

Н.Н. Кириченко<sup>1</sup>, В.В. Закревский<sup>2</sup>, И.А. Коновалова<sup>1</sup>,  
А.В. Сметанин<sup>1</sup>, Е.С. Мартынова<sup>1</sup>, Л.П. Лазаренко<sup>1</sup>

## Оценка возможности консервации плазмы и сыворотки крови путем заморозки для последующего исследования содержания витаминов

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Северо-Западный государственный университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Экспериментально доказана возможность заморозки образцов плазмы и сыворотки крови человека при температуре минус 18°C для последующего исследования на содержание витаминов. Образцы плазмы и сыворотки крови 40 военнослужащих исследовались в день забора крови (без заморозки), а затем сравнивались с результатами анализа тех же образцов, подвергнутых заморозке при температуре минус 18°C через 7, 60 и 120 сут хранения. Использовалась методика простой заморозки образцов плазмы и сыворотки в морозильной камере при температуре минус 18 °С в срок не более 120 мин после забора крови. Разморозка после хранения производилась пассивно при комнатной температуре. Исследовалось содержание витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, С, А, D и Е с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, иммунохемотрисценции, флуориметрических и спектрофотометрических методик. По результатам статистического сопоставления содержания исследованных витаминов в свежих и замороженных образцах плазмы и сыворотки установлено отсутствие значимых различий между образцами, отклонение от исходных значений в среднем не превышало 1–2%. Предложенная методика консервации образцов плазмы и сыворотки крови человека путем заморозки при температуре минус 18°C может применяться для анализа содержания витаминов в замороженных образцах, без применения поправочных коэффициентов. Первоначально методика испытывалась для организации исследования витаминной обеспеченности военнослужащих, проходящих военную службу в Арктической зоне Российской Федерации. Практическая значимость исследования заключается в предложении удобного и доступного способа консервации образцов плазмы и сыворотки крови для транспортировки в замороженном виде из удаленных местностей, где лабораторные возможности исследования содержания витаминов в крови в лечебных и профилактических целях ограничены. Замороженные образцы удобны для хранения до 12 сут, когда их немедленное лабораторное исследование невозможно.

**Ключевые слова:** витамины, гиповитаминоз, авитаминоз, заморозка, плазма, сыворотка, гигиена питания, лабораторная диагностика.

**Введение.** Проблема недостаточной обеспеченности организма витаминами, по данным большинства отечественных и зарубежных авторов, занимающих вопросы витаминологии, не утратила своей актуальности в последние годы, несмотря на расширение возможностей пищевой и фармацевтической промышленности и повышение уровня санитарной грамотности населения [5]. Особую значимость витаминная обеспеченность имеет для лиц экстремальных профессий, к которым можно отнести и военнослужащих, а также для лиц, работающих и проживающих в регионах с неблагоприятными климатическими условиями, к которым, в частности, относятся территории Арктической зоны Российской Федерации [3, 4].

В последние десятилетия благодаря достижениям науки и техники, введению в практику и повышению доступности современных методик лабораторной диагностики расширились диагностические возможности для определения содержания витаминов в крови человека, являющихся основанием для применения лечебных и профилактических мероприятий, контроля эффективности витаминотерапии. К таким

современным и уже вполне доступным на практике методикам следует отнести прежде всего высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и иммуноферментный анализ [2].

Вместе с тем указанные диагностические возможности доступны в основном в крупных городах в медицинских организациях с расширенными лабораторными возможностями. При этом потребность в анализе содержания витаминов в крови пациентов имеется как в удаленных местностях, так и в тех случаях, когда либо невозможно приблизить лабораторную базу к месту отбора образцов, либо немедленная отправка образцов крови в лабораторию по каким-либо причинам невозможна (например, скрининговые обследования с отбором большого количества образцов и т. п.) [1].

Всё сказанное в полной мере относится к войсковому звену медицинской службы, которое обладает ограниченными лабораторными возможностями, как правило, достаточно удалено территориально от крупных лабораторных центров, имеет сложную логистику лабораторных проб, но при этом лечебную и

профилактическую медицинскую помощь для крупных контингентов военнослужащих [3].

