри белка в неполярном окружении).

Проведение процедуры многократного замораживания-размораживания сыворотки крови не повлияло на форму ее спектров флуоресценции и положение максимума. При любом количестве процедур размораживания образцов (от 1 до 3 раз) спектры были аналогичны спектрам сывороток, не подвергавшимся замораживанию (рисунок 1). Однако интенсивность флуоресценции сыворотки крови в максимуме эмиссии значительно снижалась после вторичного размораживания образцов на 8,8% по сравнению с образцами, размороженными один раз ($p=0,007$) и на 9,2% по сравнению с сыворотками, не подвергавшимися замораживанию ($p=0,017$; таблица 1).

Аналогичные результаты наблюдались для показателя I_{333} при

трехкратном размораживании образцов сыворотки крови: уменьшение интенсивности флуоресценции на 7,5% по сравнению с сыворотками, размороженными один раз ($p=0,017$) и на 7,9% – по сравнению с сыворотками, не подвергавшимися размораживанию ($p=0,017$). Однократное размораживание сыворотки не имело значимых различий по показателю I_{333} от образцов сыворотки крови, не подвергавшихся заморозке.

Анализ протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови при многократном размораживании выявил следующие изменения (таблица 2). Общая протеолитическая активность (ОПА) образцов сыворотки крови значительно уменьшалась после 3-го размораживания: на 54% по сравнению с сыворотками, которые не подвергались замораживанию ($p=0,007$) и на 40% по сравнению с образцами сывороток после первого размораживания ($p=0,017$).

Содержание α -1-протеиназного ингибитора (АПИ) в образцах сыворотки крови значительно увеличивалось на 84% ($p=10^{-4}$) и на 93% ($p=4,4 \cdot 10^{-5}$) после двукратного и трехкратного размораживания образцов соответственно по сравнению с образцами, не подвергавшимися замораживанию. Кроме того, значимое увеличение содержания АПИ на 58% ($p=0,017$) наблюдалось также после третьего размораживания сыворотки крови по сравнению с однократно размороженными сыворотками. Содержание α -2-макроглобулина (α_2 -МГ) не имело значимых различий между исследуемыми группами сравнения.

Таблица 1 – Изменение интенсивности флуоресценции I_{333} сыворотки крови при многократном размораживании ($n=15$)

№ группы	Количество процедур размораживания	I_{333}		
		Me	10 процентиль	90 процентиль
1	0	4,68	4,52	4,91
2	1	4,66	4,52	5,20
3	2	4,25 ^{1,2}	3,68	4,50
4	3	4,31 ^{1,2}	3,67	4,51

Примечание: ¹ – значимость различий по сравнению с 1-й группой ($p<0,02$); ² – по сравнению со 2-й группой ($p<0,02$)

Таблица 2 – Изменение показателей протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови при многократном размораживании (n=15)

№ группы	Количество процедур размораживания	Показатели протеолитической активности								
		ОПА			АПИ			α ₂ -МГ		
		Me	10 процентиль	90 процентиль	Me	10 процентиль	90 процентиль	Me	10 процентиль	90 процентиль
1	0	7,37	5,18	15,64	1,50	0,73	1,88	1,08	0,93	1,22
2	1	5,67	5,12	12,47	1,83	1,17	2,12	1,04	0,96	1,28
3	2	5,10	1,70	13,61	2,76 ¹	2,00	2,91	1,09	1,03	1,12
4	3	3,40 ^{1,2}	0,57	5,10	2,89 ^{1,2}	2,14	3,21	1,00	0,97	1,06

Примечание: значимость различий по сравнению: ¹ – с 1-й группой (p<0,02); ² – со 2-й группой (p<0,02).

Следовательно, однократное размораживание сыворотки крови не приводит к изменениям интенсивности флуоресценции в максимуме спектра и показателей ее протеолитической и ингибиторной активности. Значимые изменения данных параметров наблюдаются только при дальнейшем повторении процедуры замораживания-размораживания сыворотки.

Хранение сыворотки крови в течение 30 суток при t=-20°C не повлияло на форму спектра флуоресценции и положение максимума (также как и в случае многократного размораживания). Все спектры были аналогичны приведенному на рисунке 1 спектру № 1 (нулевые сутки хранения).

Результаты измерения интенсивности флуоресценции сыворотки крови людей в максимуме эмиссии (I₃₃₃) для различных сроков хранения представлены в таблице 3. Значимые изменения по показателю I₃₃₃ наблюдались только между группами образцов, хранившихся 9 и 15 суток: на 9-е сутки хранения интенсивность флу-

оресценции была ниже на 9%, чем на 15-е сутки (p=0,007). Причем при дальнейшем хранении сыворотки в замороженном виде (15 и более суток) данный показатель возвращался к уровню флуоресценции сывороток, хранившихся 0-6 суток. Следовательно, можно считать, что длительность хранения сыворотки крови в течение 30 суток в замороженном состоянии при температуре -20 °C практически не влияет на интенсивность флуоресценции.

