

## Влияние режимов замораживания на диэлектрические свойства сыворотки кордовой крови

О.А. ГОРОБЧЕНКО<sup>1</sup>, Ю.А. МОШКО<sup>2</sup>, О.Т. НИКОЛОВ<sup>1</sup>, О.А. НАРДИД<sup>2</sup>, О.В. ЛИПИНА<sup>2</sup>, С.В. ГАТАШ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Influence of Freezing Regimens on Cord Blood Serum Dielectric Properties

O.A. GOROBCHENKO<sup>1</sup>, Yu. A. MOSHKO<sup>2</sup>, O.T. NIKOLOV<sup>1</sup>, O.A. NARDID<sup>2</sup>, O.V. LIPINA<sup>2</sup>, S.V. GATASH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy  
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Методом СВЧ-диэлектротметрии исследованы температурные зависимости в интервале 4-40°C комплексной диэлектрической проницаемости молекул воды нативных и замороженных образцов сыворотки кордовой крови (СКК). Для всех исследованных образцов выявлены немонотонные изменения  $\epsilon'$  при температурах 7-9, 16-20, 26-28 и 36-38°C. Установлено, что при медленном замораживании до -20°C величина  $\epsilon'$  сыворотки меньше, чем у нативных образцов и подвергнутых быстрому замораживанию до -196°C. Это может быть следствием увеличения в системе количества связанной воды из-за роста гидратации молекул сыворотки. Быстрое замораживание приводит к увеличению  $\epsilon'$  СКК, которое вызвано процессами криоагрегации и дегидратации макромолекул в сыворотке.

**Ключевые слова:** кордовая кровь, сыворотка, криоконсервирование, СВЧ-диэлектротметрия, диэлектрическая проницаемость.

Методом НВЧ-діелектротметрії досліджено температурні залежності в інтервалі 4-40°C комплексної діелектричної проникності молекул води нативних і заморожених зразків сироватки кордової крові. Для всіх зразків виявлено немонотонні зміни  $\epsilon'$  при температурах 7-9, 16-20, 26-28 і 36-38°C. Установлено, що при повільному заморожуванні до -20°C величина  $\epsilon'$  сироватки менша, ніж у зразків нативних і підданих дії швидкого заморожування до -196°C. Це може бути наслідком збільшення в системі кількості зв'язаної води через зростання оводнення молекул сироватки. Швидке заморожування може приводити до збільшення  $\epsilon'$  сироватки кордової крові, що викликається процесами криоагрегації і дегідратації молекул в сироватці.

**Ключові слова:** кордова кров, сироватка, криоконсервування, НВЧ-діелектротметрія, діелектрична проникність.

Using UHF dielectrometry method the temperature dependencies of the complex dielectric permittivity for water molecules of native and frozen samples of cord blood serum (CBS) were investigated within the interval 4-40°C. For all the investigated samples non-monotonous changes in  $\epsilon'$  at 7-9, 16-20, 26-28 and 36-38°C were found. It is established that under slow freezing down to -20°C the serum  $\epsilon'$  value is lower than in both native samples and those subjected to rapid freezing, this may be the cause of increase in the amount of bound water in the system due to the growth of serum molecules hydration. Rapid freezing results in the  $\epsilon'$  increase in CBS, caused by cryoaggregation processes and dehydration of macromolecules in it.

**Key-words:** cord blood, serum, cryopreservation, UHF-dielectrometry, dielectric permittivity.

Получение и применение препаратов из биологических тканей стало одним из приоритетных направлений современной криобиологии и криомедицины. Благодаря своему уникальному составу и свойствам кордовая (плацентарная) кровь человека и ее компоненты активно используются в современных биотехнологических программах [4]. Способность кордовой крови оказывать общестимулирующее действие давно привлекает внимание клиницистов. Сыворотка кордовой крови содержит комплекс репродуктивных иммуномодуляторов, весь спектр гормонов, присущих организму новорожденного, ростовые и антипролиферативные факторы, гемопэтины и адаптогены, опиоидные пептиды, микроэлементы, витамины. Для создания и клинического использования новых эффективных

Both the obtaining and using of new preparations derived from biological tissues have become one of the prior directions in modern cryomedicine and cryobiology. Due to its unique composition and properties a human cord (placental) blood and its components are actively used in modern biotechnological programmes [4]. Cord blood ability to pay a total stimulating effect has attracted the clinicians' attention for a long time period. Cord blood serum has a complex of reproduction immune modulators, the whole hormone spectrum, which characterise a newborn organism, growth and antiproliferative factors, hemopoietins and adaptogenes, opioic peptides, microelements, vitamins. For creation and clinical usage of new effective preparations from human cord blood, it is necessary to find out the optimal technologies of its preservation

**Адрес для корреспонденции:** Нардид О.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-61-41, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua, olnard@mail.ru

**Address for correspondence:** Nardid O.A., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7726141, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua, olnard@mail.ru

препаратов из кордовой крови человека необходимо разработать оптимальные технологии ее консервирования с максимальным сохранением активности. Неотъемлемой частью таких технологий является использование низких температур, в связи с чем необходимо провести исследования по изменению структурного состояния компонентов СКК под действием низких температур. В данной работе методом СВЧ-диэлектротметрии исследовано влияние режимов замораживания на ее диэлектрическую проницаемость. Получены температурные зависимости комплексной диэлектрической проницаемости нативных и замороженных образцов сыворотки.

