

О.А. Нардід, О.А. Горобченко, О.Т. Ніколов, О.В. Ліпіна, Ю.О. Мошко

Дослідження впливу низьких температур на сироватку кордової крові методом діелектрометрії надзвичайно високих частот

Исследовано влияние скоростей замораживания и конечных температур хранения на комплексную диэлектрическую проницаемость сыворотки кордовой крови. На температурных зависимостях диэлектрической проницаемости обнаружены немономонные изменения при характерных температурах, сопровождающиеся изменением активационной энергии диэлектрической релаксации молекул воды. Резкое отклонение от монотонности температурной зависимости ϵ' в области 15°C хорошо коррелирует с изломом при той же температуре на аррениусовых зависимостях времени диэлектрической релаксации и вязкого течения. Медленное замораживание (1-2°C/мин) сыворотки кордовой крови приводит к уменьшению ϵ' по сравнению с контролем, что свидетельствует об увеличении количества связанной воды. Быстрое замораживание (300-400°C/мин) приводит к увеличению ϵ' сыворотки, что вызвано, по-видимому, криоагрегацией биомакромолекул.

ВСТУП

Кордова (плацентарна) кров людини та її компоненти активно використовуються у сучасних біотехнологічних програмах [3]. Сироватка кордової крові (СКК) людини містить більш ніж 60 специфічних плацентарних білків, що відіграють роль ферментів, проферментів, адаптогенів, рецепторів, факторів росту, імуномодуючих агентів, транспортних і зв'язувальних білків, а також пептиди, вітаміни та мікроелементи. Кордовій крові притаманна висока гормональна насиченість. Її здатність здійснювати загальностимулювальну дію давно привертає увагу клініцистів. Тому СКК є унікальною біологічно активною субстанцією і застосування її в клініці може істотно підвищити ефективність терапії багатьох захворювань, перебіг і результат яких визначає зниження функції різних систем організму, у тому числі й імунної. Все це потребує розробки оптимальних кріобіологічних технологій консервування СКК лю-

дини, що нададуть можливість максимально зберігати її біологічну активність і дозволить створити новий ефективний препарат для клінічного застосування. У зв'язку з цим становить інтерес дослідження зміни структурного стану компонентів СКК при дії на неї заморожування, впливу швидкості заморожування і кінцевих температур збереження на міжмолекулярні взаємодії і конформаційні властивості молекул сироватки. Частково таку інформацію можна отримати з аналізу поведінки комплексної діелектричної проникності сироватки, оскільки структурні порушення та конформаційні зміни компонентів СКК призводять до зміни співвідношення вільна – зв'язана вода в досліджуваній системі і супроводжуються зміною діелектричних показників.

Метою цієї роботи було дослідження впливу режимів заморожування на діелектричну проникність СКК методом діелектрометрії надвисоких частот (НВЧ), а також властивостей її в'язкості на початковому етапі охолодження.

МЕТОДИКА

У дослідженні використовували СКК, отриману у 9 жінок при пологах. Сироватку заморожували в полімерних ампулах об'ємом 1,5 мл. Зразки заморожували в двох режимах: повільне заморожування зі швидкістю 1–2°C/хв до –20°C і швидке заморожування – зі швидкістю 300–400°C/хв до температури рідкого азоту (–196°C). Відтавання проводили у водяному середовищі при 40–42°C. Як контроль використовували нативну СКК.

Вимір дійсної (ϵ') і уявної (ϵ'') частин комплексної діелектричної проникності проводили за допомогою НВЧ-діелектрометра резонаторного типу на частоті 9,2 ГГц [8] в діапазоні температур від +40 до +4 °C. Температуру зразка вимірювали за допомогою термопари з точністю $\pm 0,1$ °C. Величини ϵ' і ϵ'' визначали, використовуючи градуйовані криві, побудовані для зразків з відомими значеннями [1, 11]. Відносна помилка виміру діелектричних показників становила 0,1% для значень ϵ' , і 0,2 % для ϵ'' . Величини статичної діелектричної проникності (ϵ_s) і часу діелектричної релаксації (τ) молекул води в досліджуваних системах обчислювали, використовуючи формули, отримані з рівнянь Дебая [4].

