

УДК: 577.352.336: 57.043:618

## ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПЛАЗМУ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

Т.С.Дюбко<sup>1</sup>, Т.Ф.Морозова<sup>2</sup>, О.В.Липина<sup>2</sup>, Э.А.Ромоданова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины» (Харьков, Украина)

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

<sup>3</sup>Национальный фармацевтический университет (Харьков, Украина)

tdyubko@mail.ru; cryo@online.kharkov.ua

Исследованы температурные зависимости спектров поглощения и вязкости, а также спектры собственной флуоресценции плазмы крови взрослых доноров. Изучено влияние замораживания на спектральные характеристики плазмы донора. Полученные результаты интерпретируются с точки зрения влияния низкой температуры на межмолекулярные взаимодействия в водно-белковых растворах.

Ключевые слова: *плазма донорской крови, температура, поглощение, флуоресценция, вязкость, замораживание.*

### Введение

В клинических целях на протяжении нескольких десятков лет применяют свежезамороженную донорскую плазму (Pickering et al., 1969; Rice, Moss, 1979; Koerner et al., 1981; Hauben et al., 1982; Schlesinges, Frey-Wettstein, 1983; Cuschieri et al., 1983; Sabbagh et al., 1984; Snyder et al., 1986; Butler et al., 1992; Akerblom et al., 1992; Gurevich et al., 1993). Положительные результаты, наблюдаемые при трансфузии плазмы, предопределяют успешное применение компонентов плазмы при лечении и коррекции различных патологий. Это делает актуальным изучение особенностей белковой компоненты крови при криовоздействиях.

В плазме крови человека насчитывается более 30 белков с молекулярной массой от 44000 до 1 300000. Содержание отдельных белков в плазме колеблется в широких пределах. На долю альбумина (САЧ) приходится от 52 до 65% всех белков плазмы, и его содержание составляет 3,5–5 г на 100 мл; на долю глобулинов приходится 30–54 % от общего белка. На белки свертывающей системы крови и фибриноген – 0,2–0,4 г на 100 мл или до 4% от общего белка (Кухта и др., 1986). В целом, около 10 белков составляют количественно порядка 90% от общей массы белков плазмы, на остальные же 10% приходится свыше 100 различных белков, содержание которых может варьировать в пределах 50–200 мкг/л.

Белки плазмы являются важнейшей биохимической системой крови, которая играет роль специализированной ткани, регулирующей обменные процессы организма. Они поддерживают постоянство рН среды организма, создают необходимое осмотическое (онкотическое) давление, осуществляют транспорт различных метаболитов, выполняют защитные функции в организме. Большое значение имеет вязкость плазмы. Известно, что вязкость плазмы определяется концентрацией белков и зависит от изменения белкового состава, формы молекулы и молекулярной массы белков (Физиология человека, 1986). Действие альбумина на вязкость плазмы мало выражено. Увеличение в плазме концентрации глобулинов от 1 до 4%, которое может иметь место при патологических состояниях, ведет к удвоению вязкости плазмы (Христофоров и др., 1990). Сильнее всего на вязкость плазмы цельной крови влияет фибриноген (Павловский, Пальмин, 1963).

Целью настоящей работы явилось исследование влияния замораживания–отогрева на спектральные и реологические характеристики плазмы донорской крови. Нами использовался режим «медленного замораживания», при котором можно ожидать наибольшего проявления изменений, вызванных понижением температуры (Актуальные проблемы криобиологии, 1981; Goodin, Levitt, 1970).

### Объекты и методы исследования

Гепаринизированную кровь получали из Харьковской областной станции переливания крови (28 образцов). Плазму выделяли (Грищенко та ін., 2000) путем сбора надосадка после осаждения клеток крови в течение 10 минут при 3000 об/мин и разводили физиологическим раствором (0,89% NaCl, pH 7,4) до конечной концентрации белка – 2÷10 мг/мл. Содержание белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Замораживание образцов плазмы объемом 3 мл производили в пластиковых пробирках до –20°С (скорость охлаждения на этом этапе составляла 5°С/мин) до температуры кристаллизации с последующим погружением в жидкий азот (–196°С; скорость охлаждения – около 200°С/мин). Отогрев

производили на водяной бане (40°C) при перемешивании.

