

№4. – С. 362-366. 3. Богуща К.І., Ноздренко Д.М., Мінченко П.Г. Модулююча дія сполук алюмінію на динамічні параметри скорочення та суперпреципітацію актоміозину м'язів // Тезиси докладів Научно-практической конференции "Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы применения и получения" (23-28 мая 2011 г., Новый Свет). – К.: Издатель В.С. Мартынюк, 2011. – С. 439-440. 4. Данилова В.М., Трегубов В.С. Сравнительное изучение структурно-функциональных свойств миозина скелетных и гладких мышц млекопитающих // Мол. генетика и биофизика. – 1988. – №13. – С. 88-95. 5. Мірошніченко М.С., Давидовська Т.Л., Нуриченко Н.Є., Богуща К.І. Дія сполук алюмінію на гладенькі м'язи та скоротливі білки скелетних м'язів // Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. "Біомінералогія-2008", Луцьк. – 2008. – С. 97-101. 6. Мірошніченко М.С., Мінченко П.Г., Шуба М.Ф. Вплив алюмінію на суперпреципітацію актоміозину // Доповіді АН України. – 1993. – №6. – С. 78-81. 7. Clapp T., Siebert P., Chen D., Jones Braun L. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability // J. Pharm. Sci. – 2011. – V.100, №2. – P. 388-401. 8. Gurjar M., Baronia A.K., Azim A., Sharma K.

Managing aluminum phosphide poisonings // J. Emerg. Trauma Shock. – 2011. – V.4, №3. – P.378-384. 9. Margossian S.S. Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain and its influence on ATP hydrolysis // J. Biol. Chem. – 1985. – V.260, №25. – P. 13747-13754. 10. Nayak P. Aluminium: impacts and disease // Environ. Res. – 2002. – V.89, №2. – P. 101-115. 11. Proudfoot A. Aluminium and zinc phosphide poisoning // Clin. Toxicol. – 2009. – V.47, №2. – P. 89-100. 12. Tomljenovic L., Shaw C.A. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? // Curr. Med. Chem. – 2011. – V.18, №17. – P. 2630-2637. 13. Slinchenko N.M. Effect of fluoroaluminate on the ATP-hydrolysing and Ca²⁺-transporting activity of the purified Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase of myometrium cell plasma membranes // Ukr. Biokhim. Zh. – 2003. – V.75, №5. – P. 95-98. 14. Sushma N.J., Rao K.J. Total ATPases activity in different tissues of albino mice exposed to aluminium acetate // J. Environ. Biol. – 2007. – V.28, Sup.2. – P. 483-494. 15. Yamamoto Y., Kato Y., Sato T. Determination of aluminum in various biological materials using instrumental neutron activation analysis // Leg. Med. (Tokyo). – 2009. – №11, Sup.1. – P. S440-442.

Надійшла до редколегії 12.10.11

УДК 543.635.24:616.15:577.112:544.17

І. Письменецька, канд. біол. наук

ВПЛИВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ТА ДЕПРОТЕЇНІЗАЦІЇ ПЛАЗМИ КРОВІ НА СПЕКТР ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ

Досліджено можливість відновлення спектру вільних олігосахаридів плазми крові при іммобілізації її на хроматографічному папері для транспортування у сухому стані. Після іммобілізації не вдалось отримати спектр вільних олігосахаридів адекватний спектру неіммобілізованої плазми. Запропоновано обробку трихлороцтовою кислотою, яка не змінюючи спектр гліканів, частково стерилізує та стабілізує сироватку крові, що дозволяє її транспортування.

A profile recovering of blood plasma free oligosaccharides after immobilisation on chromatographic paper with the purpose of shipping in dried state has been studied. An appropriate profile of free oligosaccharides after immobilisation in comparison with that from non-immobilised plasma has not been obtained. A treatment with trichloroacetic acid which stabilized and partly sterilized the plasma allowing its shipping has been proposed.