Динамічну в'язкість вимірювали за допомогою капілярно-рамкового віскозиметра при малій нарузі зсуву (1,9 дин/см²). У віскозиметрі використовували капіляр з радіусом вузької частини 0,38 мм і довжиною 98,0 мм. Радіус широкої частини капіляру становив 0,78 мм. Градування приладу проводили 40%-м розчином сахарози. Величини динамічної в'язкості отримували згідно з законом Пуазейля.

Енергії активації діелектричної релаксації молекул води й енергії активації в'язкої течії СКК розраховували із ареніусових залежностей $\ln \tau$ і $\ln \eta$ від зворотної температури.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені нами дослідження показали, що значення ϵ' після повільного заморожування сироватки всіх обстежених жінок при кімнатних температурах було нижчим від контролю. Це свідчить про зменшення кількості вільної води в системі, що може бути результатом підвищення ступеня гідратації молекул СКК. Під час повільного заморожування відбуваються ушкодження біоструктур, викликані, насамперед, дією підвищених концентрацій солей і метаболітів, що утворюються при поступовому переході води з рідкої у тверду фазу [9]. Такі ушкодження збільшуються за умов збереження сироватки при температурі –20°C, що близька до евтектичної для наявних іонів. При цій температурі вимерзає тільки вільна вода, зв'язана ж і жорстко зв'язана вода (температури замерзання від –35 до –50°C і від –120 до –130°C відповідно [2, 5]) залишаються у рідкому стані. Такі умови можуть призводити до порушення структури ліпопротеїдів і конформації біомакромолекул [9], що виявляються в розпушенні поверхневих поліпептидних ланцюгів [7]. Внаслідок цього відбувається звільнення додаткових місць зв'язування для молекул води, що призводить до підвищення ступеня гідратації молекул СКК.

Вплив швидкого заморожування СКК на значення ϵ' має протилежну, стосовно повільного заморожування, зразків спрямованість у порівнянні з контролем. У двох жінок значення ϵ' швидкого заморожування сироватки майже не відрізняється від такого нативних зразків. Імовірно, порушення, викликані заморожуванням сироватки незначні. В інших випадках значення ϵ' швидкого заморожування сироватки вірогідно перевищують контрольні, що говорить про збільшення в системі кількості вільної води. Вивчення спектрів поглинання сироваткових альбумінів і імуноглобулінів в зоні ультрафіолету після заморожування до

-196°C [6] свідчить, що їхня структура практично не відрізняється від спектрів нативних білків, але після швидкого заморожування збільшується рівень світлорозсіювання розчинами макромолекул. Розрахунок рівня поглинання при 310 нм дозволив автору припустити асоціацію й утворення стійких агрегатів білків у розчині після заморожування, що підтверджується також методом НВЧ-діелектрометрії [6]. Очевидно, ці процеси відбуваються й у випадку швидкого заморожування СКК, що й призводить до підвищення ϵ' . Незначні відмінності абсолютних значень ϵ' , які спостерігаються у різних жінок, зумовлені, ймовірно, індивідуальними особливостями біохімічного та гормонального вмісту СКК.

При дослідженні впливу охолодження на структурний стан молекул СКК в інтервалі температур від +40 до +4 °С, тобто на початковому етапі кріоконсервування, було встановлено, що температурна залежність діелектричної проникності ϵ' має складний характер (рис. 1). В усьому дослідженому інтервалі температур залежності характеризуються немонотонними змінами ϵ' при 26–32°C і 15–20°C як для нативних зразків, так і для тих, які було заморожено. При цих самих температурах спостерігаються схо-