### Материалы и методы

В работе исследовали СКК рожениц Специализированного клинического родильного дома №5 г. Харькова. Сыворотку замораживали в полимерных ампулах объемом 1,5 мл. Для эксперимента использовали 9 образцов СКК. Образцы замораживали в двух режимах: медленное замораживание (МЗ) до  $-20^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и быстрое замораживание (БЗ) со скоростью  $300-400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  погружением в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Оттаивание проводили на водяной бане при  $40-42^{\circ}\text{C}$ . Контролем служила нативная СКК.

Действительную  $\epsilon'$  и мнимую  $\epsilon''$  части комплексной диэлектрической проницаемости в интервале температур  $4-40^{\circ}\text{C}$  измеряли СВЧ-диэлектротметром резонаторного типа на частоте  $9.2\text{ ГГц}$  [10]. Использовалась известная методика относительных измерений  $\epsilon'$  и  $\epsilon''$  [1, 13]. Значения  $\epsilon''$  корректировали с учетом поправки на электропроводность. Для этого измеряли низкочастотную проводимость  $\sigma$  на частоте  $1000\text{ Гц}$ . Температуру образца определяли с помощью медь-константановой термопары с точностью  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Относительная ошибка измерения диэлектрических параметров составляла: для  $\epsilon'$   $0,1$  и для  $\epsilon''$   $0,2\%$ . Для вычисления величины статической диэлектрической проницаемости  $\epsilon_s$  и частоты диэлектрической релаксации  $f_d$  молекул воды в исследуемых системах использовали выражения, полученные из уравнений Дебая [5]:

$$\epsilon_s = \epsilon' + \epsilon''^2 / (\epsilon' - \epsilon_{\infty}), \quad (1)$$

$$f_d = f (\epsilon' - \epsilon'') / \epsilon'', \quad (2)$$

где  $f$  – частота микроволнового поля;  $\epsilon''$  – диэлектрическая проницаемость воды в ИК-диапазоне.

### Результаты и обсуждение

Частота диэлектрической релаксации молекул воды является параметром, характеризующим подвижность молекул в СВЧ поле, и, следова-

with the maximum activity storage. Integral part of such a kind of technologies is low temperatures usage, in this connection it is necessary to perform the investigations according to a change in structural state of CBS components at the low temperature influence. In this work the influence of cooling regimens on CBS dielectric permittivity by UHF-dielectrometry method is investigated. Temperature dependencies of complex dielectric permittivity of native and frozen serum samples are obtained.

### Materials and methods

In this work the CBS supplied from Kharkov specialised clinical maternity house №5 was investigated. The serum was frozen in 1.5 ml polymeric ampoules. We used 9 CBS samples for the experiment. The samples were frozen by 2 regimens: slow freezing (SF) down to  $-20^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and rapid freezing (RF) at a rate of  $300-400^{\circ}\text{C}/\text{min}$  by immersion into liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Thawing was performed on water bath at  $40-42^{\circ}\text{C}$ . Native CBS served as a control.

Real  $\epsilon'$  and imaginary  $\epsilon''$  parts of complex dielectric permittivity within the interval  $4-40^{\circ}\text{C}$  were investigated by resonator type UHF-dielectrometer at frequency of  $9.2\text{ GHz}$  [10]. There was used the standard methods of relative measurements of  $\epsilon'$  and  $\epsilon''$  [1, 13].  $\epsilon''$  values were corrected in respect of the electroconductivity amendment. Low-frequency conductivity,  $\sigma$ , at frequency of  $1000\text{ Hz}$  was measured for this purpose. The temperature of the sample was estimated with the help of copper-constantan thermocouple with the accuracy of  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Relative error of measurement in dielectric parameters for  $\epsilon'$  made:  $0.1$  and  $0.2\%$  for  $\epsilon''$ . To calculate a static dielectric permittivity value,  $\epsilon_s$  and for the one of dielectric relaxation frequency of water molecule,  $f_d$ , in investigated systems there were used expressions, obtained from P. Debye equations [5]:

$$\epsilon_s = \epsilon' + \epsilon''^2 / (\epsilon' - \epsilon_{\infty}), \quad (1)$$

$$f_d = f (\epsilon' - \epsilon'') / \epsilon'', \quad (2)$$

where  $f$  is microwave field frequency;  $\epsilon''$  is water dielectric permittivity within IR range.