Оптическую плотность образцов регистрировали на спектрофотометре "Pye Unicam SP-8000" (Англия) со стандартной термоприставкой при температурах 5–90°C в термостатированных кварцевых кюветах. Контроль температуры с точностью  $\pm 1^\circ\text{C}$  осуществляли хромель-копелевой термопарой. Анализировали оптическую плотность белка в максимуме спектра поглощения ( $D$ ) и первые производные спектров поглощения (1ПСП) (Демченко и др., 1978; Демченко, 1981).

Спектры собственной флуоресценции плазмы регистрировали при 22°C на спектрофлуориметре "Hitachi F4010" (Япония) с использованием длин волн возбуждения 280 и 296 нм. Шаг сканирования монохроматора был равен 1 нм, ширины входной и выходной щелей составляли 3 и 5 нм соответственно. Приборная ошибка всех спектральных измерений не превышала  $\pm 0,5$  нм.

Реологические свойства плазмы определяли на капиллярно-рамочном вискозиметре Копли в модификации (Пушкарь и др., 1979) с расчетом динамической вязкости ( $\eta$ ) и напряжения сдвига.

Статистическую обработку результатов проводили методом Стьюдента (Лакин, 1990) с помощью программного пакета «Статграф». Производные спектров поглощения и флуоресценции строили в программе "Microcal Origin 6.0". Максимумы спектров поглощения и флуоресценции находили как точку обращения в ноль их первых производных.

### Результаты и обсуждение

Анализ спектральных характеристик плазмы донорской крови показал, что для большинства образцов они достаточно близки, хотя наблюдались некоторые отличия для отдельных образцов. Индуцированные температурой изменения спектров поглощения суммарных белков плазмы донорской крови наблюдаются в температурных интервалах 25–32, 39–41, 49–52 и более 78°C (рис. 1).

Для 1ПСП белков плазмы донорской крови характерны два основных отрицательных пика – около 293 и 286–288 нм. Положение минимумов 1ПСП при длинах волн менее 280 нм и более 295 нм несколько изменяется от донора к донору, однако полосы с положительными максимумами от 260 до 275 нм, а также при длинах волн более 300 нм обнаруживаются почти во всех образцах.

При повышении температуры от 5 до 90°C положение длин волн полос 1ПСП изменяется в пределах  $\pm 2$  нм. Анализ спектров поглощения и их производных обнаруживает немонотонную температурную зависимость положения максимумов спектров поглощения и минимумов их 1ПСП. Интенсивности 1ПСП белков плазмы донорской крови в зависимости от температуры при этом изменяются незначительно. Немонотонные изменения были также обнаружены нами для вязкости плазмы в интервале температур 0–40°C (рис. 2).

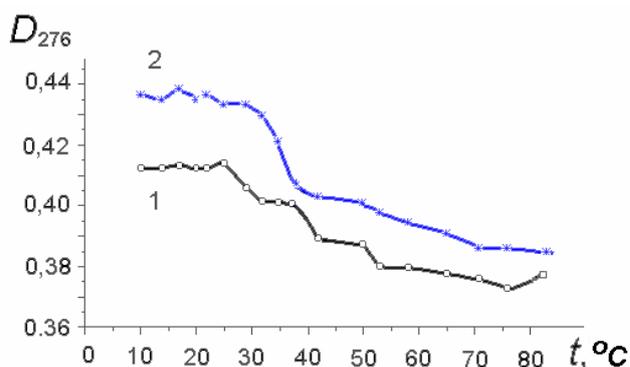


Рис. 1. Температурная зависимость интенсивности поглощения белков плазмы крови донора в максимуме спектра:

1 – контроль; 2 – после замораживания–отогрева.

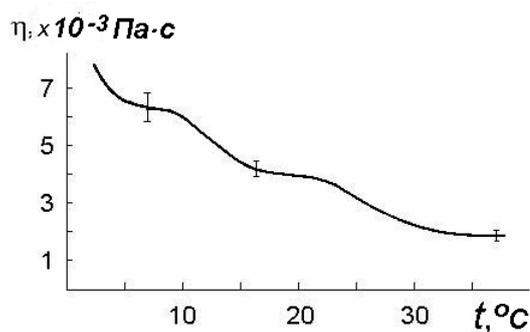


Рис. 2. Влияние температуры на вязкость плазмы крови при напряжении сдвига, равном 0,37 Па

В совокупности полученные результаты позволяют заключить, что процесс термоденатурации белков плазмы крови донора протекает поэтапно. Мы предполагаем, что немонотонные изменения спектральных и вязкостных характеристик донорской плазмы связаны с отличиями в термостабильности белков, входящих в плазму крови, и отражают общие закономерности реакции гетерогенных белковых растворов на изменение температуры (Морозова и др., 2002; Цымбал, 2001). Очевидно, определенную роль в этих процессах играет степень структурированности водно-

белкового раствора (Цымбал, 2001).