В аннотациях большинства методик исследования крови человека на содержание витаминов обычно указываются весьма короткие сроки от забора пробы до начала анализа, что объясняется нестойкостью витаминов и их быстрым разрушением (особенно актуально для быстро окисляемых витаминов – А, D и Е). То есть анализ содержания витамина в образце плазмы или сыворотки, хранимой при комнатной температуре, рекомендовано проводить в ближайшие 4 ч, а по некоторым данным – 2 ч с момента отбора [7].

Эти временные ограничения анализа делают его практически невозможным без перемещения обследуемого лица в непосредственную близость к лаборатории, что само по себе ограничивает применение данного вида исследований, а для массовых обследований вовсе делает его невозможным.

Столкнувшись с задачей проведения исследований содержания витаминов в крови у лиц, проходящих военную службу в удаленных местностях Арктической зоны Российской Федерации, авторы встали перед проблемой выбора способа консервации и длительной транспортировки образцов крови обследуемых, для последующего анализа в лабораторных условиях.

Изучение опыта отечественных и зарубежных коллег дало неоднозначные результаты. Непосредственные исследования и эксперименты по данной проблеме в литературе последних лет детально не описаны. Некоторые методики консервации непригодны для длительной транспортировки. Мнение о влиянии заморозки и последующей разморозки на концентрацию витаминов в образце неоднозначно и носит скорее характер предположений. Наиболее простым, универсальным и доступным способом консервации образцов плазмы и сыворотки крови является заморозка.

Из общих знаний о биохимии витаминов не следует вывод о том, что заморозка самого витамина должна непременно вести к его разрушению. Напротив, охлаждение и заморозка используются для хранения многих витаминных субстанций. Сами образцы плазмы и сыворотки в клинической и лабораторной практике регулярно подвергаются заморозке для самых различных задач. В то же время компоненты крови (плазма, сыворотка) обладают рядом специфических свойств, взаимодействие которых с витаминами в процессе заморозки-разморозки не описано.

Для решения вопроса исследователями поставлен эксперимент с заморозкой образцов плазмы и сыворотки человека на различный срок, с последующим анализом содержания в них витаминов и сравнением результатов.

**Цель исследования.** Установить влияние заморозки и сроков хранения образцов плазмы и сыворотки человека на концентрацию в них витаминов.

**Материалы и методы.** Материал – сыворотка крови и плазма крови, полученные у 40 18–25-лет-

них мужчин, не получавших витаминные препараты в течение 14 дней до забора крови. Кровь пациентов забиралась из локтевой вены утром натощак в сухие вакуумные пробирки для сыворотки и плазмы крови с этилендиаминтетрауксусной кислотой. После центрифугирования со скоростью 3000 об/мин плазма и сыворотка отбиралась в пластиковые микропробирки емкостью 0,5–2 мл, которые сразу перемещались в морозильную камеру и замораживались при температуре минус 18°C. В целях практической пригодности методики был выбран способ заморозки образцов до температуры минус 18°C в обычной морозильной камере медицинского морозильника и последующего хранения при той же температуре. Время от момента забора крови до заморозки не превышало 120 мин.

От каждого обследуемого исследовались четыре серии плазмы и сыворотки: свежая плазма/сыворотка (без заморозки), плазма/сыворотка после заморозки и хранения при температуре минус 18°C длительно – 7, 60 и 120 сут. Замороженные образцы размораживались пассивно при комнатной температуре непосредственно перед анализом.

В образцах исследовалось содержание перечня витаминов, определенного в соответствии с поставленными для последующих этапов исследования задачами:  $B_9$ ,  $B_1$  (оценивался косвенно по уровню пировиноградной кислоты (ПВК),  $B_2$ ,  $B_{12}$ , С, А, D и Е.

