Probl Cryobiol Cryomed 2019; 29(2):187
https://doi.org/10.15407/cryo29.02.187

Активність тканинного активатора плазміногену в заморожених зразках еуглобулінової фракції плазми крові людини

К.В. Мирошников[1], М.О. Шкрабак[2], Т.А. Яценко[2]
[1]Національний авіаційний університет, м. Київ, Україна
[2]Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, Україна

Activity of Tissue Plasminogen Activator in Frozen Samples of Human Blood Plasma Euglobulin Fraction

K.V. Myroshnykov[1], M.O. Shkrabak[2] , T.A. Yatsenko[2]
[1]National Aviation University, Kyiv, Ukraine
[2]Palladin Institute of Biochemistry, NASU, Kyiv, Ukraine

Тканинний активатор плазміногену (tPA) – один із показників, який характеризує стан фібринолітичної системи, що руйнує фібрин кров'яного згустку. Показано, що рівень tPA є маркером серцево-судинних захворювань (стеноз коронарних судин, інфаркт міокарда, інсульт). Однак для аналізу активності tPA придатні тільки зразки свіжоотриманої плазми крові, з якої виділяють еуглобулінову фракцію. Зберігання замороженої плазми крові призводить до повної втрати активності активатором, що унеможливлює збір і зберігання зразків для аналізу.

Мета роботи – дослідження активності tPA в зразках еуглобулінової фракції плазми за умов їх зберігання у замороженому стані для подальшого аналізу.

Активність tPA визначали в еуглобуліновій фракції плазми крові донорів, оскільки вона не містить фізіологічних інгібіторів tPA. Для одержання еуглобулінової фракції до 100 мкл цитратної плазми крові додавали 900 мкл дистильованої води та 100 мкл 0,25% оцтової кислоти, інкубували годину при (4°С), потім центрифугували при 2000g. Отриманий осад розчиняли в трьох варіантах буферних розчинів: 0,05 М трис буфер pH 7,4 з 0,15 М NaCl; 0,1 М натрій-фосфатний буфер pH 6,0; 0,1 М натрій-ацетатний буфер pH 5,1. Заморожені зразки еуглобулінової фракції зберігали при –20°С. Активність тканинного активатора визначали за методом В.М. Рибачук та ін. (Патент №113014 МПК G01N33/68). Стандартом був рекомбінантний tPA («Актилізе», Boeringher Ing.). Активныість tPA вимірювали перед заморожуванням та після 3-х тижнів зберігання зразків.

Встановлено, що активність tPA в еуглобуліновій фракції, розчиненій у 0,05 М трис-буферному розчині з 0,15 М NaCl pH 7,4 та 0,1 М натрій-ацетатному буферному розчині pH 5,1, після зберігання при –20°С знижується на (71 ± 16) та (83 ± 7,5)% відповідно. Активність tPA в еуглобуліновій фракції, розчиненій в 0,1 М натрій-фосфатному буферному розчині pH 6,0, зберігається на рівні (100 ± 5)% порівняно з його початковою активністю активатора в свіжоотриманій еуглобуліновій фракції.

Таким чином еуглобулінова фракція протеїнів плазми крові, яка розчинена в 0,1 М фосфатному буфері pH 6,0, зберігає активність tPA протягом 3-х тижнів при –20°С, тому така модифікація методу одержання і зберігання еуглобулінової фракції може бути рекомендована для аналізу активності tPA.

The tissue plasminogen activator (tPA) is one of the important indices of the state of fibrinolytic system, which dissolves the blood clot. It has been shown that the level of tPA may be a marker for a range of cardiovascular diseases, like coronary stenosis, myocardial infarction, stroke etc. However, for the analysis of tPA activity only the euglobulin fraction from freshly-received blood plasma is suitable. Storage of frozen blood plasma leads to a complete loss of activity the activator, which makes impossible the samples collection and storage for further analysis.

The purpose of this work was to investigate the preservation of tPA activity in samples of the euglobulin plasma fraction during storage in a frozen state with the possibility of further use for analysis.

To determine the activity of tPA, euglobulin fraction of donor's blood plasma was used because it does not contain its physiological inhibitors. To obtain euglobulin fraction 100 μl of 0.25% acetic acid were added to 100 μl of citrate plasma, 900 μl of distilled water and incubated for 1 hour at 4°C, then centrifuged at 2000g. The precipitate was dissolved in three variants of buffer solutions: 0.05 M tris buffer pH 7.4 with 0.15 M NaCl, 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.0, and 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0. Samples of the euglobulin fraction were stored at 20°C. To determine the activity of tPA, the method of V.N. Rybachuk *et al.* was used (UP №110101 MPK G01N33/68). Recombinant tPA (Actilyze, Boeringher Ing.) was applied as a standard. The activity of tPA was measured twice *i. e.* before freezing of samples and after 3 weeks of storage.

According to the study, the euglobulin fraction dissolved in 0.05 M tris buffer solution from 0.15 M NaCl pH 7.4 and 0.1 M sodium acetate buffer solution pH 5,1 during storage at –20°C loses tPA activity: after storage the level of tPA activity in samples is reduced by (71 ± 16)% and (83 ± 7.5)%, respectively. The activity of the tPA in the euglobulin fraction, dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer solution at pH 6.0 and stored at –20°C, is maintained at (100 ± 5)% relative to the initial activity in the freshly recovered euglobulin plasma fraction.

Euglobulin fraction of blood plasma proteins, dissolved in 0.1 M phosphate buffer pH 6.0, retains tPA activity for 3 weeks, when stored at –20°C. The modification of the method of its obtaining and storage is recommended for the functionally active tissue plasminogen activator analysis.