

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ЩЕТИНСКИЙ Мирослав Игоревич

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КРИОПРОТЕКТОРОВ
С КОМПОНЕНТАМИ РАСТВОРОВ И БИОЛОГИЧЕСКИМИ
СИСТЕМАМИ МЕТОДОМ ЯМР

03.00.22 - криобиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Харьков - 1992



Работа выполнена в Институте проблем
и криомедицины АН Украины

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук В.Д.Зинченко

Официальные оппоненты: доктор биологических наук М.И.Шраго

доктор химических наук Е.Е.Заев

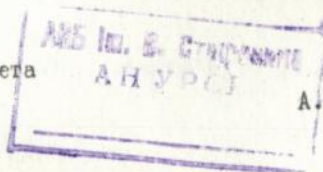
Ведущая организация: Институт биокolloидной химии АН Украины

Защита состоится "17" ноября 1992 года в "13³⁰" час на заседании специализированного совета Д 016.60.01 при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины (310015, г.Харьков, улица Перейславская, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины.

Автореферат разослан "8" октября 1992 г.

Ученый секретарь
специализированного совета
доктор медицинских наук



А.Н.Гольцев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В существующих в настоящее время методических приемах криоконсервирования биологических объектов, их сохранность и перспективы дальнейшего использования в значительной степени определяются эффективным подбором криопротектора (Белоус А.М., 1979; *Mazur P.*, 1981; Аграненко В.А., 1983).

Среди физико-химических характеристик криопротекторов, определяющих их защитное действие, важную роль играют водородные связи криозащитного вещества с водой и с компонентами биологических систем (*Doebbler G.*, 1962; *Nash T.*, 1966).

Методом ядерного магнитного резонанса на протонах ($^1\text{H-NMR}$) было установлено (Моисеев В.А., 1984), что водородные связи способствуют формированию сольватной оболочки вокруг биомакромолекул из молекул воды и криопротектора, что препятствует стерическому сближению макромолекул при замораживании и их необратимым повреждениям. Кроме того, коллективный характер водородных связей между водой и криозащитным веществом оказывает влияние на фазовые переходы в системе и способствует стеклованию раствора при низких температурах (Зинченко А.В., 1984). Способность молекул образовывать водородные связи определяется наличием в них гидрофильных центров, таких как: гидроксильная, амидная, сульфоксидная, карбоксильная и других групп. Исследования последних лет показали (Линник Т.П., 1986; Пичугин Ю.И., 1988; Кошич С.В., 1992), что перспективной является разработка криозащитных веществ с гидрофильными центрами различных типов, однако работы в этом направлении единичны, а методом ЯМР детальный анализ водородных связей проводился только в водных растворах ряда полиэтиленгликолей (Манк В.В., 1974; Зинченко В.Д., 1978). Следовательно, актуальность исследований водородных связей определяется, прежде всего, проблемой разработки новых криозащитных веществ.

Важным аспектом взаимодействия криопротекторов с биологическими объектами на уровне клеток является распределение криозащитных веществ между клеткой и средой. Такие традиционные методы как радиоизотопный (Трошин А.С., 1985), светорассеивания (*Levitt D.G.*, 1983), химический и осмотический (Никольский Н.Н., Трошин А.С., 1973) не всегда позволяют однозначно интерпретировать полученные результаты при исследовании одновременного распределения нескольких экзогенных веществ между клеткой и средой. В связи с этим

разработка новых неразрушающих методических подходов оценки трансмембранного распределения многокомпонентных растворов актуальна как с научной точки зрения, так и в связи с практическими задачами отмывания криопротекторов и удаления их из клеток.

Целью настоящей работы явилось исследование методом ЯМР межмолекулярных взаимодействий в биологических системах и в растворах криопротекторов, имеющих разные гидрофильные центры и распределения криопротекторов между клеткой и средой.

Задачи исследования:

1. На основании анализа химических сдвигов и интенсивностей сигналов ЯМР оценить влияние белков и солей на протонную подвижность и невымерзающий компонент воды в растворах широко применяемых криопротекторов.

2. Изучить температурные и концентрационные зависимости химических сдвигов сигналов ЯМР в водных растворах амидных соединений с целью анализа межмолекулярных взаимодействий и оценки соответствия исследуемых свойств тем критериям криозащитного действия, которые были обнаружены у широко применяемых криопротекторов.

