

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.3

ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТКИ КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ**О.В. Липина, О.А. Горобченко*, О.А. Нардид, О.С. Ясунова*, О.Т. Николов****Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская, 23, Харьков 61015, Украина***Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина*

Поступила в редакцию 2 декабря 2013 года

Принята 17 декабря 2013 года

Представлены результаты исследования влияния длительного низкотемпературного хранения на диэлектрические свойства сыворотки кордовой крови человека (СККЧ). Для исследования использовали сыворотку кордовой крови человека, разведенную физиологическим раствором в соотношении 1:2. Целью данной работы было выяснение с помощью гамма-облучения и метода СВЧ-диэлектротомии влияния длительного хранения образцов СККЧ при -20°C и -196°C на состояние воды и, соответственно, на структуру биомакромолекул СККЧ. Для выявления скрытых повреждений белковых компонентов сыворотку после размораживания подвергали гамма-облучению. Было показано, что замораживание до -196°C с последующим хранением в жидком азоте при этой температуре в течение четырех лет оказывает меньшее влияние на состояние воды СККЧ, а значит и на структуру макромолекул СККЧ, и поэтому более предпочтительно по сравнению с замораживанием и хранением при -20°C .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сыворотка кордовой крови, низкотемпературное хранение, диэлектрическая проницаемость.

ДИЕЛЕКТРИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СИРОВАТКИ КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ ТРИВАЛОГО НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗБЕРІГАННЯ**О.В. Ліпіна, О.О. Горобченко*, О.А. Нардід, О.С. Ясунова*, О.Т. Ніколов****Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
вул. Переяславська, 23, Харків 61015, Україна***Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна*

Представлено результати дослідження впливу тривалого низькотемпературного зберігання на діелектричні властивості сироватки кордової крові людини (СККЛ). Для дослідження використовували сироватку кордової крові людини, розведену фізіологічним розчином у співвідношенні 1:2. Метою цієї роботи було з'ясування за допомогою гамма-опромінення і методу НВЧ-діелектротомії впливу тривалого зберігання зразків СККЛ при -20°C і -196°C на стан води і, відповідно, на структуру біомакромолекул СККЛ. Для виявлення прихованих ушкоджень білкових компонентів сироватку після розморожування піддавали гамма-опроміненню. Було показано, що заморожування до -196°C з наступним зберіганням у рідкому азоті при цій температурі протягом чотирьох років менше впливає на стан води СККЛ, а отже і на структуру макромолекул СККЛ, і тому є більш переважним у порівнянні із заморожуванням і зберіганням при -20°C .

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сироватка кордової крові, низькотемпературне зберігання, діелектрична проникність.

DIELECTRIC PROPERTIES OF HUMAN CORD BLOOD SERUM AFTER LONG-TERM LOW TEMPERATURE STORAGE**O.V. Lipina, O.A. Gorobchenko*, O.A. Nardid, O.S. Yasunova*, O.T. Nikolov****Institute of problem of cryobiology and cryomedicine, NAS of Ukraine,
Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkov 61015, Ukraine***V.N. Karazin Kharkov National University, Svobody Sq., 4, Kharkov 61022, Ukraine*

In the article the results of studying of the influence of long-term low temperature storage on dielectric properties of human cord blood serum (HCBS) are presented. In the study human cord blood serum diluted by physiological solution in ratio 1:2 was used. The purpose of the study was found out by gamma-irradiation and the method of UHF-dielectrometry the influence of long-term storage of HCBS samples at -20°C and -196°C on water state change and, consequently, on a structure of biomacromolecules in HCBS. The serum was gamma-irradiated after unfreezing in order to detect hidden damages of protein components. It was shown that freezing down to -196°C and storage in liquid nitrogen during four years have smaller influence on water state in HCBS and, consequently, on structure of macromolecules in HCBS, and therefore it is more preferable in comparison with freezing and storage at -20°C .

KEY WORDS: cord blood serum, low temperature storage, dielectric permittivity.

Криоконсервирование плацентарных биообъектов, в том числе и сыворотки кордовой (плацентарной) крови человека (СККЧ), является актуальной задачей криобиологии. Интерес исследователей и клиницистов к сыворотке кордовой крови человека обусловлен тем, что она является уникальной субстанцией, содержащей широкий спектр биологически активных соединений (половые гормоны, цитокины, факторы роста, ферменты, низкомолекулярные соединения и др.), которые синтезируются плодом и поступают в кровь матери во время беременности [1]. Благодаря своему уникальному составу СККЧ обладает высокой клинической эффективностью при многих патологиях [2].

