



УДК 611.018.5.013.8:577.3:547.42/43

© 2010

А. В. Зинченко, Е. Н. Боброва

**Физические процессы в плазме кордовой крови
в присутствии 1,2-пропандиола, глицерина
и диметилсульфоксида при температуре ниже 0 °С**

(Представлено академиком НАН Украины В. И. Грищенко)

Методом диференційної сканувальної калориметрії досліджено склування, кристалізацію і плавлення в плазмі кордової крові з додаванням 1,2-пропандіолу, гліцерину і диметилсульфоксиду в діапазоні низьких та середніх концентрацій і в інтервалі температур 0 ÷ –196 °С. Виявлено, що при змішуванні плазми кордової крові з розчинами 1,2-пропандіолу стабільність аморфного склоподібного стану вища, ніж при змішуванні з розчинами гліцерину і диметилсульфоксиду тих же концентрацій. При концентраціях у системі всіх досліджуваних криопротекторів понад 40% відбувається кристалізація льоду з аморфної фази в ході нагрівання заморожених зразків. У системах, що мають у своєму складі диметилсульфоксид, зареєстровані кристалізація і плавлення евтектик.

Разработка способов консервирования низкими температурами в последнее десятилетие получила широкое развитие в технологии длительного хранения биологического материала. Плазма и сыворотка кордовой крови, содержащей широкий спектр биологически активных веществ [1], могут использоваться в качестве компонентов сложных защитных сред в технологическом процессе криоконсервирования. Так, например, наряду с криопротекторами, содержание в криозащитной среде спермальной плазмы, кордовой сыворотки и альбумина оказывает положительное влияние на восстановление подвижности спермиев после криоконсервирования [2]. Известно, что процесс низкотемпературного консервирования биологических систем сопровождается физическими процессами, такими как стеклование, кристаллизация и плавление [3–5], которые могут оказывать повреждающее действие на биологические объекты.

Нами исследованы фазовые переходы и стеклование в системе, содержащей плазму кордовой крови и водные растворы криопротекторов, широко используемых в криобиологии, таких как 1,2-пропандиол (1,2-ПД), глицерин (Гл) и диметилсульфоксид (ДМСО) в температурном диапазоне 0 ÷ –196 °С.

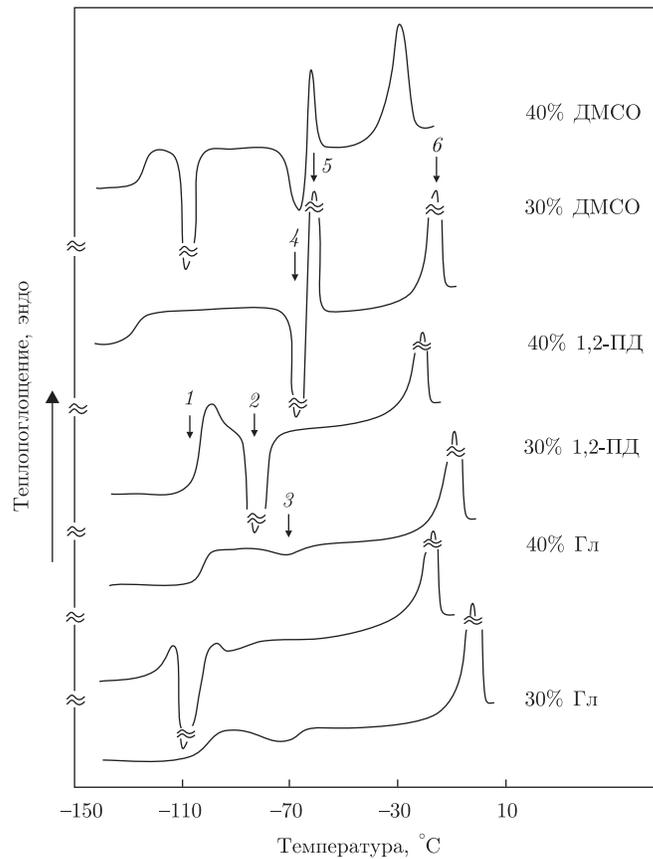


Рис. 1. ДСК термограммы образцов плазмы в присутствии криопротекторов. Стрелками показаны характерные скачки теплопоглощения, эндо- и экзотермические эффекты [3, 4]: 1 — расстеклование (T_g); 2 — кристаллизация из аморфной фазы (T_{c1}); 3 — завершение кристаллизации льда при нагреве (T_{c2}); 4 — кристаллизация эвтектических составов (T_{ce}); 5 — плавление эвтектических составов (T_{me}); 6 — плавление всей системы (T_m)

Материалы и методы. Кровь получали из сосудов последа (плаценты и пуповины) после рождения ребенка и отделения его от матери. Цельную кордовую кровь центрифугировали 5 мин при 800 g и собирали плазму. Готовили растворы концентраций: 20, 40, 60, 80% 1,2-ПД и глицерина, 20, 40, 50, 60, 80, 90% ДМСО на физиологическом растворе весовым способом. Погрешность концентрации не превышала $\pm 0,1\%$. Плазму кордовой крови смешивали с растворами 1,2-ПД, глицерина и ДМСО в соотношении 1 : 1.

Исследования низкотемпературных фазовых переходов и стеклования в области температур $0 \div -196$ °C проводили на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК), разработанном в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [3]. Охлаждение всех образцов осуществляли путем погружения в жидкий азот. При этом средняя скорость охлаждения составляла $3,3(3)$ °C/с. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью $8,3(3) \cdot 10^3$ °C/с. Погрешность измерения температуры составляла $\pm 0,2$ °C.

Результаты и их обсуждение. ДСК термограммы плазмы кордовой крови с растворами 1,2-ПД, глицерина и ДМСО в конечной концентрации 30 и 40% приведены на рис. 1. Температуры фазовых переходов и стеклования во всех исследованных образцах плазмы сведены в табл. 1. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что во всех систе-

мах после охлаждения до низких температур формируются стеклообразные включения, на что указывает скачок теплопоглощения. Этот факт указывает на наличие метастабильной фракции в охлажденном образце. Дальнейший нагрев приводит при определенной температуре к развитию кристаллизации льда. В зависимости от концентрации криопротектора кристаллизация носит разный характер. На термограммах ДСК образцов плазмы с 10–30% Гл или 1,2-ПД регистрируется размытый экзотермический эффект (3), соответствующий завершению процесса кристаллизации на этапе нагрева (T_{c2} , см. рис. 1, табл. 1). В образцах, содержащих ДМСО в тех же концентрациях, пик 3 не регистрируется. Интенсивный пик кристаллизации из аморфной фазы регистрируется на термограммах ДСК плазмы с 40% всех трех исследованных криопротекторов (T_{c1} , см. рис. 1, табл. 1). При более низких концентрациях криопротекторов процесс кристаллизации льда из переохлажденной аморфной фазы в этом температурном диапазоне не развивается. При характерной для каждого образца температуре наблюдается интенсивный эндотермический пик 6 плавления льда в системе (T_m , см. рис. 1, табл. 1).

В образцах плазмы с растворами ДМСО интенсивность пиков кристаллизации (T_{ce}) и плавления (T_{me}) эвтектических составов в значительной степени меняется с концентрацией криопротектора (см. рис. 1, табл. 1). На термограммах ДСК плазмы с 10 и 45% ДМСО эвтектические процессы не регистрируются, в то время как в водном растворе ДМСО соответствующих концентраций наблюдаются интенсивные пики кристаллизации и плавления эвтектических составов [5]. В присутствии 20–40% ДМСО в образцах плазмы тепловые эффекты кристаллизации и плавления эвтектических составов менее интенсивны, чем в водных растворах ДМСО [5]. Указанные отличия обусловлены наличием в системе биологических компонентов, существенно влияющих на состояние воды в растворе.

Сравнение количества сформировавшейся стеклообразной фазы для всех исследованных нами образцов, проведенное посредством анализа интенсивности скачка теплопоглощения 1 при расстекловании (рис. 2), показало, что в присутствии криопротекторов в конечной концентрации 10% интенсивность расстеклования в образцах плазмы с 1,2-ПД, Гл и ДМСО отличается незначительно. Повышение концентрации криопротекторов приводит

Таблица 1. Температуры фазовых переходов и стеклования в образцах, содержащих плазму и растворы криопротекторов, °С

Криопротектор	Концентрация криопротектора, %	T_g	T_{c1}	T_{c2}	T_{ce}	T_{me}	T_m
—	0	—	—	—	—	—	–1
1,2-ПД	10	–102	—	–73,2	—	—	–8,7
	20	–104,6	—	–76,3	—	—	–20,4
	30	–107,5	—	–71	—	—	–32
	40	–104,5	–84,2	—	—	—	–34,9
Глицерин	10	–100	—	–71,4	—	—	–7
	20	–102	—	–74,3	—	—	–18
	30	–100	—	–72,5	—	—	–20
	40	–116,3	–112	—	—	—	–34,8
ДМСО	10	–123,8	—	—	—	—	–9,4
	20	–125	—	—	–71,3	–65	–15,4
	25	–126	—	—	–74,2	–64	–23,3
	30	–127	—	—	–74,2	–63,7	–41
	40	–123,8	–110	—	–71,4	–63,1	–57
	45	–128,5	–91,5	—	—	—	–74,8

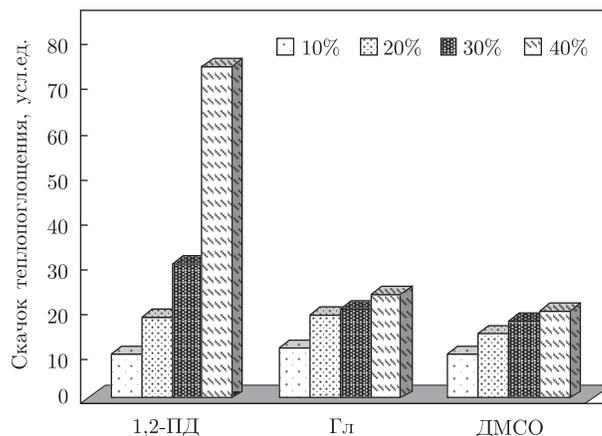


Рис. 2. Скачок теплопоглощения при стекловании в образцах плазмы кордовой крови с добавками криопротекторов

к возрастанию скачка теплопоглощения для всех образцов, однако рост интенсивности процесса расстеклования значительно более выражен в присутствии 1,2-ПД. Так, при увеличении концентрации 1,2-ПД в 4 раза, интенсивность скачка теплопоглощения *1* возрастает в 7 раз, в то время как при аналогичном росте концентрации глицерина и ДМСО скачок теплопоглощения увеличивается примерно в 2 раза. Этот факт свидетельствует о формировании большего количества стеклообразной фазы в образцах плазмы с 1,2-ПД, чем с Гл и ДМСО в тех же концентрациях.

Таким образом, в образцах плазмы кордовой крови при смешении с растворами 1,2-ПД стабильность аморфного состояния выше, чем при смешении с растворами глицерина и ДМСО. Процесс кристаллизации из аморфной фазы развивается в плазме с 40% всех трех исследованных криопротекторов. В системах, содержащих ДМСО, зарегистрированы процессы кристаллизации и плавления эвтектических составов. Однако развитие этих процессов в образцах плазмы значительно менее выражено по сравнению с водными растворами ДМСО аналогичных концентраций. Этот факт говорит о значительном ингибирующем влиянии белков плазмы на процессы кристаллизации и плавления эвтектических составов.

1. *Липина О. В., Прокоток О. С., Савченко Ю. А.* К вопросу о криоконсервировании плазмы кордовой крови // Пробл. криобиологии. – 2000. – № 4. – С. 83–84.
2. *Дунаевская А. В.* Влияние спермальной плазмы, кордовой сыворотки и сыворотки крови человека в среде криоконсервации на сохранность криоконсервированных спермиев // Там же. – 2000. – № 3. – С. 44–49.
3. *Зинченко А. В.* Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур $-150\text{ }^{\circ}\text{C} - 0\text{ }^{\circ}\text{C}$: Автореф. дис. ... канд. физ-мат. наук. – Киев, 1983. – 20 с.
4. *Зинченко А. В., Боброва Е. Н., Щетинский М. И.* Влияние глицерина и 1,2-пропандиола на фазовые переходы и стеклование в суспензии эритроцитов кордовой крови при температуре ниже $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ // Доп. НАН України. – 2003. – № 12. – С. 155–160.
5. *Зинченко А. В., Боброва Е. Н.* Кристаллизация и плавление эвтектик при нагреве замороженных суспензий эритроцитов в присутствии диметилсульфоксида // Материалы IV Всеукр. науч.-техн. конф. “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии “БФФХ – 2008”. – Севастополь, 2008. – С. 13–16.

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков*

Поступило в редакцию 19.03.2010

Physical processes in cord blood plasma in the presence of 1,2-propanediol, glycerol, and dimethyl sulfoxide below 0 °C

Glass transition, crystallization and melting in cord blood plasma at the addition of 1,2-propanediol, glycerol, and dimethyl sulfoxide under low and medium concentrations in the temperature interval 0–196 °C have been investigated by the method of differential scanning calorimetry. It was revealed that the stability of the amorphous glassy state is higher when cord blood plasma is mixed with 1,2-propanediol solutions, than that under mixing with glycerol and dimethyl sulfoxide solutions of the same concentration. Ice crystallization from the amorphous phase during heating the frozen samples has been observed in the system under concentrations of all the investigated cryoprotectants over 40%. Eutectic crystallization and melting are recorded in the dimethyl sulfoxide-containing systems.