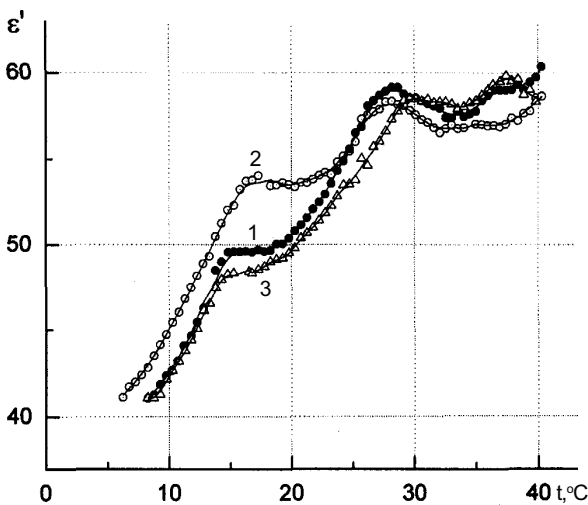


Рис. 1. Залежність значень ϵ' нативної і замороженої сироватки кордової крові від температури: 1 – контроль, 2 – швидке заморожування, 3 – повільне заморожування

динкоподібні зміни діелектричних втрат ϵ'' і немонотонні зміни статичної діелектричної проникності ϵ_s , що складає внесок обох показників (ϵ' і ϵ'') (рис. 2,а). Відомо, що величина $\Delta \epsilon_s$ розчину відносно розчинника пропорційна концентрації розчиненої речовини і його гідратації [5]. У нашому випадку, оскільки концентрація компонентів СКК постійна при зміні температури, можна припустити, що температурозалежні зміни ϵ_s визначаються лише кількістю зв'язаної макромолекулами води. У такому разі немонотонне збільшення ϵ_s при 15°C, 26–28°C, 38–40°C (контроль) свідчить про зменшення гідратації.

При вивченні температурної залежності динамічної в'язкості СКК при зниженні температури від +40°C до +4°C було виявлено, що охолодження призводить до підвищення в'язкості СКК більше ніж утричі. Зі зниженням температури в'язкість СКК збільшується немонотонно. Криву температурної залежності в'язкості СКК (див.

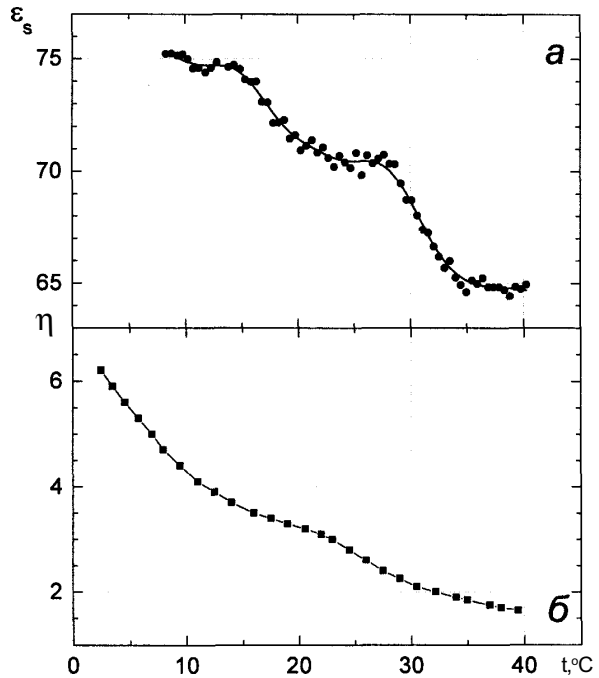


Рис. 2. Температурні залежності статичної діелектричної проникності ϵ_s (а) і в'язкості (б) сироватки кордової крові

рис. 2,б) умовно можна розділити на дві ділянки: перша – зі слабо вираженим підвищенням в'язкості з охолодженням (при зниженні температури від $+37^{\circ}\text{C}$ до $+20^{\circ}\text{C}$), де її приріст становить близько 20 % від загального збільшення в інтервалі від $+40^{\circ}\text{C}$ до $+4^{\circ}\text{C}$, і друга ділянка – з основним підвищенням в'язкості під час зниження температури від $+18^{\circ}\text{C}$ до $+4^{\circ}\text{C}$. Отримані результати вказують на важливість внеску міжмолекулярних взаємодій білків СКК у термотропні аномалії в'язкості, тому що для модельних розчинів, які не містили органічних компонентів сироватки, подібних аномалій виявлено не було.