### Results and discussion

Water molecule dielectric relaxation frequency is the parameter, characterising the molecule mobility in UHF field and, consequently, the degree of their interaction with an environment. The structural disorders and conformational changes in blood component result in the differences in the free-bound water system ratio and are accompanied by the change in dielectric parameters. Such dielectric parameter measurements are revealed by UHF method within the range of the frequencies, corresponding to the area

тельно, степень их взаимодействия с окружением. Структурные нарушения и конформационные изменения компонент крови влекут за собой отличия в соотношении свободная-связанная вода в системе и сопровождаются изменением диэлектрических параметров, которые можно обнаружить методом СВЧ-диэлектротометрии в диапазоне частот, соответствующих области дисперсии молекул воды. Это позволяет использовать значение диэлектрической проницаемости биологических объектов как физический критерий при оценке структурных нарушений макромолекул и клеток, вызванных различными факторами [3, 14].

Значения измерений действительной части комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  образцов нативной и замороженной по двум режимам СКК представлены на рис. 1.

Как видно из гистограмм, значения  $\epsilon'$  медленно замороженной сыворотки для всех исследованных доноров ниже контроля. Это свидетельствует об уменьшении количества свободной воды в системе, что может являться результатом более высокой гидратации молекул СКК. При медленном замораживании повреждения биоструктур прежде всего вызваны действием повышенных концентраций солей, образующихся при постепенном переходе воды из жидкой в твердую фазу [11]. Такие повреждения усугубляют хранение сыворотки при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , которая близка эвтектической для присутствующих ионов. При этой температуре вымерзает только свободная вода, связанная же и жестко связанная (температуры замерзания от  $-35$  до  $-50^{\circ}\text{C}$  и от  $-120$  до  $-130^{\circ}\text{C}$  соответственно [2, 6]) остаются в жидком состоянии. Такие условия могут нарушать структуру липопротеинов и конформацию биомacroмолекул [11], проявляющейся в разрыхлении поверхностных полипептидных цепей [9]. В результате этого происходит освобождение дополнительных участков связывания для молекул воды. Следствие этих процессов – суммарное увеличение количества связанной воды в СКК (рис. 1).

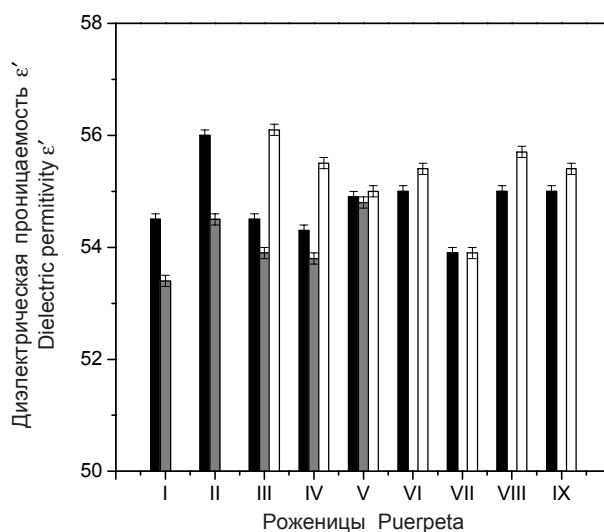
Влияние быстрого замораживания СКК на значение  $\epsilon'$  имеет противоположную по отношению к медленно замороженным образцам направленность. Для доноров V и VII значение  $\epsilon'$  быстро замороженной сыворотки мало отличается от  $\epsilon'$  нативных образцов. Вероятно, нарушения, вызванные замораживанием сыворотки, незначительны. В остальных случаях значения  $\epsilon'$  быстро замороженной сыворотки достоверно превышают контрольные, что свидетельствует об увеличении в системе количества свободной воды. Изучение спектров поглощения сывороточных альбуминов и иммуноглобулинов в УФ-области после замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  [8] показало, что их структура

of water molecule dispersion. This permits to use the dielectric permittivity value of biological objects as a physical criterion when estimating structural macromolecule and cell disorders, provoked by different factors [3,14].

The values of changes in an actual part of complex dielectric permittivity,  $\epsilon'$ , of native samples and those frozen, according to two CBS regimens are shown in Fig.1.

As it is observed from the histogramme,  $\epsilon'$  value of slowly frozen serum for all the investigated donors is lower than the control. This testifies to the decrease of free water quantity in system, that may be the result of higher hydration of CBS molecules. At slow freezing, the damage of biostructures is provoked by the influence of increased saline concentrations, forming at a gradual water transition from a liquid into solid phase [11]. Damages of such a kind aggravate a serum storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , which is close to eutectic temperature for the ions being present. At this temperature, only free water is frozen-out, bound water and rigidly bound (freezing temperatures from  $35$  to  $-50^{\circ}\text{C}$  and from  $-120$  to  $-130^{\circ}\text{C}$ , correspondingly [2,6]) remain under liquid condition. Such conditions may impair the structure of lipoproteins and the conformation of biomacro-molecule [11], manifested in surface polypeptide chain loosening [11]. As the result of this the release of extra sites of binding for water molecules takes place. The consequence of these processes is a total increase of bound water amount in CBS (Fig.1).