Вступ. Глобалізація науки та налагодження наукових зв'язків між лабораторіями колишнього Радянського Союзу та закордонними колегами вимагає шукати шляхи безпечного транспортування біологічного матеріалу для проведення спільних досліджень. Деякі проекти дозволяють застосовувати перевірений багатьма роками метод замороження у сухому льоді. Добре зарекомендувала себе ліофілізація. Але обидва методи далеко не завжди доступні. Перший пов'язаний з пошуком фірм, що можуть і яким дозволено перевозити біологічний матеріал. Другий потребує спеціального, досить дорогого, обладнання, яке не кожна лабораторія може собі дозволити. В клінічних та наукових лабораторіях багатьох країн для збору, архівації та транспортування крові, плазми та сироватки набули розповсюдження паперові носії. Це – карточки Гатрі та їх аналоги (IsoCode STIX, FTA Gene Guard Collection Matrices – FTA Elute та інші), які дозволяють зберігати біологічні рідини деякий час за умов температури зовнішнього середовища (25-30°C). Карточки із зразками біологічної рідини ретельно висушують, відокремлюють друг від друга пергаментним папером, захищають від вологи десикантом (вологопоглиначем) та пакують у спеціальні пакети. У такому вигляді їх можна безпечно, як для людей, так і для зразків, пересилати поштою [5] та зберігати роками при +4 чи -20°C [3]. Ці паперові матрикси зроблені з високоякісного фільтрувального паперу і дозволяють проводити аналізи з високою точністю [7]. Метою даного дослідження було перевірити можливості використання в якості паперового носія хроматографічний папір фірми Whatman при вивченні спектрів вільних олігосахаридів (ВО) плазми крові та знайти відповідний варіант стабілізації плазми для транспортування.

Методи та матеріали. Реактиви для нормальнофазової високоефективної рідинної хроматографії були від VWR International, інші – від Sigma-Aldrich.

Плазму пацієнтів з мієлопроліферативними захворюваннями крові була діагностована та люб'язно надана із дотриманням вимог етичного комітету лікарем клінічного закладу "Міська багатопрофільна клінічна

лікарня №4" міста Дніпропетровська Т.П.Ніколаєнко-Камішовою. Нативна плазма була отримана також від доктора Джоан Міллер з Інституту глікобіології Оксфордського університету.

Депротеїнізацію нативної плазми проводили шляхом осадження білків 10% трихлороцтовою кислотою (ТХО) з наступним центрифугуванням впродовж 10 хвилин при 3000 об/хв. Олігосахариди з хроматографічного паперу елюювали у скляних колонках для дисків (Oxford Glyco System) трьома порціями по 0,5 мл Milli-Q™ H₂O, при цьому першу порцію води залишали у колонці на 15-20 хвилин, перекиваючи потік рідини, для кращої екстракції гліканів.

Залишки білків вилучали за допомогою фільтру з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Millex-LH, 0.45 µm, Millipore Corp., США) згідно з [1]. Для вилучення глюкози з біологічної рідини застосовували адсорбційну хроматографію на пористому графіті з використанням колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1мл (25мг/мл) згідно з методикою [1]. Вільні олігосахариди маркували 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою – 2-AA (Sigma – Poole, Dorset, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі Neville D.C.A. et.al. [9] з деякими модифікаціями стосовно очищення маркованих гліканів, яке проводили шляхом твердофазної екстракції на колонках Spe-ed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [1]. 2-AA-марковані олігосахариди поділяли шляхом нормальнофазової високоефективної рідинної хроматографії (BEPX) на хроматографі фірми Waters (Велика Британія) з колонкою 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі Neville D.C.A. et.al. [9]. Для збору та обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium чи Waters Empower.

Результати та їх обговорення. Паперові носії дозволяють зберігати кров чи інші біологічні рідини для подальшого аналізу багатьох речовин, що містяться в них. Спочатку вони були запропоновані для проведення тесту Гатрі – виявлення фенілкетонурії шляхом аналізу

крові новонароджених на фенілаланін [4]. Згодом спектр речовин значно поширився і вже к початку нового сторіччя містив серодіагностичні маркери [10], маркери імунних захворювань і коагуляційні фактори [8], ліки [6] та маркери генетичного поліморфізму чи мутацій [2]. Теоретично будь яка речовина, що міститься у плазмі у достатній кількості, може бути екстрагована з паперової карточки та проаналізована.