3. Разработать способ оценки распределения криопротекторов между внутри- и внеклеточной средой эритроцитов методом ЯМР-спектроскопии и оценить взаимное влияние на перераспределение проникающих и непроникающих криозащитных веществ.

4. Исследовать процесс вымораживания и оценить количество невымерзшей воды в обладающих различной устойчивостью к холоду некоторых объектов растительного происхождения и в куколках насекомых для выявления общих закономерностей поведения воды при низких температурах в живых системах, устойчивых к холоду и искусственно создаваемых путем введения криопротекторов.

Научная новизна. Впервые проведено исследование методом H^{I} -ЯМР водных растворов криопротекторов, имеющих разные гидрофильные центры, межмолекулярных взаимодействий с компонентами растворов и биологическими системами и определяющих особенности поведения системы при температурах ниже 0°C . Определена структура межмолекулярных водородных связей, характер вымораживания и количество связанной воды. Установлено влияние на исследуемые параметры добавок NaCl и альбумина. Впервые обнаружено влияние сывороточного альбумина человека (САЧ) на скорость протонного обмена между водой

и гидроксильными группами глицерина, которое при указанных условиях свидетельствует о взаимодействии глицерина не только со свободной водой, но и с фракцией воды, связанной с белком.

Разработан и защищен авторским свидетельством № I642342 способ оценки проникновения веществ в эритроциты человека. Определены коэффициенты распределения криопротекторов: ПЭГ-1500, ДМСО, ЭГ между внутри- и внеклеточной средой эритроцитов.

Установлено существование корреляции между характером вымораживания воды в биообъектах, естественно - устойчивых к холоду и свойствами воды в системах, создаваемых искусственно при введении криозащитных веществ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные в работе исследования позволили создать последовательную программу изучения методом N^1 -ЯМР новых криопротекторов, этапами которой являются: исследование структуры их водных растворов, характера вымораживания воды, способности влиять на протонную и молекулярную подвижность в системе, а также распределения криопротекторов между внутри- и внеклеточной средой. Показано, что гидратационные свойства формамида и N -метилацетида близки к тем, которые характерны для широко применяемых криопротекторов. Следовательно ФА и N -МАЦ могут быть использованы для синтеза на их основе новых криозащитных веществ.

Разработанный способ оценки проникновения веществ был апробирован на эритроцитах человека, но может быть применен и для других клеточных суспензий.

Автор защищает:

1. Результаты анализа протонной подвижности в растворах глицерина с добавками САЧ и гидратации в растворах полиэтиленгликолей в присутствии белка, $NaCl$ и в растворах амидов.

2. Способ оценки распределения криопротекторов между внутри- и внеклеточной средой эритроцитов методом ЯМР.

3. Существование корреляции между характером вымораживания воды в системах, создаваемых искусственно при введении криозащитных веществ и свойствами воды в биообъектах, естественно - устойчивых к холоду.

Публикация материалов исследования

По теме диссертации опубликовано 12 работ, получено авторское свидетельство на изобретение, зарегистрировано 2 рационализатор-

ских предложения.

Апробация работ

Основные результаты диссертационной работы докладывались на конференциях молодых ученых ИПКИК АН Украины (1987-1990 г.г.), 6 Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров (Харьков, 1988), 4 Всесоюзной конференции по химии низких температур (Москва, 1988), 3 Всесоюзной конференции по проблемам физиологии древесных растений (Петрозаводск, 1989), *PIVRAĆ CONFERENCE ON CHEMICAL THERMODYNAMICS, Como, Italy*, 1990), 8 Всесоюзной конференции "Магнитный резонанс в биологии и медицине" (Звенигород, 1990), 7 Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров (Харьков, 1991).

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, разделов, отражающих результаты собственных исследований, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 3 таблицами. Библиография включает 126 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на спектрометре ЯМР высокого разрешения "TESLA BS-567 A" (Чехословакия) с рабочей частотой 100 МГц для ядер водорода. Точность поддержания температуры в образце составляла $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Внешним эталоном служил раствор ацетона в четыреххлористом углероде или тетраметилсилан (ТМС) в калиброванных запаянных капиллярах диаметром 200 мкм. В качестве внутреннего стандарта нами использовались: сигнал метиленовой группы глицерина и группы $\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{N}$ - метилацетамида. Воспроизводимость интеграла в пяти последовательных записях на самописце составляла $\pm 2\%$.