The influence of CBS rapid cooling on  $\epsilon'$  value according to slowly frozen samples has an inverse orientation. For V and VII donors,  $\epsilon'$  value of rapid cooling serum slowly differs from  $\epsilon'$  of native samples. Probably, the impairments, caused by serum freezing



**Рис. 1.** Значения диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  СКК при  $20^{\circ}\text{C}$ . ■ – контроль; ▒ – МЗ; □ – БЗ.

**Fig.1.** The values of CBS dielectric permittivity,  $\epsilon'$ , at  $20^{\circ}\text{C}$ . ■ – control; ▒ – SF; □ – RF.

практически не отличается от структуры спектров нативных белков, но после низкотемпературного воздействия 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-диэлектротрии [8]. Очевидно, эти процессы имеют место и при быстром замораживании СКК, что проявляется в повышении  $\epsilon'$  (рис. 1). Незначительные отличия абсолютных значений  $\epsilon'$  у разных рожениц обусловлены, вероятно, индивидуальными особенностями биохимического и гормонального состава СКК.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о разностороннем влиянии низких температур на величину  $\epsilon'$  СКК. При медленном замораживании нарушается конформация молекул сыворотки и повышается количество связанной воды в системе, быстрое замораживание может приводить к криоагрегации молекул и их дегидратации. Степень и характер влияния низких температур определяются режимом замораживания и индивидуальными особенностями состава СКК донора. Поэтому для более доскональной оценки вклада отдельных составных частей сыворотки крови в изменение диэлектрических параметров необходима информация о поведении каждого компонента сыворотки на воздействие низких температур.

Для детального исследования структурных изменений компонент сыворотки при быстром и медленном замораживании были получены зависимости диэлектрических параметров  $\epsilon'$  и  $\epsilon''$  СКК для рожениц III и VII от температуры в интервале 4-40°C, вычислены значения статической диэлектрической проницаемости  $\epsilon_s$  и частоты диэлектрической релаксации молекул воды  $f_d$ . Результаты измерений  $\epsilon'$  для нативных и замороженных образцов СКК представлены на рис. 2 и 3.

Во всем исследованном интервале температур зависимости диэлектрической проницаемости характеризуются немонотонными изменениями  $\epsilon'$  при температурах 7-9, 18-20 (рис.3), 15-20, 26-28°C (рис. 2) как для нативных, так и для замороженных образцов. При температурах 16-18, 27-29 и 36-38°C наблюдаются ступенчатообразные изменения диэлектрических потерь  $\epsilon''$  и немонотонные изменения статической диэлектрической проницаемости  $\epsilon_s$ , отражающей вклад  $\epsilon'$  и  $\epsilon''$  (рис. 4 и 5). Процессы, происходящие при этом в системах, сопровождаются изменением энтальпии активации диэлектрической релаксации молекул воды, что проявляется в виде изломов на Аррениусовых зависимостях  $\ln f_d$  от обратной температуры (рис. 6).

На рис.5 представлена зависимость декремента статической диэлектрической проницаемости  $\Delta\epsilon_s$

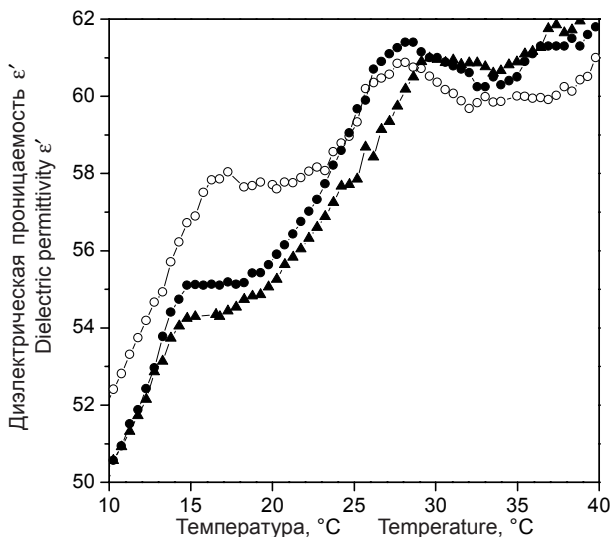
are not significant. In other cases the  $\epsilon'$  values of rapidly freezing serum are statistically and significantly higher than the control, that testifies to an increase of free water amount in the system. The investigation of both serum albumin spectrum and immunoglobulins absorption in UV region after freezing down to -196°C [8] has shown that their structure does not practically differ from native proteins spectrum one, but after the low temperatures effect, the level of light dispersion by macromolecule solutions increases. The calculation of absorption level at 310 nm permitted to suppose the association and the creation of stable protein aggregates in solution after freezing, observed by UHF-dielectrometry method as well [8]. It is obvious that these processes take place at rapid CBS freezing, which is manifested in  $\epsilon'$  increase (Fig. 1). Slight differences in absolute values of  $\epsilon'$  in various parturients are stipulated, probably, by individual peculiarities of biochemical and hormonal CBS content.