Саме збільшення міжмолекулярних взаємодій під час зниження температури і буде призводити до зменшення гідратації компонентів СКК, про що свідчить температурна залежність ϵ_s . Як видно з ареніусових залежностей ці процеси відбуваються при однакових температурах.

Немонотонні зміни діелектричної проникності та в'язкості зі зменшенням температури від $+40^{\circ}\text{C}$ до $+4^{\circ}\text{C}$ виявляються у вигляді зламів, що добре збігаються на ареніусових залежностях часу діелектричної релаксації та в'язкості (рис. 3). Злами, які спостерігаються на згаданих залежностях, можливо, викликані термоіндукованими змінами конформації молекул сироватки. Про це свідчить і дослідження спектральних характеристик плазми кордової крові [10], які дозволили встановити, що в температурних інтервалах близько 15, 24 і 27°C різко зменшується частота обертання спінового зонда.

Таким чином, поряд зі зміною міжмолекулярних взаємодій проходять процеси, які можна інтерпретувати як конформаційні перетворення макромолекул. З отриманих експериментальних результатів важко визначити порядок цих порушень – зміна конформації призводить до міжмолекулярних взаємодій чи навпаки. Але ці перетворення відбуваються одночасно.

Злами, які спостерігаються на ареніу-

сових залежностях, як і належить, супроводжуються змінами енергії активації діелектричної релаксації молекул води й енергії активації в'язкої течії (див. табл).

Слід зазначити, що значення енергій активації в'язкої течії і діелектричної релаксації практично збігаються, що свідчить про подібний молекулярний механізм цих процесів, пов'язаний з розривом визначеної кількості водневих зв'язків між молекулами води. Можливо, що при цьому процеси дипольної орієнтації молекул води і в'язкої течії мають однакові або подібні активовані стани.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено особливості зміни значень ϵ' при 15 і 27°C для нативних і заморожених зразків СКК.
2. Виявлено зниження значень ϵ' СКК після повільного заморожування в порів-

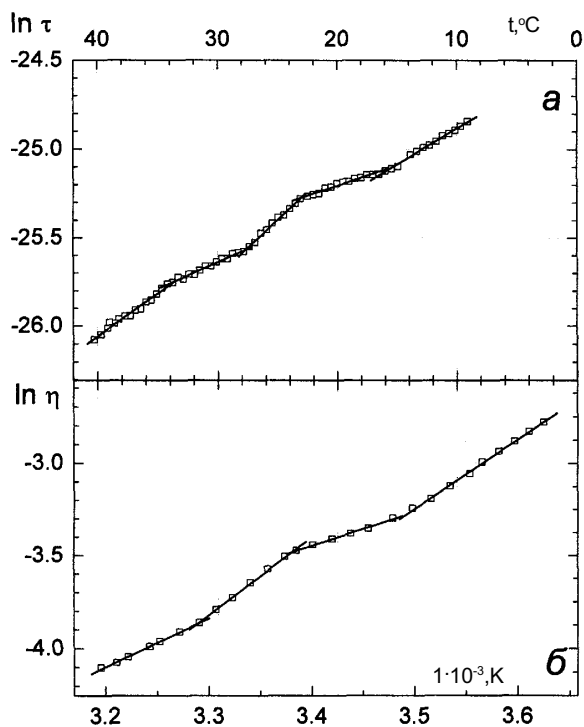


Рис. 3. Ареніусові залежності логарифму часу діелектричної релаксації диполів води (а) і логарифму в'язкості (б) сироватки кордової крові від зворотної температури