Для создания современных криобиотехнологий, позволяющих в условиях низкотемпературных банков длительное время сохранить исходный состав и свойства СККЧ, необходимо изучение механизмов ее криоповреждения и криозащиты. Низкотемпературное консервирование – это сложный многоэтапный процесс, во время которого биологические объекты подвергаются действию различных физико-химических факторов, обусловленных изменением температуры, состава и состояния биологической системы и, прежде всего, воды. При понижении температуры происходит постепенное вымораживание свободной воды и при достижении температуры эвтектики система переходит в твердое состояние. Температура -20°C близка к точке эвтектики раствора NaCl (-21°C), содержащегося в СККЧ. При этом в системе наблюдаются отдельные области жидкой фазы, содержащие высокие, близкие к эвтектическим, концентрации солей. В этом случае практически все молекулы воды находятся в связанном состоянии и входят в состав гидратных оболочек солей и биомакромолекул. Поэтому хранение СККЧ при -20°C из-за наличия незамерзшей жидкой фазы воды повышает вероятность изменения структуры белковых макромолекул [3-5].

Целью данной работы было выяснение с помощью гамма-облучения и метода СВЧ-диэлектromетрии влияния длительного хранения образцов СККЧ при -20°C и -196°C на состояние воды и, соответственно, на структуру биомакромолекул СККЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали сыворотку кордовой крови человека шести рожениц, разведенную физиологическим раствором в соотношении 1:2. Подготовленные таким образом образцы замораживали в криопробирках емкостью 1 мл по двум программам: на программном замораживателе ЗП-10 со скоростью охлаждения $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры -20°C (три образца) и путем погружения в жидкий азот (-196°C) – скорость охлаждения $300-400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (три образца). Скорость охлаждения измеряли с помощью термопары при замораживании образцов объемом до 1 мл в криопробирках Nunk. Замороженную сыворотку хранили при температуре -20°C

и при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 4 лет, размораживали на водяной бане при температуре воды $38\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Скорость отогрева образцов не измеряли.

Комплексную диэлектрическую проницаемость СККЧ, ее действительную ε' и мнимую ε'' части, измеряли при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ с помощью СВЧ-диэлектromетра резонаторного типа на частоте $9,3\text{ ГГц}$ [6, 7]. Каждый образец измеряли 5-6 раз.

Для выявления скрытых повреждений белковых компонентов, произошедших во время длительного низкотемпературного хранения, размороженные образцы СККЧ облучали при комнатной температуре на гамма-установке «Исследователь». Дозы облучения составляли $1,7\text{ кГр}$ и 7 кГр , мощность экспозиционной дозы – 63 Р/мин .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены средние значения действительной части комплексной диэлектрической проницаемости ε' на частоте $9,3\text{ ГГц}$ образцов СККЧ. Видно, что среднее значение ε' образцов, замороженных до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранившихся 4 года при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, сопоставимо со средним значением ε' образцов, замороженных до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранившихся при этой температуре в течение того же времени. То же самое можно отметить и для образцов, облученных в дозе $1,7\text{ кГр}$. Облучение же в дозе 7 кГр оказывает большее влияние на величину ε' , особо выраженное для образцов, хранившихся при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для этих образцов понижение среднего значения ε' является проявлением повышенной чувствительности компонентов СККЧ к действию повреждающего фактора – γ -излучения и свидетельствует об увеличении количества связанной воды в образцах. В случае образцов, хранившихся при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, отмечается незначительная тенденция к уменьшению среднего значения ε' . По величине диэлектрических потерь ε'' не было зафиксировано достоверных отличий между образцами СККЧ, хранившимися при разных температурах, как до облучения образцов, так и после. Однако можно отметить тенденцию к росту диэлектрических потерь образцов, хранившихся при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и облученных в дозе 7 кГр . На фоне снижения величины ε' это свидетельствует об упорядочении структуры объемной воды (уменьшении подвижности молекул воды в СВЧ-поле) в этих образцах [5].

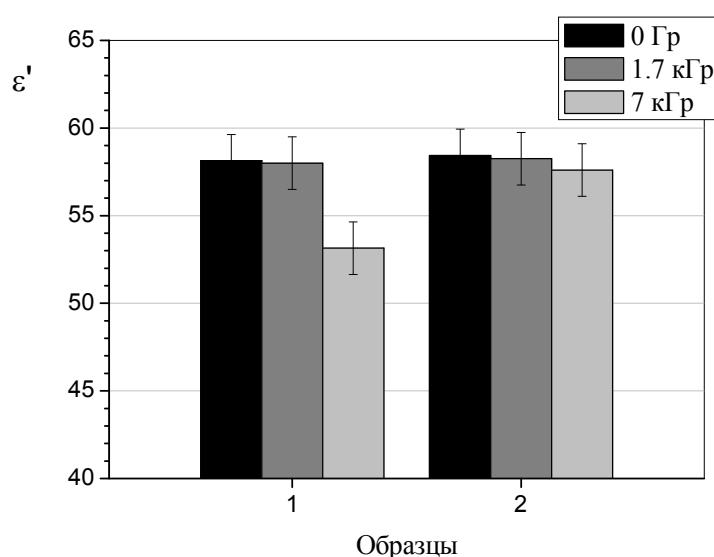


Рис. 1. Диэлектрическая проницаемость ε' образцов СККЧ при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ после γ -облучения: 1 – образцы СККЧ, замороженные до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранившиеся 4 года; 2 – образцы СККЧ, замороженные до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранившиеся 4 года.