Показатели протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови людей с различными сроками хранения приведены в таблице 4.

Анализ данных показателей выявил следующие закономерности. По уровню общей протеолитической активности и содержанию α₂-МГ в сыворотке крови значимых изменений между группами сравнения во все сутки хранения не наблюдалось.

Содержание АПИ значительно увеличивалось на 72 % на 9-е сутки хранения по сравнению с образцами сыворотки крови, хранившимися двое суток (p=0,005) и на 55% по сравнению с образцами, хранившимися 6 суток (p=0,003). В остальные сроки хранения различий между группами по данному показателю

Таблица 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции (I₃₃₃) сыворотки крови от длительности хранения при t= -20°C (n=15)

№ группы	Длительность хранения (сутки)	I ₃₃₃		
		Me	10 процентиль	90 процентиль
1	0	4,68	4,52	4,91
2	2	4,66	4,38	5,11
3	6	4,62	4,24	5,08
4	9	4,34*	3,84	4,53
5	15	4,78	4,54	5,36
6	30	4,66	4,52	5,20

Примечание: * – значимость различий по сравнению с 5-й группой (p=0,007)

Таблица 4 – Зависимость показателей протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови от длительности хранения при $t = -20^{\circ}\text{C}$ ($n=15$)

№ группы	Длительность хранения (сутки)	Показатели протеолитической активности								
		ОПА			АПИ			α_2 -МГ		
		Me	10 процентиль	90 процентиль	Me	10 процентиль	90 процентиль	Me	10 процентиль	90 процентиль
1	0	7,37	5,18	15,64	1,50	0,73	1,88	1,08	0,70	1,40
2	2	6,81	2,27	14,74	1,20	0,67	1,77	0,84	0,62	1,35
3	6	3,40	1,70	8,51	1,33	0,39	1,78	1,12	0,99	1,50
4	9	5,10	1,7	11,91	2,06*,**	1,79	2,98	1,05	0,75	1,15
5	15	5,10	1,36	13,05	1,33	1,27	2,38	0,99	0,88	1,08
6	30	5,67	4,53	12,47	1,83	1,17	2,12	1,04	0,84	1,48

Примечание: * – значимость различий по сравнению с 2-й группой ($p < 0,005$); ** – по сравнению с 3-й группой ($p < 0,005$).

лю не наблюдалось. Таким образом, хранение сыворотки крови в течение 30 суток практически не влияет на протеолитическую и ингибиторную активность данного биологического материала (за исключением девятих суток хранения).

Следовательно, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о возможности использования сыворотки крови людей в течение данного срока хранения и после однократного размораживания для исследования ее флуоресценции и протеолитической активности.

Библиографический список

1. Дюбко, Т. С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. 1. Собственная флуоресценция белков / Т. С. Дюбко // Вестник Харьковского национального университета. Сер. биология. – 2006. – В. 3, № 729. – С. 221-231.
2. Влияние замораживания на плазму донорской крови / Т. С. Дюбко [и др.] // Вестник Харьковского национального университета. Сер. биология. – 2006. – вып. 4, № 748. – С. 128-133.
3. Черницкий, Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке / Е. А. Черницкий. – Минск: Наука и техника, 1972. – 258 с.
4. Лакович, Дж. Основы флуоресцент-

ной спектроскопии. / Дж. Лакович. – М: Мир, 1986. – 496 с.

5. Erlanger, D.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / D.F. Erlanger, N. Kokowsky // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95, № 2. – P. 271-278.

6. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2000. – 542 с.

7. Хватов, В.Б. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: метод. рекомендации / В. Б. Хватов, Т.А. Белова. МЗ РСФСР. – М., 1981. – 16 с.

8. Боровиков В. П. Statistica: искусство анализа данных на компьютере / В. П. Боровиков. – СПб.: Питер, 2001. – 320 с.

9. Авива, Петри Наглядная медицинская статистика / Петри Авива, Кэролайн Сэбин; перевод с английского под редакцией В. П. Леонова. – 2-е издание. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 168 с.

10. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2003. – 312 с.

11. Гельман, В. Я. Медицинская информатика: Практикум / В. Я. Гельман. СПб.: Питер, 2001. – 480 с.

S.V. Ivanova, L.N. Kirpichonok

FLUORESCENCE, PROTEOLYTIC AND INHIBITOR ACTIVITY OF BLOOD SERUM AT STORAGE AND DEFREEZING.

Was established that carrying out of procedure of repeated freezing-defreezing of blood serum as well as storage within 30 day at temperature -20°C , does not influence on the form of its spectra of fluorescence and position of maximum. 1-fold defreezing of blood serum does not lead to changes of intensity of fluorescence in a maximum of a spectrum and parameters proteolytic and inhibitors activity. Storage of blood serum within 30 day in the frozen condition also does not influence on intensity of fluorescence both proteolytic activity and concentration of the basic inhibitors of the given biological material (except for the ninth day of storage).

Key words: *blood serum, fluorescence, proteolytic activity*

Поступила 17.03.10