В качестве криопротекторов использовали полиэтиленгликоли ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 фирмы "Merck" и "Fluka" квалификации "Purum"; диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и этиленгликоль (ЭГ) - отечественного производства (хч). В исследованиях также использовали лиофилизированный сывороточный альбумин человека (САЧ) фирмы "Reanal" и в качестве потенциальных криопротекторов или материала для дальнейшего синтеза на их основе - формамид (ФА) и *N*-метилацетамид (*N*-МАЦ), синтезированные и очищенные в отделе криопротекторов ИПКИК АН Украины. В экспериментах по протонному обмену использовали тяжелую воду, содержащую 99,8% D_2O .

Исследование распределения криопротекторов между клеткой и средой проводили на эритроцитах из донорской крови человека. Использовали кровь здоровых доноров Харьковской областной станции переливания крови, забранную на цитрате натрия в качестве антикоагулянта. Срок хранения крови при 4°C с консервантом "Глюглицир" не превышал 4 суток. Исследование проводили в стандартных ампулах диаметром 5 мм при температуре 20°C в условиях диффузионного равновесия. Объем исследуемого образца составлял 0,8 мл.

Для исследования оводненности древесных в качестве объектов исследования были выбраны побеги березы бородавчатой *Betula vulgaris* в качестве устойчивой к замерзанию и менее устойчивой - яблони *Malus domestica* сорта Кальвиль снежный, взятых с дерева, когда температура воздуха длительное время находилась ниже -20°C . Регидратацию побегов осуществляли в комнатных условиях, погружая побеги в воду. Жизнеспособность побегов определяли отращиванием, а гибель по побурению тканей. Опыты проводили в 3-4 кратной биологической и 3-6 кратной аналитической повторностях. В таблицах и на рисунках даны средние арифметические величины и их среднеквадратическая ошибка. При оценке достоверности использовали критерий Стьюдента при 5% уровне значимости. Стандартизация образцов проводили по размеру и сухой массе исследуемой части побега.

Куколки американской белой бабочки *Nyphanta clypea* Dr. были нам предоставлены к.б.н. Генсциким И.П. (Институт зоологии АН Украины), для исследования особенностей фазового перехода воды. Все статистическую обработку цифрового материала проводили по программе Stat, разработанной на ВЦ ИПКИК АН Украины.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярная подвижность и протонный обмен в водных растворах глицерина и ПЭГ-400.

Частоты ориентационной и трансляционной подвижности молекул являются показателем, на основании которого можно судить о степени связанности различных фракций воды в растворах. В настоящей работе на основании исследования межмолекулярного протонного обмена изучали молекулярную подвижность в системе: глицерин - D_2O с добавками сывороточного альбумина человека.

Как видно из рис. I, в бинарной системе D_2O -глицерин с массовым отношением компонентов 1:9 при $\text{pH}=6,6$ сигналы H_2O и OH-групп регистрируются раздельно во всем исследованном диапазоне темпера-

тур. Причем зависимость химического сдвига от температуры $\delta=f(T)$ линейна для обоих сигналов, что характерно для систем с водородными связями.

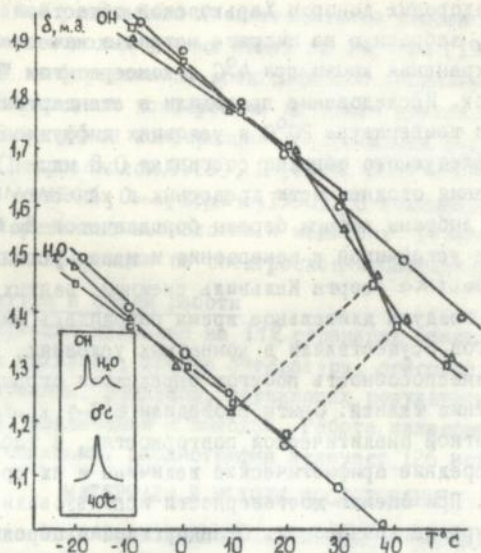


Рис.1. Зависимости химических сдвигов сигналов N^I -ЯМР H_2O и OH -групп от температуры в системе глицерина с D_2O , масс. отношение компонентов 9:1.

○ - смесь глицерин - D_2O ;

Δ - система глицерин - D_2O с добавкой САЧ, 1 мг/мл

□ - после денатурации САЧ нагревом.