После медленного замораживания до  $-20^{\circ}\text{C}$  и последующего отогрева спектры 1ПСП донорской крови усложняются за счет появления дополнительных длинноволновых и коротковолновых полос.

Замораживание–отогрев приводит к изменению спектральных характеристик плазмы донорской крови, прежде всего, для параметров, регистрируемых при температурах ниже  $45^{\circ}\text{C}$ . Это свидетельствует, по-видимому, об изменении межмолекулярных взаимодействий в водно-белковых растворах после замораживания–отогрева в области физиологических температур. Для плазмы донорской крови более выражены изменения положения и интенсивности 1ПСП для полосы 288 нм, а не для полосы 294–295 нм. Поскольку максимум 1ПСП около 294–295 нм, по данным литературы, относится к поглощению триптофановых остатков, можно предположить, что замораживание донорской плазмы при температурах ниже  $45^{\circ}\text{C}$  приводит, прежде всего, к нарушениям межмолекулярных взаимодействий в более полярных областях белков плазмы, так как тирозиновые остатки являются в общем более полярными, чем триптофановые (Демченко, 1981).

В литературе приводятся многочисленные и иногда противоречивые данные относительно температуры термоденатурации белков плазмы крови, её зависимости от связывания белков с различными лигандами, а также о влиянии на этот процесс состава среды и других факторов. Для САЧ термоденатурация наблюдалась в интервале температур  $50\text{--}75^{\circ}\text{C}$  (Павловский, Пальмин, 1963; Альбумин сыворотки крови ..., 1998; Сорокина, Залевская, 1990; Мажуль и др., 2002), а также в интервале от  $57$  до  $72^{\circ}\text{C}$  и выше (Павловский, Пальмин, 1963), и имеются указания, что термоденатурация зависит от лигандной нагрузки, которая повышает устойчивость макромолекулы белка (Альбумин сыворотки крови ..., 1998; Сорокина, Залевская, 1990). Термоденатурация иммуноглобулинов человека различных классов происходит в интервале температур от  $48$  до  $56^{\circ}\text{C}$  (Христофоров и др., 1990). Кроме того, многие авторы указывают на наличие неденатурационных конформационных переходов иммуноглобулинов в районе  $30^{\circ}\text{C}$  (Гаврилова, 1982). Термоденатурация фибриногена (из мяса крупного рогатого скота) происходит при температурах около  $52\text{--}55^{\circ}\text{C}$  (Павловский, Пальмин, 1963; Берест и др., 1998), а для глобулинов животных тепловое плавление имеет свой температурный интервал для различных фракций и происходит около  $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$  и  $68\text{--}70^{\circ}\text{C}$  (Павловский, Пальмин, 1963). Поэтому вопрос о том, какие именно белки ответственны за индивидуальные особенности спектральных характеристик плазмы, остается открытым. Неясно также, денатурируют ли в вышеуказанных температурных зонах отдельные белки или полифункциональные белковые комплексы.

Дополнительную информацию о состоянии белков плазмы крови можно получить, проанализировав их спектры флуоресценции (Бурштейн, 1977; Решетняк, Бурштейн, 1997; Lakowicz, 1999), которые при возбуждении светом с длиной волны 280 нм регистрируются в области 300–400 нм (рис. 3а). Более детальную информацию из формы спектров флуоресценции белков плазмы крови позволяет извлечь анализ их первых (1ПСФ) и вторых (2ПСФ) производных (Бурштейн, 1977; Драган, Храпунов, 1989). При этом, если основной информацией, извлекаемой из 1ПСФ, является уточненное положение максимума спектра, определение которого затруднено из-за большой ширины исходного спектра, то анализ 2ПСФ позволяет получить больше информации о состоянии окружения тирозиновых и триптофановых остатков белков.

2ПСФ белков плазмы крови обычно представлены двумя основными отрицательными полосами, расположенными в областях 300–350 и 350–380 нм (рис. 3б).