Можно предположить, что наблюдаемые эффекты обусловлены конформационными изменениями белков биосистемы СККЧ, связанными с разрыхлением поверхности макромолекул под действием радиации, что подтверждается результатами исследования влияния гамма-облучения на сывороточный альбумин методом спиновых меток [8]. Разрыхление поверхности белков приводит к разрыву под действием гамма-излучения внутримолекулярных водородных связей, вследствие чего протон-донорные и протон-акцепторные центры становятся доступными для взаимодействия с окружающими молекулами воды. Это, вероятнее всего, и приводит к повышению количества связанной воды после облучения в дозе 7 кГр в замороженной до -20°C , по сравнению с замороженной до температуры жидкого азота, СККЧ.

ВЫВОДЫ

1. Гамма-облучение образцов СККЧ в дозе 7 кГр позволило обнаружить методом СВЧ-диэлектрметрии отличие диэлектрических свойств размороженных образцов СККЧ после хранения в течение четырех лет при температурах -20°C и -196°C . Эти отличия, вероятно, обусловлены вызванными действием низких температур скрытыми конформационными изменениями или повреждениями компонентов СККЧ.

2. Замораживание до -196°C , с последующим хранением в жидком азоте при этой температуре в течение четырёх лет, оказывает меньшее влияние на состояние воды СККЧ, а значит и на структуру макромолекул СККЧ, и поэтому более предпочтительно по сравнению с замораживанием и хранением при -20°C .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ширшев С. В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций / С. В. Ширшев // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 113, вып. 2. – С. 230–246. /Shirshov S. V. Belki fetoplacentarnogo kompleksa v regulaciji immunnyh reakcij / S. V. Shirshov // Uspehi sovremennoj biologii. – 1991. – Т. 113, вып. 2. – С. 230–246./
2. Препарати сироватки кордової крові людини: клінічне застосування / О. В. Ліпіна, І. Б. Мусатова, В. Ю. Трифонов, О. С. Прокопчук // Світ медицини та біології. – 2009. – № 4. – С. 38–41. /Preparati sirovatki kordovoї krovі ljudini: klinichne zastosuvannja / O. V. Lipina, I. B. Musatova, V. Ju. Trifonov, O. S. Prokopjuk // Svit medicini ta biologii. – 2009. – № 4. – С. 38–41./
3. Белоус А. М. Кробиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко. – К. : Наук. думка, 1994. – 432 с. /Belous A. M. Kriobiologija / A. M. Belous, V. I. Grishhenko. – K. : Nauk. dumka, 1994. – 432 s./
4. Розанова Е. Д. Влияние низких температур и криопротекторов на структуру и функцию изолированной цитохромоксидазы : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 «Кробиология» / Розанова Е. Д. – Харьков, 1984. – 20 с. /Rozanova E. D. Vlijanie nizkih temperatur i krioprotektorov na strukturu i funkciju izolirovannoj citohromoksidazy : avtoref. dis. na soiskanie uch. stepeni kand. biol. nauk : spec. 03.00.22 «Kriobiologija» / Rozanova E. D. – Har'kov, 1984. – 20 s./
5. Жилиякова Т. А. Температурозависимые изменения состояния воды в биологических мембранах по данным методов ЯМР и СВЧ-диэлектрметрии. Дис. ... кад. биол. наук. – Харьков, 1991. – 170 с. /Zhiljakova T. A. Temperaturozavisimye izmenenija sostojanija vody v biologicheskikh membranah po dannym metodov JaMR i svCh-dijeletrometrii. Dis. ... kad. biol. nauk. – Har'kov, 1991. – 170 s./
6. Николов О. Т. Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями / О. Т. Николов, Т. А. Жилиякова // Ж. физ. хим. – 1991. – Т. 65, № 5. – С. 1312–1316. /Nikolov O. T. Izmerenie kompleksnoj dijelektricheskoj pronicaemosti zhidkih dijelektrikov s bol'shimi poterjami / O. T. Nikolov, T. A. Zhiljakova // Zh. fiz. him. – 1991. – Т. 65, № 5. – С. 1312–1316./
7. Hackl E. V. Using UHF–dielectrometry to study protein structural transitions / E. V. Hackl, S. V. Gatash, O. T. Nikolov // J. Biochem. Biophys. Meth. – 2005. – V. 63 (2). – P. 137–148.
8. Горобченко О. А. Исследование влияния γ -облучения на структуру бычьего сывороточного альбумина методом спиновых меток / О. А. Горобченко, О. Т. Николов, О. А. Нардид // Прикладная радиоэлектроника. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 102–104. /Gorobchenko O. A. Issledovanie vlijanija γ -obluchenija na strukturu bych'ego syvorotochnogo al'bumina metodom spinovyh metok / O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, O. A. Nardid // Prikladnaja radiojelekttronika. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 102–104./