Thus, obtained results orient to versatile influence of low temperatures on  $\epsilon'$  of CBS. Under slow freezing the serum molecules' conformation impairs and the number of bound water increases in system, rapid freezing can bring both to molecular cryoaggregation and dehydration. The degree and the character of low temperature influence are determined both by freezing regimen and individual peculiarities of donor's CBS composition. Therefore, for more thorough estimation of contribution of blood serum certain components in dielectric parameters changes, the information about the behaviour of every serum component on low temperatures influence is necessary.

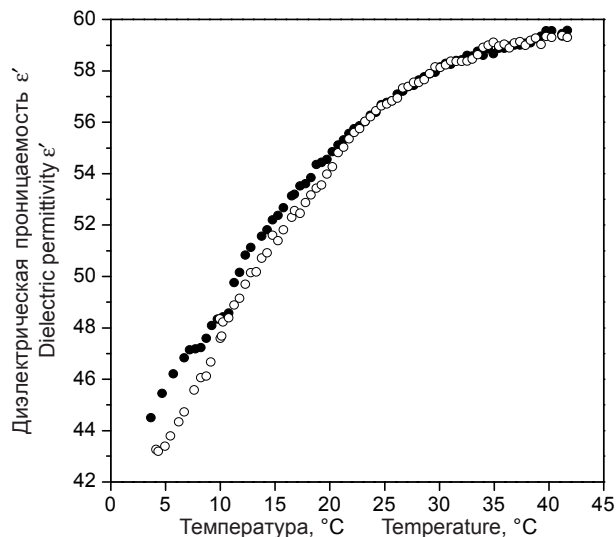
For detailed investigation of structural changes of serum components at slow and rapid freezing the dependencies of CBS dielectric parameters  $\epsilon'$  and  $\epsilon''$  of parturients III and VII on the temperature within the 4-40°C interval were obtained, the values of  $\epsilon_s$ , static dielectric permittivity and the frequency of dielectric relaxation of water molecules  $f_d$ , were calculated. The results of  $\epsilon'$  calculations in native and frozen CBS samples are shown in Fig.2 and 3.

Within the whole investigated temperature interval the dielectric permittivity dependencies are characterized by non-monotonous  $\epsilon'$  changes at 7-9, 18-20 (Fig.3), 15-20, 26-28°C (Fig.2), according to both native and frozen samples. At 16-18, 27-29 and 36-38°C step-like changes in  $\epsilon''$  dielectric losses and non-monotonous changes in static dielectric permittivity  $\epsilon_s$ , reflecting  $\epsilon'$  and  $\epsilon''$  contribution, are observed (Fig.4 and 5). The processes, taking place in systems at that time, are followed by the change in activation enthalpy of water molecules' dielectric relaxation, that is manifested as a break on Arrhenius dependencies  $\ln f_d$  on a reverse temperature (Fig.6).

In Fig.5 there is shown the dependence of static dielectric permittivity  $\Delta\epsilon_s$  decrement on temperature, determined as the difference in  $\epsilon_s$  of solvent (water)



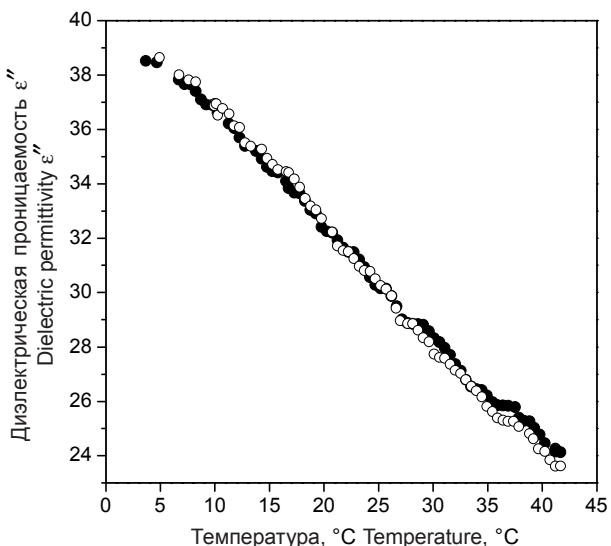
**Рис. 2.** Зависимость  $\epsilon'$  СКК от температуры для роженницы III. ● – контроль; ○ – БЗ; ▲ – МЗ.  
**Fig.2.** CBS  $\epsilon'$  dependence on temperature for parturient III. ● – control; ○ – RF; ▲ – SF.