Для лабораторного исследования образцов использовались следующие методики и оборудование:

- иммунохемотюминисценция, анализатор «Beckmann-CoulterDxl 800» (Соединенные Штаты Америки – США);

- ВЭЖХ, аппарат «ВЭЖХ Agilent-1200» (США);
- классическое титрование по Тильмансу с использованием колонки для титрования;
- флуориметрия, флуориметр «Флуорат-02-АБЛФ-Т» (Российская Федерация);
- спектрофотометрия, спектрофотометр «СФ-2000» (Российская Федерация).

Результаты исследования сравнивались с использованием параметрического t-критерия Стьюдента для зависимых выборок для оценки значимости различий средних значений, а также с использованием метода попарных сравнений. Исходные показатели в свежем образце плазмы/сыворотки сравнивались с тем же показателями того же образца после заморозки на 7, 60 и 120 сут соответственно, уровень статистической значимости различий установлен для  $p < 0,05$  [6].

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что максимальные колебания концентраций витаминов в отдельных образцах, взятых у одного и того же обследуемого до и после заморозки на 7, 60 и 120 сут, не превышали не превышали 10% от исходного значения. В среднем по выборке эти колебания еще меньше и находятся в пределах 0,5 – 3% от исходного значения показателя (таблица).

Средние значения концентраций витаминов в исходном и замороженных образцах

Витамин	Среда	В день забора	После заморозки при температуре минус 18°C		
			7 сут	60 сут	120 сут
В9, нг/мл	Сыворотка	4,65±0,33	4,64±0,32	4,67±0,33	4,67±0,33
В12, нг/мл	Сыворотка	236,8±15,6	235,5±15,6	236,0±15,5	235,3±15,7
А, мг/л	Плазма	0,256±0,014	0,255±0,014	0,256±0,014	0,255±0,014
Е, мг/л	Плазма	2,698±0,136	2,683±0,136	2,677±0,137	2,707±0,139
Д3, нг/мл	Плазма	7,403±0,721	7,382±0,725	7,339±0,724	7,322±0,723
Д2, нг/мл	Плазма	76,85±6,38	76,84±6,37	76,66±6,37	76,61±6,39
В1, косвенно по ПВК, мкг/мл	Плазма	6,188±0,275	6,222±0,276	6,183±0,279	6,185±0,271
В2, мкг/л	Плазма	3,405±0,256	3,396±0,257	3,402±0,259	3,417±0,256
С, мг/л	Плазма	7,330±0,143	7,300±0,141	7,288±0,148	7,318±0,142

Для выявления степени значимости различий среднего значения выборки по продолжительности заморозки сравнивались попарно с исходным значением. При сравнении результатов средних значений исследуемых показателей с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок значимых различий концентраций витаминов в исходном и замороженном образце не выявлено ( $p > 0,05$ ). Различий исследуемых показателей в динамике также не выявлено.

Все это свидетельствует об отсутствии значимого влияния заморозки плазмы/сыворотки крови на содержание в нем определяемых витаминов. Следовательно, образцы плазмы/сыворотки крови могут быть законсервированы путем обычной заморозки при температуре минус 18 °С для дальнейшей перевозки и хранения в замороженном состоянии в целях последующего определения содержания витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>9</sub>, В<sub>12</sub>, С, А, Д и Е. При этом значения измерений после заморозки не будут достоверно отличаться от значений, которые могли быть получены при исследовании исходного (свежего) образца.

**Заключение.** Возможность заморозки сыворотки и плазмы крови для последующего определения содержания в них витаминов имеет большое практическое значение. Это дает возможность исследования витаминов в крови обследуемых лиц во временной период, отдаленный от момента забора крови, при условии надлежащей транспортировки и хранения образцов плазмы или сыворотки в замороженном состоянии при температуре минус 18 °С. Помимо транспортировки образцов из удаленных районов, такой подход позволяет организовать их хранение сроком не более 120 сут для последующего исследования, что дает возможность планировать равномерное рас-

пределение загрузки лабораторных мощностей при массовых обследованиях.

Для транспортировки образцов в замороженном состоянии рекомендуется использовать специальные термоконтейнеры либо портативные морозильные камеры с заранее замороженными хладоэлементами и встроенным термодатчиком для обеспечения контроля надлежащей температуры в контейнере.