Для проведення дослідження іммобілізували 12 зразків нативної плазми пацієнтів з мієлопроліферативними захворюваннями крові та цю ж плазму після осадження білків трихлороцтовою кислотою на хроматографічний папір фірми Whatman (Whatman® cellulose chromatography papers 3mm, cat. 3030681). Крім того, було взято плазму після осадження білків трихлороцтовою кислотою без іммобілізації для порівняння ефективності екстракції гліканів з паперу.

Дизайн експерименту:



Спектри суттєво відрізнялись в залежності від схеми їх отримання. Рис.1 демонструє типовий рівень відновлення ВЕРХ-спектрів вільних олігосахаридів плазми крові при її депротейнізації та обох шляхах іммобілізації.

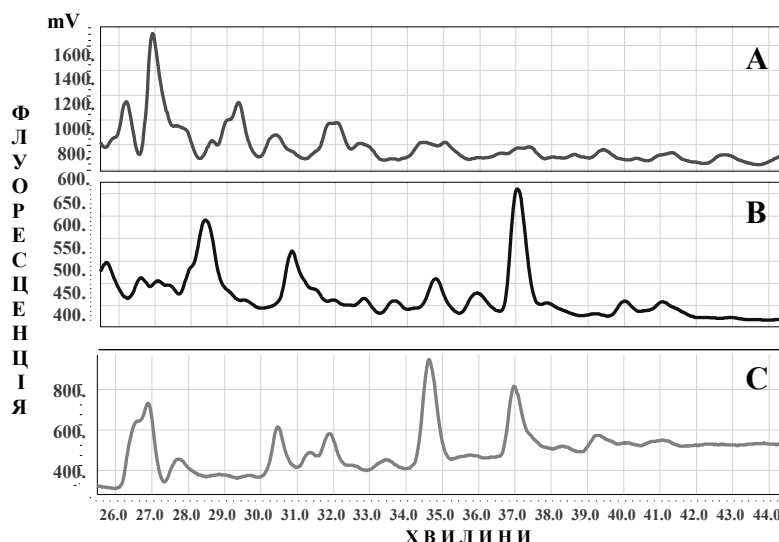


Рис.1. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові
А – іммобілізована плазма після депротейнізації ТХО;
В – іммобілізована нативна плазма;
С – не іммобілізована плазма після депротейнізації ТХО

При аналізі усіх 12 зразків ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів іммобілізованої після обробки ТХО плазми мали дуже схожий профіль з єдиним великим піком на 27 хвилині і з поступово "затухаючою" конфігурацією

(рис.1 А). Спектри, що були отримані з іммобілізованої нативної плазми (рис.1 В), в проаналізованих зразках відрізнялися між собою і мали різну кількість чітких піків. Але ні перші, ні другі спектри не відповідали спект-

рам, отриманим з плазми, що не була іммобілізована (рис. 1 С). Можливо це пов'язано з частковим гідролізом залишками ТХО целюлози паперу і екстракцією продуктів гідролізу чи перешкодженням ліпідів плазми адекватній екстракції гліканів. Порівняння спектрів показало, що з іммобілізованої плазми спектр вільних олігосахаридів не відновлювався.

З цих результатів було зовсім не ясно, який спектр відповідає нативній плазмі до іммобілізації та обробки ТХО. Щоб знайти відповідь на це запитання було взя-

то 5 зразків свіжої нативної плазми. Частину цієї плазми осаднили ТХО та залишили при кімнатній температурі на 24 години. Порівняли спектри гліканів в обох варіантах плазми.

Як демонструє рис.2 осадження білків ТХО не впливало на хроматографічний спектр вільних олігосахаридів і дозволяло повністю відновити кожний пік з несуттєвими для профілю втратами біологічного матеріалу. У всіх п'яти проаналізованих зразках спостерігалось таке ж повне відновлення спектру.