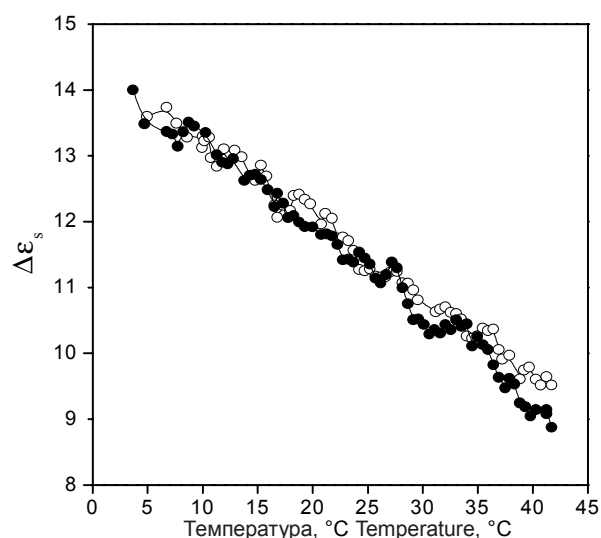
**Рис. 3.** Зависимость  $\epsilon'$  СКК от температуры для роженницы VII. ● – контроль; ○ – БЗ.  
**Fig. 3.** CBS  $\epsilon'$  dependence on temperature for parturient VII. ● – control; ○ – RF.

от температуры, определяемого как разность  $\epsilon_s$  растворителя (воды) и  $\epsilon_s$  СКК. Известно, что величина  $\Delta\epsilon_s$  раствора относительно растворителя пропорциональна концентрации растворенного вещества и его гидратации [15]. Так как концентрация компонент СКК с ростом температуры не изменяется, можно предположить, что температурозависимые изменения  $\Delta\epsilon_s$  определяются степенью связывания макромолекулами воды. В таком случае общее изменение  $\Delta\epsilon_s$  при повышении температуры свидетельствует об уменьшении

and  $\epsilon_s$  of CBS. It is known, that the  $\Delta\epsilon_s$  value of the solution, in respect of the solvent is proportional to the concentration of dissolvent substance and its hydration [15]. As the concentration of CBS component with the growth of the temperature does not change, it is possible to suppose that the temperature-dependent  $\Delta\epsilon_s$  changes are determined by the degree of water micromolecules' binding. In this case the total  $\Delta\epsilon_s$  change at temperature increase testifies to the hydration decrease, and non-monotonous  $\Delta\epsilon_s$  increase at 7-9, 15, 26-28, 32-34°C (control), does about its increase.



**Рис. 4.** Зависимость  $\epsilon''$  СКК от температуры для роженницы VII. ● – контроль; ○ – БЗ.  
**Fig. 4.** CBS  $\epsilon''$  dependence on the temperature for the parturient VII. ● – control; ○ – RF.



**Рис. 5.** Зависимость декремента статической диэлектрической проницаемости  $\Delta\epsilon_s$  СКК от температуры для роженницы VII. ● – контроль; ○ – БЗ.  
**Fig. 5.** Decrement dependence of static dielectric permittivity,  $\Delta\epsilon_s$ , CBS on temperature for parturient VII. ● – control; ○ – RF.

**Рис. 6.** Аррениусовы зависимости логарифма частоты диэлектрической релаксации диполей воды в СКК от обратной температуры для роженницы VII. ● – контроль; ○ – БЗ.

**Fig. 6.** Arrhenius dependencies of frequency logarithm of dielectric relaxation of water dipoles in CBS on the reverse temperature for parturient VII. ● – control; ○ – RF.

гидратации, а немонотонное возрастание  $\Delta\epsilon_s$  при 7-9, 15, 26-28, 32-34°C (контроль) – об ее увеличении. Отличия в значениях  $\Delta\epsilon_s$  быстро замороженных образцов СКК по сравнению с контролем проявляются при температурах 18-24°C, а также после 28°C, что указывает на увеличение количества связанной воды. Частота диэлектрической релаксации диполей воды быстро замороженной сыворотки при температурах до 20°C меньше контроля, что также свидетельствует о некотором затормаживании вращения диполей воды в СВЧ поле в результате их структурирования или связывания.

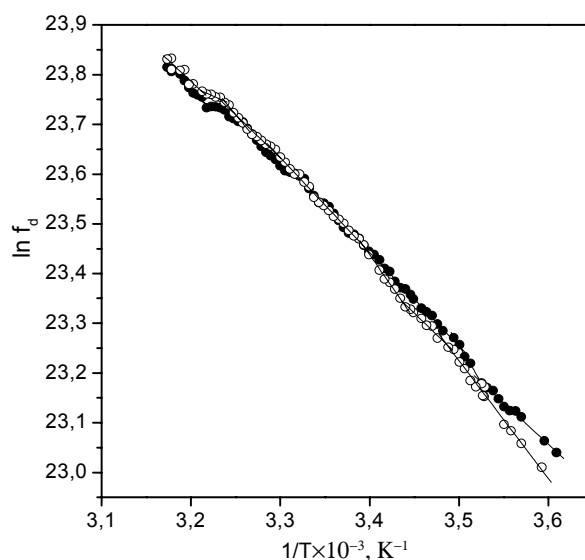
Немонотонные изменения диэлектрических параметров, очевидно, вызваны термоиндуцированными изменениями конформации молекул сыворотки. Исследования спектральных характеристик плазмы кордовой крови [12] позволили установить, что в температурных интервалах около 8, 15 и 27°C резко изменяется частота вращения спицевого зонда. При 18-20°C наблюдается повышение динамической вязкости [7], температурная зависимость которой характеризуется наличием двух интервалов (4-18 и 20-40°C) с различной скоростью изменения вязкости.

Повышение вязкости при 20 °C хорошо коррелирует с наблюдаемым нами понижением  $\epsilon'$  (см. рис.2 и 3), а также с явно выраженным изломом на Аррениусовых зависимостях при этой же температуре. Скорость уменьшения вязкости согласуется с уменьшением скорости изменения  $f_d$  после 18-20 °C и, вероятно, также обусловлено затормаживанием вращения диполей воды и изменением структурного состояния растворителя.

Таким образом, исследование диэлектрических свойств нативной, медленно и быстро замороженной СКК позволило выявить изменения состояния воды при термотропных конформационных переходах молекул СКК и установить, что степень и характер влияния низких температур определяются как режимом замораживания, так и индивидуальными особенностями доноров.

## Выводы

Выявлены немонотонные изменения  $\epsilon'$ ,  $\epsilon''$  и  $f_d$  при температурах 7-9, 16-20, 26-28 и 36-38°C для нативных и замороженных образцов СКК. Уста-



Differences in  $\Delta\epsilon_s$  values differences of rapidly frozen CBS samples, compared with the control are manifested at 18-24°C, and after 28°C as well, that testifies to an increase of bound water amount. The frequency of dielectric relaxation of water dipoles of rapidly frozen serum at temperatures down to 20°C lower than the control, that also testifies to some slowing down of rotation of water dipoles in UHF field in the result of their structuring and binding.

Non-monotonous changes in dielectric parameters are, probably, determined by thermoinduced changes in conformation of serum molecule. Cord blood plasma spectral characteristic investigations [12] permitted to establish that within temperature intervals 8-15 and 27°C the frequency of spine-probe rotation sharply changes. At 18-20°C the increase in dynamic viscosity is observed [7], which temperature dependence is characterized by existence of two intervals 4-18 and 20-40°C at various rate of viscosity change.

The increase in viscosity at 20°C correlates with the observed by us decrease of  $\epsilon'$  (see Fig.2 and 3), and with clearly expressed break on Arrhenius dependences at the same temperature. The rate of viscosity decrease coordinates with the decrease of  $f_d$  change after 18-20°C and, probably, is determined by slowing down of water dipoles rotation and the change in structural solvent state.

Thus, the investigation of dielectric peculiarities of native, slowly and rapidly frozen CBS permitted to reveal the change in water condition at thermotropic conformational transition of CBS molecules and to establish that both the degree and the character of low temperatures influence are determined by freezing regimen and by individual donor peculiarities as well.

## Conclusions

Nonmonotonous changes in  $\epsilon'$ ,  $\epsilon''$  and  $f_d$  at 7-9, 16-20, 26-28 and 36-38°C for native and frozen samples

новлено, что происходящие при этом термотропные конформационные изменения ее молекул сопровождаются увеличением степени гидратации.

Обнаружено понижение значений  $\epsilon'$  при медленном замораживании до  $-20^\circ\text{C}$  по сравнению с контролем и быстрым замораживанием в результате увеличения в системе количества связанной воды, что может быть следствием изменения конформации компонент СКК.

Выявлено, что диэлектрическая проницаемость  $\epsilon'$  при быстром замораживании в жидком азоте ( $-196^\circ\text{C}$ ) либо не отличается, либо превышает контроль, что обусловлено индивидуальным составом СКК доноров.

of CBS have been revealed. It is established that, occurring at this time the thermotropic conformational changes in its molecules are accompanied by an increase of hydration degree. There was found the decrease of  $\epsilon'$  values at slow freezing down to  $-20^\circ\text{C}$  in comparison with the control and rapid freezing in the result of increase in the system of bound water that may be the cause of change in conformation in CBS macromolecules.

It is established that the dielectric permittivity,  $\epsilon'$  at rapid freezing in liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ) either does not differ, or exceeds the control, that is determined by an individual composition of donor CBS.