Существенно, что вывод о возможности заморозки сред без существенной потери концентрации сделан на основе одновременного исследования девяти витаминных субстанций, а не путем экстраполяции результатов анализа одного-двух компонентов, что зачастую встречается в исследованиях.

Опыт использования представленной в настоящем исследовании методики заморозки и хранения образцов плазмы и сыворотки крови для последующего исследования в них содержания витаминов с целью определения витаминной обеспеченности военнослужащих, проходящих службу в Арктической зоне Российской Федерации может применяться для отбора проб в удаленных местностях в условиях обычного медицинского пункта.

#### Литература

1. Камышников, В.С. Норма в лабораторной медицине: справочник. – 2-е изд. / В.С. Камышников. – М.: МЕДпресс-информ, 2014. – 336 с.
2. Назаренко, Л.И. Макро- и микроэлементы: учебное пособие / Л.И. Назаренко, О.Б. Щукина. – СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2013. – 161 с.
3. Сметанин, А.Л. Оценка витаминно-минерального статуса военнослужащих, проходящих службу на Крайнем Севере и в Санкт-Петербурге / Сметанин А.Л. [и др.] // Проф. и клин. мед. – 2015. – № 4 (57). – С. 5–11.
4. Солонин, Ю.Г. Медико-физиологические аспекты жизнедеятельности в Арктике / Ю.Г. Солонин, Е.Р. Бойко // Арктика: экология и экономика. – 2015. – № 1 (17). – С. 87–94.

5. Спиричев, В.Б. Научное обоснование применения витаминов в профилактических и лечебных целях. Сообщение 1. Недостаток витаминов в рационе современного человека: причины, последствия и пути коррекции / В.Б. Спиричев // Вопросы питания. – 2010. – Т. 79, № 5. – С. 4–14.
6. Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев, М.В. Резванцев. – СПб.: ВМА, 2011. – 318 с.
7. Wu, A.H. Tietz Clinical guide to laboratory test. 4th ed. / A.H. Wu. – USA: Saunders, 2006. – 1856 p.

---

N.N. Kirichenko, V.V. Zakrevskiy, A.L. Smetanin, I.A. Konovalova, Ye.S. Martynova, L.P. Lazarenko

**Evaluation of the opportunity of conservation of plasma and blood serum by freezing for the following investigation of vitamins content**

***Abstract.** The possibility of freezing samples of human plasma and serum at minus 18°C for subsequent research on the content of vitamins has been experimentally proved. Plasma and serum samples of 40 military personnel were examined on the day of blood collection (without freezing) and then compared with the results of the analysis of the same samples that were frozen at minus 18°C after 7, 60 and 120 days of storage. We used the method of simple freezing of plasma and serum samples in the freezer at a temperature of minus 18°C for a period of not more than 120 min after blood collection. Defrosting after storage was carried out passively at room temperature. The content of folic acid, vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, C, A, D, E was studied using high-performance liquid chromatography, immunochemoluminescence, fluorimetric and spectrophotometric methods. According to the results of the statistical comparison of the content of the studied vitamins in fresh and frozen plasma and serum samples, the absence of significant differences between the samples was established; the deviation from the initial values did not exceed 1–2% on average. The proposed method of preserving samples of human plasma and serum by freezing at a temperature of minus 18°C can be used to analyze the content of vitamins in frozen samples, without the use of correction factors. Initially, the technique was tested to organize the study of the vitamin security of military personnel serving in the Arctic zone of the Russian Federation. The practical significance of the study is to offer a convenient and affordable method of preserving plasma and serum samples for transportation in frozen form from remote areas, where the laboratory possibilities of studying the content of vitamins in the blood for therapeutic and prophylactic purposes are limited. Frozen samples are convenient for storage up to 12 days when their immediate laboratory research is impossible.*

**Key words:** vitamins, dietary supplements, deficiency, freezing, plasma, serum, laboratory diagnostics.

Контактный телефон: +7-952-263-89-70; e-mail: vmeda-nio@mil.ru