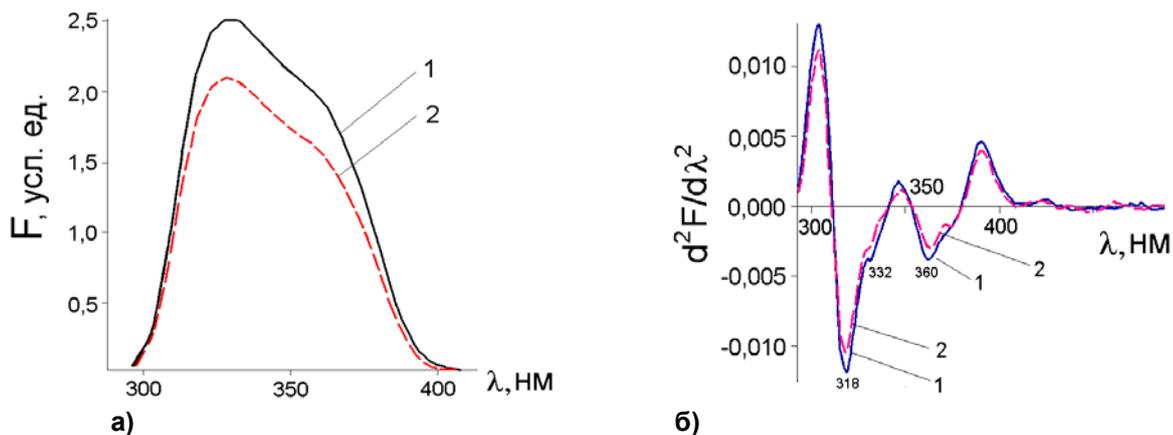


Рис. 3. Влияние замораживания–отогрева на спектры флуоресценции (а) и 2ПСФ (б) плазмы крови донора В. ( $\lambda_{\text{возб}}=296$  нм): 1 – контроль; 2 – после замораживания–отогрева

Хотя структурированность и положение полос 2ПСФ плазмы определяются индивидуальным белковым составом плазмы донора и могут колебаться в достаточно широких пределах, наиболее характерными для них можно считать пики с отрицательными минимумами при 315–320, 331–334 и 356–360 нм ( $\lambda_{\text{возб}}=280$  нм). В ряде случаев разрешаются полосы или плечи при 322–325 и 365–367 нм. При возбуждении светом с длиной волны 296 нм в спектрах лучше разрешаются длинноволновые компоненты, что свидетельствует о существенном вкладе триптофановой флуоресценции в эту область спектра. Сопоставление формы 2ПСФ с аналогичными параметрами САЧ позволяет предположить, что при 335–338 и 352–360 нм значительный вклад в спектры флуоресценции белков плазмы донора вносит триптофановая флуоресценция этого белка (Альбумин сыворотки крови ..., 1998; Лакович, 1986), который преобладает среди белков плазмы по количественному составу.

Изменения параметров спектров флуоресценции плазмы донора в результате криовоздействия также обнаруживают зависимость от исходного белкового состава плазмы. В зависимости от количественного соотношения белков, после замораживания–отогрева может наблюдаться как снижение, так и возрастание общей флуоресценции плазмы ( $\lambda_{\text{возб}}=280$  нм) при неизменности либо увеличении свечения триптофановых остатков ( $\lambda_{\text{возб}}=296$  нм).

Анализ формы и положения спектров показал, что снижение интенсивности флуоресценции спектров после замораживания происходит в основном за счет повышения доступности растворителю поверхностных тирозиновых и триптофановых остатков белков (см. рис. 3). Наблюдаемая же после замораживания–отогрева корреляция случаев возрастания параметра  $F_{\text{макс}}$  белков плазмы с ростом светорассеяния образцов позволяет предположить, что в данном случае эффект возрастания интенсивности флуоресценции обусловлен последующим этапом предденатурационных конформационных изменений белков – уменьшением доступности воде поверхностных аминокислотных остатков в результате возрастания степени агрегации, индуцированной криовоздействием. Спектральные характеристики плазмы, подвергнутой замораживанию–отогреву, обнаруживают временную зависимость, что может быть связано как с процессом агрегации белков, так и с релаксационными процессами, происходящими после отогрева в этой сложной белковой системе. Наблюдаемые колебания спектральных параметров плазмы в определенной мере отражают, на наш взгляд, устойчивость ее белков к процедуре замораживания–отогрева.