## Литература

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. – Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
3. Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С.В., Берест В.П. Влияние  $\gamma$ -облучения и температуры на плазму и сыворотку крови по данным СВЧ-диэлектromетрии // Вісник Харк. ун-ту, № 497, Біофізичний вісник.– Вип. 2(7).– 2000.– С. 24-28.
4. Грищенко В.И., Прокопюк О.С. Перспективы и возможности использования плацентарной крови // Мед. вести.– 1997.– №4.– С. 26-27.
5. Дебай П. Полярные молекулы.– М.-Л., 1931.– 245 с.
6. Жилыкова Т.А. Температурозависимые изменения состояния воды в биологических мембранах по данным методов ЯМР и СВЧ-диэлектromетрии: Дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1991.– 170 с.
7. Липина О.В., Прокопюк О.С., Савченко Ю.А. К вопросу о криоконсервировании плазмы кордовой крови // Пробл. криобиологии.– 2000.– №4.– С. 83-84.
8. Марковский А.Л. Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1984.– 20 с.
9. Нардид О.А. Влияние замораживания на структурно-функциональные свойства некоторых гемопротеинов // Пробл. криобиологии.– 1999.– №3.– С. 31-34.
10. Николов О.Т., Жилыкова Т.А. Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями // Журн. физ. химии.–1991.– Т. 65, №5.– С. 1312-1316.
11. Рэ Л. Консервация жизни холодом.– М.: Медгиз.– 1962.– 312 с.
12. Цымбал Л.В. Исследование термоиндуцированных изменений микроструктуры крови методом спинowego зонда // Пробл. криобиологии.– 2001.– №4.– С.71-72.
13. Шахпаронов М.И., Ахадов Я.Ю. Диэлектрические свойства и молекулярное строение растворов вода-ацетон // Журн. структур. химии.– 1965.– Т. 6, №1.– С. 21-26.
14. Balyuk L.V., Gatash S.V., Gorobchenko O.A., Nikolov O.T. Dielectric properties of human erythrocytes in normal and carcinogenic state // Вісн. Харк. ун-ту, № 560, Біофізичний вісник.– Вип. 1 (10).– 2002.– С. 54-57.
15. Buchanan T.J., Haggis J.H., Hasted J.B., Robinson B.J. The dielectric estimation of protein hydration // Proc. Roy. Soc.– 1952.– Vol. A 213.– P. 379-391.

## References

1. Akhadov Ya.Yu. Dielectric peculiarities of binary solutions.– Moscow: Nauka, 1977.– 399p.
2. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes in biological membrane under cooling.– Kiev: Nauk.dumka, 1982.– 255 p.
3. Gorobchenko O.A., Nikolov O.T., Gatash S.V., Berest V.P. Influence of  $\gamma$ -irradiation and temperature on blood plasma and serum according to UHF dielectrometry data // Visn. Khark. Univ., № 497, Biophysical Bulletin.– Issue 2(7).– 2000.– P. 24-28.
4. Grischenko V.I., Prokopyuk O.S. Perspectives and possibilities of placental blood usage // Med. Vesti.– 1997.– N4.– P. 26-27.
5. Debay P. Polar molecules.– Moscow-Leningrad, 1931.– 245 p.
6. Zhilyakova T.A. Temperature-dependent changes of water state in biological membrane according to the date of NMR and UHF dielectrometry: Thesis for obtaining the candidates degree.– Kharkov, 1991.– 170p.
7. Lipina O.V., Prokopyuk O.S., Savchenko Yu.A. To the question on cord blood plasma cryopreservation // Problems of Cryobiology.– №4.– 2000.– P. 83-84.
8. Markovsky A.L. Influence of cryopresevation factors on globular protein hydration: Abstract of Thesis Cand. Biol. Sci.– Kharkov, 1984.– 20 p.
9. Nardid O.A. The influence of cooling on structural and functional peculiarities of some haemoproteins // Problems of Cryobiology.– N3.– 1999.– P. 31-34.
10. Nikolov O.T., Zhilyakova T.A. Measuring of complex dielectric permittivity of liquid dielectrics with great losses // Zhurn. Fiz. Khimii.– 1991.– Vol. 65, N5.– P. 1312-1316.
11. Re L. Life preservation by cold.– Moscow: Medgiz, 1962.– 312 p.
12. Tsybal L.V. Spin-probe Study of Thermoduced Changes in Blood Microstructure // Problems of Cryobiology.– 2001.– N4.– P. 71-72.
13. Shakhparonov M.I., Akhadov Ya. Yu. Dielectric peculiarities and molecular composition of water-acetone solutions // Zhurn. Structur. Khimii.– 1965.– Vol. 6.– N1.– P. 21-26.
14. Balyuk L.V., Gatash S.V., Gorobchenko O.A., Nikolov O.T. Dielectric properties of human erythrocytes in normal and carcinogenic state // Visn. Khark. Univ., № 560, Biophysical Bulletin.– Issue 1 (10).– 2002.– С. 54-57.
15. Buchanan T.J., Haggis J.H., Hasted J.B., Robinson B.J. The dielectric estimation of protein hydration // Proc. Roy. Soc.– 1952.– Vol. A 213.– P. 379-391.

Accepted in 06.11.2003.

Поступила 6.11.2003