Енергії активації в'язкої течії		Енергії активації діелектричної релаксації молекул води					
Нативна сироватка кордової крові		Нативна сироватка кордової крові		Сироватка кордової крові після повільного заморожування		Сироватка кордової крові після швидкого заморожування	
t, °C	ΔE, кДж/моль	t, °C	ΔE, кДж/моль	t, °C	ΔE, кДж/моль	t, °C	ΔE, кДж/моль
2-15	31,1	8-15	29,1	8-15	29,1	8-17	29,9
15-24	15,7	15-24	16,1	15-24	10,5	17-24	12,0
24-32	35,9	24-27	45,4	24-27	44,2	24-27	38,5
32-40	21,5	27-34	21,8	27-34	22,1	27-34	12,6
		34-40	34,7	34-40	43,3	34-40	32,3

нянні з контрольними і швидко замороженими зразками, що зумовлено збільшенням кількості зв'язаної води внаслідок криоденатурації компонентів сироватки.

3. Встановлено, що діелектрична проникність ϵ' СКК після швидкого заморожування до температури рідкого азоту (-196°C) має стійку тенденцію до перевищення значень ϵ' контрольних зразків.

4. Результати, отримані з температурної залежності в'язкості та часу діелектричної релаксації молекул води свідчать про зміну міжмолекулярних взаємодій білків СКК уже на початковому етапі охолодження.

O.A. Nardid, O.A. Gorobchenko, O.T. Nikolov, O.V. Lipina, Yu.A. Moshko

EXAMINATION OF LOW TEMPERATURE INFLUENCE ON CORD BLOOD SERUM BY MICROWAVE DIELECTRIC METHOD

The influence of the freezing velocities and final temperatures of storage on the complex dielectric permittivity of cord blood serum have been studied. On the temperature dependences of the dielectric permittivity the non-monotonous changes at the characteristic temperatures accompanying with the change of the activation energy of the water molecules dielectric relaxation were found out. The drastic deflection of the temperature dependence of ϵ'' from the monotone curve at 15°C region correlates with the fracture of Arrhenius plots of the dielectric relaxation time and viscosity at the same temperature. Slow freezing (1-2°C/min) of cord blood serum results in ϵ'' diminution in comparison with control, that testifies an increase of bound water amount because of loosening in this case the surface of biomacromolecule polypeptide chains. Rapid freez-

ing (300-400°C/min) results in ϵ'' increase of serum, that is caused, apparently, by the cryoaggregation of biomacromolecules, which can thus happen.

Institute for Problems Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Science of Ukraine, Kharkov V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ахадов Я. Ю. Диэлектрические свойства бинарных растворов. – М.: Наука, 1977. – 399 с.
2. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – К.: Наук. думка, 1982. – 255 с.
3. Грищенко В.И., Прокопюк О.С. Перспективы и возможности использования плацентарной крови // Мед. вести. – 1997. – №4. – С. 26–27.
4. Дебай П. Полярные молекулы. – М. – Л., 1931. – 245 с.
5. Жиликова Т.А. Температурозависимые изменения состояния воды в биологических мембранах по данным методов ЯМР и СВЧ-диэлектротометрии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1991. – 30 с.
6. Марковский А.Л. Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1984. – 20 с.
7. Нардид О.А. Влияние замораживания на структурно-функциональные свойства некоторых гемопротейнов // Пробл. криобиологии. – №3. – 1999. – С. 31–34.
8. Николов О.Т., Жиликова Т.А. Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями // Журн. физ. химии. – 1991. – 65, № 5. – С. 1312–1316.
9. Рэ Л. Консервация жизни холодом. – М.: Медгиз, 1962.
10. Цымбал Л.В. Исследование термоиндуцированных изменений микроструктуры крови методом спинного зонда // Пробл. криобиологии. – № 4. – 2001. – С. 71–72.
11. Шахпаронов М. И., Ахадов Я. Ю. Диэлектрические свойства и молекулярное строение растворов вода-ацетон // Журн. структур. химии. – 1965. – 6, № 1. – С. 21–262.

Ін-т проблем криобіології і кріомедицини НАН України, Харків; Харків. нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна