

## ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.346

**ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА СЫВОРОТКУ КОРДОВОЙ КРОВИ ПО ДАННЫМ СВЧ-ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ****О.А. Горобченко, Н.Т. Маркова\*, А.В. Адельянов, О.Т. Николов,  
Э.О. Нардид\*, С.В. Гаташ, О.А. Нардид\****Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61077**\*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, 61015**e-mail: olga\_bio\_f@yahoo.com*

Поступила в редакцию 10 апреля 2008 г.

В работе исследовано влияние замораживания до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  и последующего гамма-облучения дозами 20, 50, 100 и 150 Гр на сыворотку кордовой крови человека методом СВЧ-диэлектрметрии. Сыворотку кордовой крови замораживали со скоростью  $300\text{--}400\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до температуры  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  путем погружения в жидкий азот. Нативные образцы и образцы после замораживания-оттаивания облучали при комнатной температуре в атмосфере воздуха источником гамма-лучей  $\text{Co}^{60}$ . Измерение действительной части комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  замороженных, облученных и последовательно замороженных и облученных образцов сыворотки проводилось резонаторным методом на частоте 9,3 ГГц при комнатной температуре ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). В результате проведенного исследования было установлено, что замораживание сыворотки кордовой крови до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  приводит к увеличению ее диэлектрической проницаемости, что может быть результатом криоагрегации белков сыворотки. Гамма-облучение же приводит, напротив, к уменьшению диэлектрической проницаемости сыворотки кордовой крови. Предполагается, что понижение диэлектрических параметров сыворотки при облучении обусловлено конформационными изменениями ее белков, связанными с разрывом внутримолекулярных водородных связей, разрушением поверхности макромолекул и увеличением количества гидратной воды за счет образования новых водородных связей с молекулами объемной воды. Величины действительной части комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  сыворотки кордовой крови после замораживания до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  и последующего гамма-облучения принимают более низкие значения, чем только после замораживания, но более высокие, чем только после гамма-облучения. Это свидетельствует об аддитивном вкладе этих физических факторов в величину диэлектрической проницаемости сыворотки кордовой крови. Разности значений величин диэлектрической проницаемости сыворотки после замораживания и сыворотки после последовательного действия замораживания и гамма-облучения в пределах погрешности совпадают и не зависят от дозы облучения, что свидетельствует о независимом характере действия низких температур и облучения в дозах до 150 Гр на свойства сыворотки кордовой крови.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** сыворотка кордовой крови, гамма-облучение, низкие температуры, диэлектрическая проницаемость, СВЧ-диэлектрметрия.

Сыворотка кордовой крови (СКК) активно используется для лечения ряда патологических состояний [1, 2]. Одним из препятствий к широкому использованию СКК является проблема ее длительного хранения. Кроме того, имеется риск передачи пациенту патогенных вирусов и бактерий, которые могут содержаться в сыворотке. Решением подобных задач является низкотемпературное консервирование сыворотки [2] и ее стерилизация, например, с помощью ионизирующего излучения [3]. Однако охлаждение и облучение сопряжено с повреждающим действием низких температур и радиации на компоненты сыворотки, в связи с чем возникают задачи выявления последствий действия этих физических факторов на СКК. Такие исследования дадут возможность расширить понимание процессов, происходящих при замораживании и облучении СКК, и позволят разрабатывать надежные научно обоснованные технологии криоконсервирования и стерилизации препаратов, получаемых из кордовой крови, с



максимальным сохранением их нативных свойств.

Целью данной работы было исследование влияния наиболее щадящего режима замораживания до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  и гамма-облучения дозами 20-150 Гр на СКК методом СВЧ-диэлектromетрии, позволяющим оценить изменение соотношения свободная/связанная вода в образце.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали сыворотку кордовой крови человека. Сыворотку замораживали в полимерных ампулах объемом 0,7 мл со скоростью  $300\text{-}400\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до температуры  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  путем погружения в жидкий азот. Оттаивание проводили на водяной бане при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Образцы облучали при комнатной температуре в атмосфере воздуха дозами 20, 50, 100 и 150 Гр источником  $\text{Co}^{60}$  на установке типа "Исследователь" (СССР). Мощность экспозиционной дозы составляла 380 Р/мин. Поглощенную дозу контролировали методом ферросульфатной дозиметрии [4]. Контролем во всех экспериментах служили нативные образцы СКК.

Действительную ( $\epsilon'$ ) часть комплексной диэлектрической проницаемости измеряли на СВЧ-диэлектromетре резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [5]. Температуру измеряли с помощью термopары с точностью  $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Относительная ошибка измерений диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  составляла 0,2 %.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях было показано, что значение величины действительной части комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  СКК после быстрого замораживания до температуры жидкого азота ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) имеет тенденцию к увеличению по сравнению с контрольными образцами [6]. У некоторых доноров  $\epsilon'$  замороженной сыворотки практически не отличалось от  $\epsilon'$  нативных образцов. Вероятно, в этом случае нарушения, вызванные замораживанием сыворотки, были незначительны. В остальных случаях значения величины  $\epsilon'$  сыворотки после замораживания достоверно превышали контрольные, что свидетельствует об увеличении в системе количества свободной воды [6]. Аналогичное увеличение величины  $\epsilon'$  СКК, замороженной до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , наблюдается и в данной работе (рис.1, образец 2). Изучение спектров поглощения сывороточных альбуминов и иммуноглобулинов в УФ-области после замораживания до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  [7] свидетельствует, что их структура практически не отличается от спектров нативных белков, но после замораживания до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  увеличивается уровень светорассеяния растворами макромолекул. Расчет уровня поглощения при 310 нм позволил предположить ассоциацию и образование устойчивых агрегатов белков в растворе после замораживания, наблюдаемую, также, и методом СВЧ-диэлектromетрии [7]. Очевидно, эти процессы имеют место и в случае замораживания СКК до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Можно предположить, что повышение величины  $\epsilon'$  СКК после замораживания может быть следствием криоагрегации низкомолекулярных белков сыворотки, наблюдаемое методом гель-хроматографии [8].

Гамма-облучение СКК приводит, напротив, к понижению величины диэлектрической проницаемости, особенно явно выраженному при облучении дозой 150 Гр (рис. 1, образцы 3, 5, 7, 9). Такой же эффект наблюдался и для температурных зависимостей диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  облученных дозами 50 и 100 Гр образцов СКК [9]. Практически во всем исследованном интервале температур для образцов СКК, облученных дозами 50 и 100 Гр, значения действительной части комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  были ниже контроля. Уменьшение



величины диэлектрической проницаемости облученных образцов свидетельствует об увеличении в них количества связанной воды. Наблюдаемые эффекты коррелируют с результатами, полученными при исследовании водных растворов сывороточного альбумина быка и фибриногена человека, облученных такими же дозами [10, 11]. Как известно, основные радиолитические эффекты, наблюдаемые при облучении водных растворов белков, приводят к следующим нарушениям структуры белка [12, 13]: деструкция полипептидной цепи (разрывы водородных связей, разрывы дисульфидных мостиков, разрывы пептидной цепи), образование сшивок между пептидными цепями, реакции радикалов с боковыми ответвлениями (радикалами) аминокислотных остатков полипептидной цепи, образование низкомолекулярных продуктов, конформационные изменения вторичной и третичной структуры. В растворе сывороточного альбумина при гамма-облучении дозами до 100 Гр [10] методом спиновых меток было выявлено разрыхление поверхности макромолекул, однако конформационные изменения не затрагивали более глубоких участков белка. В связи с этим можно предположить, что понижение диэлектрических параметров СКК при облучении обусловлено конформационными изменениями белков сыворотки, связанными с разрывом внутримолекулярных водородных связей, разрыхлением поверхности макромолекул и увеличением количества гидратной воды за счет образования новых водородных связей с молекулами объемной воды.

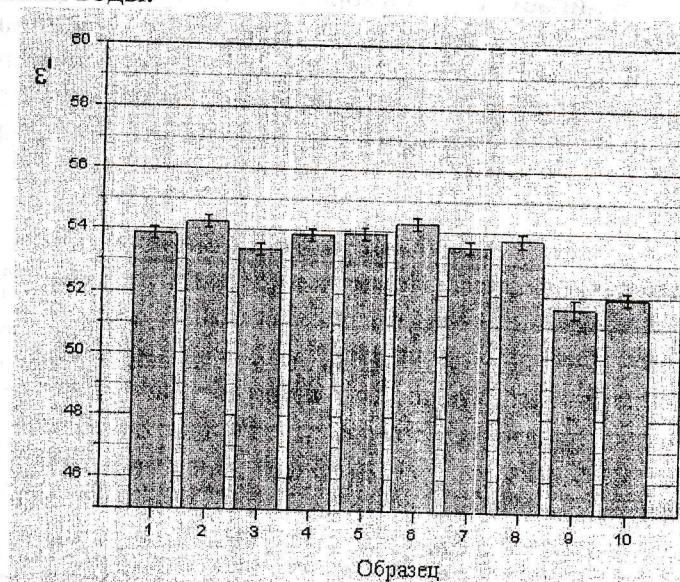


Рис. 1. Диэлектрическая проницаемость  $\epsilon'$  сыворотки кордовой крови: 1 - контроль, 2 - после замораживания до  $-196^\circ\text{C}$ , 3 - после облучения дозой 20 Гр, 4 - после замораживания до  $-196^\circ\text{C}$  и облучения дозой 20 Гр, 5 - после облучения дозой 50 Гр, 6 - после замораживания до  $-196^\circ\text{C}$  и облучения дозой 50 Гр, 7 - после облучения дозой 100 Гр, 8 - после замораживания до  $-196^\circ\text{C}$  и облучения дозой 100 Гр, 9 - после облучения дозой 150 Гр, 10 - после замораживания до  $-196^\circ\text{C}$  и облучения дозой 150 Гр.

При последовательном действии замораживания и гамма-облучения следует ожидать как эффектов агрегации макромолекул сыворотки, так и конформационных изменений их поверхностных участков. Действительно, величины диэлектрической проницаемости СКК после замораживания и последующего облучения принимают более низкие значения, чем только замороженных, но более высокие, чем гамма-облученных (рис. 1, образцы 4, 6, 8, 10). Это свидетельствует об аддитивном вкладе этих физических факторов в величину диэлектрической проницаемости сыворотки кордовой крови. Значения величин диэлектрической проницаемости СКК после замораживания и облучения дозами 20, 50 и 100 Гр в пределах погрешности совпадают



со значением величины диэлектрической проницаемости нативного образца. И только при облучении дозой 150 Гр диэлектрическая проницаемость СКК после замораживания и облучения существенно меньше контроля, что свидетельствует о значительном изменении структуры макромолекул СКК, сопровождающемся увеличением количества связанной воды в системе. Отличия в значениях величин диэлектрической проницаемости СКК после замораживания и СКК после последовательного действия замораживания и облучения не зависят от дозы облучения. Этот факт свидетельствует о том, что агрегационные процессы, которые имеют место при замораживании, не влияют на характер радиационного поражения компонент СКК при облучении дозами вплоть до 150 Гр.

### ВЫВОДЫ

При быстром замораживании до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  возможна криоагрегация белков сыворотки кордовой крови, приводящая к увеличению доли свободной воды и, соответственно, диэлектрической проницаемости. Гамма-облучение СКК приводит к уменьшению ее диэлектрической проницаемости. Величины диэлектрической проницаемости замороженных, а затем гамма-облученных образцов СКК практически не отличаются от контроля, а вклад этих физических факторов в величину диэлектрической проницаемости сыворотки кордовой крови имеет аддитивный характер. Разности значений величин диэлектрической проницаемости СКК после замораживания и СКК после последовательного действия замораживания и гамма-облучения в пределах погрешности совпадают и не зависят от дозы облучения, что свидетельствует о независимом характере действия низких температур и облучения в дозах до 150 Гр на свойства СКК.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мошко Ю.А. Применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови в лечении женщин с хроническими сальпингоофоритами. // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 70-75.
2. Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Ліпіна О.В., Мошко Ю.О. Заготівля, криоконсервування сироватки і плазми кордової крові та їх клінічне застосування. Методичні рекомендації. – Харків, 2000. – 11с.
3. House C., House J.A., Yedloutschnig R.J. Inactivation of viral agents in bovine serum by gamma irradiation. // Can J Microbiol. – 1990. – V. 36. – P. 737-740.
4. Хенли Э., Джонсон Э. Радиационная химия. – М.: Атомиздат, 1974. – 415 с.
5. Hackl E.V., Gatash S.V., Nikolov O.T. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions. // J. Biochem. Biophys. Meth. - 2005. – V. 63, № 2. - P. 137-148.
6. Горобченко О.А., Мошко Ю.А., Николов О.Т., Нардид О.А., Липина О.В., Гаташ С.В. Влияние режима замораживания на диэлектрические свойства сыворотки кордовой крови // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 2. – С. 4-10.
7. Марковский А.Л. Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. – Харьков, 1984. – 20 с.
8. Нардид Э.О., Науменко Е.И., Розанова С.Л., Нардид О.А. Влияние режимов замораживания на агрегацию белков сыворотки кордовой крови человека. // Проблемы криобиологии. - 2006. – Т. 16, № 3. - С. 311-315.
9. Горобченко О.А. Влияние  $\gamma$ -облучения и температуры на конформацию белков крови. Дис... канд. физ.-мат. наук: 03.00.02. – Харьков, 2005. – 150 с.
10. Горобченко О.А., Николов О.Т., Нардид О.А. Исследование влияния  $\gamma$ -облучения на структуру бычьего сывороточного альбумина методом спиновых меток // Прикладная радиоэлектроника. – 2004. – Т. 2, № 2. – С. 84-87.
11. Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С. В. Влияние  $\gamma$ -облучения на термoinдуцированные конформационные переходы и гидратацию фибриногена. // Біополімери і клітина. - 2006. - Т. 22, № 2. - С. 162-165.
12. Шарпаты В. А. Радиационная химия биополимеров. – М.: Энергоиздат, 1981. - 168 с.
13. Sunae Moon, Kyung Bin Song. Effect of gamma-irradiation on the molecular properties of egg white proteins. // Food Sci. Biotechnol. – 2000. – V. 9, №4. – P. 239-242.