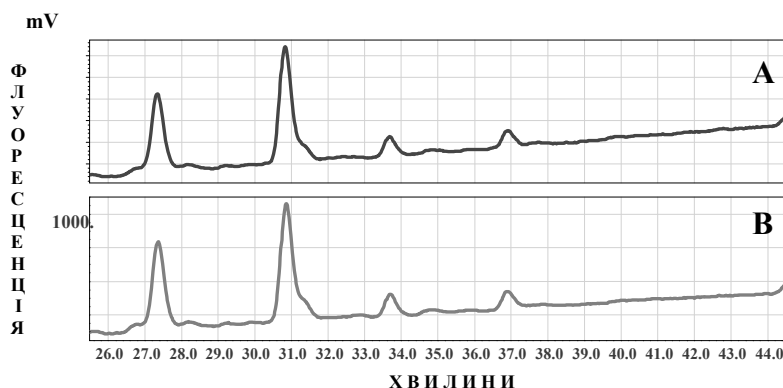


Рис.2. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові
А – не іммобілізована плазма після депротеїнізації ТХО;
В – не іммобілізована нативна плазма

Враховуючи, що ТХО стабілізує сироватку, яка утворилась після осадження білків, не дозволяючи перебіг ферментативних процесів чи розмноження мікроорганізмів, а також частково знезаражує її, зразки у такому стані достатньо безпечно транспортувати впродовж недовгого часу без охолодження, при температурі 22-25°C.

Методика екстракції олігосахаридів з паперового носія водою, що була застосована в даній роботі, не дозволила адекватно відновити спектр гліканів нативної плазми. Одним із шляхів оптимізації екстракції може бути попереднє очищення іммобілізованого матеріалу неполярними розчинниками. Подальший пошук обробки плазми для іммобілізації на паперовому носії та інших методів екстракції з можливістю відновити спектр гліканів відкрив би більше можливостей для обміну біологічним матеріалом між різними лабораторіями.

Висновки. Отримані експериментальні дані показали можливість відновити хроматографічні спектри вільних олігосахаридів після обробки плазми ТХО. Оскільки ТХО забезпечує часткову стерилізацію та стабілізацію плазми, це дозволяє транспортувати її впродовж деякого часу при температурі 22-25°C.

Проста пряма водна екстракція олігосахаридів з іммобілізованої плазми не дала позитивних результатів і не дозволила адекватно відновити спектри, але показала, що це можливо за умов доопрацювання шляхів екстракції чи обробки плазми до нанесення на папір.

Подяки. Експериментальну роботу було виконано при фінансовій підтримці міжнародного гранту International Union Against Cancer ICREET (ICR/09/044) та Інституту епікібіології Оксфордського університету (м.Оксфорд, Велика Британія) у лабораторії доктора Террі Д. Баммерса (Terry D. Butters).

1. Alonzi D.S., Neville D.C., Lachman R.H. et al. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic-reticulum alpha-glucosidase inhibition // *Biochem J.* – 2008. – 409, №2. – P.571-580.
2. Caggana M., Conroy J. M., Pass K. A. Rapid, efficient, method for multiplex amplification from filter paper // *Hum. Mutat.* – 1998. – Vol.11. – P. 404-409.
3. Chace, D. H., Adam, B. W., Smith S. J. et al. Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening 5 assays // *Clin. Chem.* – 1999. – Vol.45. – P.1269-1277.
4. Guthrie R., Susi A. A simple method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants // *Pediatrics* – 1963. – V.32. – P.338-343.
5. Knudsen R. C., Slazyk W. E., Richmond J. Y., Hannon W. H. Guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention for the Shipment of Dried-Blood Spot Specimens // *Safety and Health Monograph*, Office of Health and Safety, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. 1993.
6. Mei J. V., Hannon W. H., Dobbs T. L. et al. Radioimmunoassay for monitoring zidovudine (ZDV) in dried blood spots // *Clin. Chem.* – 1998. – Vol.44. – P.281-286.
7. Mei J.V., Alexander J.R., Adam B.W., Hannon W.H. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens // *J. Nutr.* – 2001. – 131, №5. – P.1631S-1636S.
8. Nelson K. B., Dambrosia J. M., Grether J. K., Phillips T. M. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy // *Ann. Neurol.* – 1998. – Vol.7, №44. – P.665-675.
9. Neville D.C., Coquard V., Priestman D.A. et al. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling // *Anal Biochem* – 2004. – Vol.331. – P. 275-282.
10. Parker, S. P. & Cubitt, D. W. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies // *J. Clin. Pathol.* – 1999. – Vol.52. – P.633-639.

Надійшла до редколегії 30.11.11