Таким образом, изменения спектральных характеристик донорской плазмы после замораживания–оттаивания, изменение температур термоденатурации и агрегации белков, проявляющиеся в изменении ее реологических свойств, свидетельствуют об изменении межмолекулярных взаимодействий в системе после замораживания–отогрева. Полученные результаты указывают на преимущественное изменение состояния поверхностных, полярных участков белков плазмы после замораживания–оттаивания.

Какие белки ответственны за вклад в криоповреждение плазмы и нарушение в ней межмолекулярных взаимодействий, предстоит выяснить в дальнейших исследованиях. Однако, уже сейчас достаточно очевидным является то, что такими белками могут быть глобулины и фибриноген.

### Выводы

1. Показано, что процесс замораживания–отогрева влияет на спектральные характеристики донорской плазмы при температурах прежде всего выше 45°C.
2. Установлено, что термоденатурация белков плазмы крови донора протекает поэтапно.
3. Обнаружены различия в спектральных характеристиках нативной и подвергнутой замораживанию–отогреву плазмы крови донора, а также в температурах термоденатурации и агрегации ее белков.

### Список литературы

- Актуальные проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н.С.Пушкаря, А.М.Белоуса. – К.: Наук. думка, 1981. – 608с.
- Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А.Грызунова и Г.Е.Добрецова. – Кн.2. – М.: ГЭОТАР, 1998. – 440с.
- Берест В.П., Гаташ С.В., Морозова Т.Ф. Термотропные изменения конформации фибриногена // Біофіз. вісник. – 1998. – Вип.1. – С. 71–74.
- Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белков. (Природа и применение) // Биофизика. – М.: ВИНТИ АН СССР, 1977. – Вып.7. – 189с.
- Гаврилова И.И. Изучение влияния низкой температуры и криопротекторов на структурно-конформационные переходы в некоторых белках и мембранах эритроцитов. Дисс. ... канд. биол. наук. – Х., 1982. – 146с.
- Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Ліпіна О.В., Савченко Ю.О. Заготівля, криоконсервування сироватки і

- плазми кордової крові та їх клінічне застосування: Метод. рекомендації. – Х., 2000. – 11с.
- Демченко А.П. Ультрафіолетовая спектрофотометрия и структура белков. – К.: Наук. думка, 1981. – 208с.
- Демченко А.П., Сандровский А.К., Коробков М.Е. Производная спектрофотометрия ароматических аминокислот и белков // Молек. биология. – 1978. – Вып.20. – С. 3–12.
- Драган А.И., Храпунов С.Н. Адсорбционные и люминесцентные исследования межмолекулярных взаимодействий тирозинового хромофора. 1. Анализ спектров поглощения и флуоресценции // Биофизика. – 1989. – Т.XXXIV, вып.1. – С. 7–13.
- Кухта В.К., Олецкий Е.И., Стожаров А.Н. Белки плазмы крови. – Минск: Беларусь, 1986. – 80с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352с.
- Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 496с.
- Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Щербин Д.Г. Белок: стратегия функционирования // Биофизика живых систем: от молекулы к организму. – Минск: Белсэкс, 2002. – С. 27–40.
- Морозова Т.Ф., Ромоданова Э.А., Дюбко Т.С., Тимченко Н.Н. Спектроскопическое исследование влияния замораживания на плазму кордовой крови // Біофіз. вісник. – 2002. – Вып.2(11). – С. 110–115.
- Павловский П.Е., Пальмин В.В. Биохимия мяса и мясопродуктов. – М.: Пищепромиздат, 1963. – 273с.
- Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Черепнев А.С. и др. Устройство для определения реологических свойств биологических жидкостей. А.с. 667865 СССР, МКИ 01 N 11/08. – Оpubл. 30.05.79, Бюл. №22.
- Решетняк Я.К., Бурштейн Э.А. Отнесение компонент спектра флуоресценции белка к остаткам триптофана по свойствам их микроокружения в трехмерной структуре // Биофизика. – 1997. – Т.42, вып.2. – С. 293–299.
- Сорокина Д.А., Залевская И.Н. Структурно-функциональные свойства белков. – К.: Вища школа, 1990. – 216с.
- Физиология человека / Под ред. Р.Шмидта и Г.Тевса. – Пер. с англ. под ред П.Г.Костюка. – Т.3. – М.: Мир, 1986. – 288с.
- Христофоров В.С., Баталова Т.Н., Кулевацкий Д.П. Структурные изменения в подклассах IgG человека при тепловой агрегации // Биофизика. – 1990. – Т.35, вып.4. – С. 682–683.
- Цымбал Л.В. Исследование влияния температуры на микроструктуру кордовой крови методом спиновых зондов // Пробл. криобиологии. – 2001. – №4. – С. 71–73.
- Akerblom O., Bremme K., Dackland A.L. et al. Freezing technique and quality of fresh-frozen plasma // Infusionsther Transfusionsmed. – 1992. – №6. – P. 283–287.
- Butler T., Bradley C.A., Owensby J.E. Plasma components protect erythrocytes against experimental haemolysis caused by mechanical trauma and by hypotonicity // Int. J. Exp. Pathol. – 1992. – Vol.73, №1. – P. 27–33.
- Cuschieri A., Wood R.A., Cumming J.R. et al. Treatment of acute pancreatitis with fresh frozen plasma // Br. J. Surg. – 1983. – Vol.70, №12. – P. 710–712.
- Hauben D.J., Yanai E., Mahler D. et al. The constituents of fresh frozen plasma stored with citrate phosphate dextrose and their clinical implications // Vox Sang. – 1982. – Vol.42, №2. – P. 81–86.
- Goodin R., Levitt Y. The cryoaggregation of bovine serum albumin // Cryobiology. – 1970. – Vol.6, №4. – P. 333–338.
- Gurevich K.Ia., Gendel L.L., Belotserkovskii M.V. et al. The storage and preparation of autologous plasma for transfusions to patients with arteriosclerosis obliterans of the vessels of the lower extremities // Vestn. Khir. – 1993. – Vol.150, № 3–4. – P. 81–84.
- Koerner K., Stampe D., Kubanek B. Deep frozen fresh plasma in blood component therapy: preparation–quality control–indications // Infusionsther Klin. Ernahr. – 1981. – Vol.8, №5. – P. 253–258.
- Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Edition. – New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers. – 1999. – 698p.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265–275.
- Pickering R.J., Good R.A., Kelly J.R., Gewurs H. Replacement therapy in hereditary angioedema. Successful treatment of two patients with fresh frozen plasma // Lancet. – 1969. – Vol.1, №7590. – P. 326–330.
- Rice C.L., Moss G.S. Blood and blood substitutes: current practice // Surg. – 1979. – Vol.3. – P. 93–114.
- Sabbagh A.H., Chung G.K., Shuttleworth P. et al. Fresh frozen plasma: a solution to heparin resistance during cardiopulmonary bypass // Ann. Thorac. Surg. – 1984. – Vol.37, №6. – P. 466–468.
- Schlesinges P., Frey-Wettstein M. Use of fresh frozen plasma in a Swiss hospital district // Schweiz. Med. Wochenschr. – 1983. – Vol.113, №44. – P. 1617–1622.
- Snyder A.J., Gottschall J.L., Menitove J.E. Why is fresh-frozen plasma transfused? // Transfusion. – 1986. – Vol.26, №1. – P. 107–112.

**ВПЛИВ ЗАМОРОЖУВАННЯ НА ПЛАЗМУ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ**  
Т.С.Дюбко, Т.Ф.Морозова, О.В.Ліпіна, Е.О.Ромоданова

Досліджено температурні залежності спектрів поглинання і в'язкості, а також спектри власної флуоресценції плазми крові дорослих донорів. Вивчено вплив заморожування на спектральні характеристики плазми донора. Отримані результати інтерпретуються з точки зору впливу низької температури на міжмолекулярні взаємодії в водно-білкових розчинах.

Ключові слова: *плазма донорської крові, температура, поглинання, флуоресценція, в'язкість, заморожування.*

**FREEZING EFFECT AT THE DONOR BLOOD PLASMA**  
T.S.Dyubko, T.F.Morozova, O.V.Lipina, E.A.Romodanova

The temperature dependences of adult donors blood plasma absorption and own fluorescence spectra are investigated. The influence of freezing on the donor blood plasma spectral characteristics is investigated. The results obtained are interpreted from the point of view of low temperature influence on intermolecular interactions in water–protein solutions.

Key words: *donor blood plasma, temperature, absorption, fluorescence, viscosity, freezing.*

---

Представлено Г.П.Горбенком  
Рекомендовано до друку В.А.Бондаренком