На вставке: фрагмент спектра ЯМР системы глицерин - D_2O , -САЧ
вверху - медленный обмен, внизу-быстрый обмен, pH=6,6

При добавлении САЧ, можно было бы ожидать замедления протонного обмена в результате увеличения вязкостных свойств системы, что выразилось бы в еще большем разделении сигналов ЯМР H_2O и OH . Однако в диапазоне температур выше $10^{\circ}C$ сигналы сливаются в один и, лишь ниже этой температуры становится возможным их раздельное наблюдение. Следовательно, протонный обмен в присутствии САЧ ускоряется. Время протонного обмена при температуре слияния сигналов H_2O и OH составляло около 10^{-3} сек. Если САЧ подвергнуть тепловой

денатурации путем нагрева раствора до 100°C , то сигналы ЯМР H_2O и OH -групп наблюдаются раздельно при температурах ниже 20°C . Следовательно, в присутствии денатурированного белка обмен ускоряется в меньшей степени, чем с нативным белком.

При отклонении от значения $\text{pH} = 6,6$ как в кислую, так и в щелочную область, протонный обмен ускорялся и сигналы ЯМР H_2O и OH -групп наблюдались слитно во всем исследованном температурном диапазоне. На основании полученных результатов была построена схема элементарного акта протонного обмена, состоящего из двух стадий. Первая стадия представляет собой образование активированного водородно-связанного комплекса вода - глицерин, вторая - перенос протона по цепочке водородных связей. Скорость всего процесса обмена определяется первой, более медленной стадией, которая в свою очередь лимитируется частотами ориентационных и трансляционных движений обменивающихся центров.

Анализ значений производной $d\delta/dT$, которая является мерой количества и прочности водородных связей в системе или степени вовлеченности исследуемой функциональной группы в межмолекулярные водородные связи, показал, что наиболее низкая величина $d\delta/dT$ для сигнала ЯМР H_2O наблюдается в системе с денатурированным белком. Это обусловлено, вероятно, разворачиванием макромолекулы САЧ, в результате чего становятся доступными растворителю гидрофобные группы белка и изменяется структура ближнего гидратного слоя.

Таким образом, обнаруженные нами изменения в скорости обмена протонов в присутствии белка при неизменном pH могут служить еще одним доказательством того, что связанная с белком вода представляет собой сложную фазу и что глицерин взаимодействует не только со свободной водой, но и с фракцией связанной с белком воды. Поскольку в криобиологических системах в реальных условиях всегда присутствуют соли, то представляет интерес изучение влияния ионов на связанную воду. В работе исследовали фракцию подвижной воды в системе ПЭГ-400 - САЧ - NaCl при температуре ниже точки заморозания основной массы растворителя. Анализ зависимостей относительной интегральной интенсивности сигнала ЯМР H_2O от концентрации САЧ при фиксированных концентрациях ПЭГ-400 и NaCl показал, что в присутствии криопротектора увеличивается количество неизмерзающего компонента воды. Однако при конкурентном связывании соли с криопротектором и белком аддитивности вкладов гидратаций компонен-

тов раствора в суммарное количество связанной воды не наблюдается. Отсюда видно, что в сложном криозащитном растворе взаимное влияние центров гидратации происходит как по механизмам водородных связей, так и в результате электростатического взаимодействия компонентов раствора с заряженными центрами.

Таким образом, количество невымораживающей воды в сложной биологической системе, содержащей криопротектор и соли, теоретически предсказать сложно и ее нахождение в каждом конкретном случае должно проводиться экспериментально.

Исследование межмолекулярных водородных связей в водных растворах амидных соединений.

Водородные связи в растворах формамида и *N*-метилацетамида исследовали с целью сопоставления межмолекулярных взаимодействий в этих системах с аналогичными характеристиками в растворах широко применяемых криопротекторов. Использовали методические приемы, подобные описанным выше: анализ температурных и концентрационных зависимостей химических сдвигов сигналов ЯМР, их интенсивностей и производных $d\delta/dT$.

Температурные зависимости химических сдвигов сигналов ЯМР H_2O и *NH*-групп в *N*-МАЦ в широком диапазоне фиксированных концентраций (10+80%) линейны, что характерно для систем с водородной связью. Однако, при малых концентрациях *N*-МАЦ (10+30%), когда в растворе содержится значительное количество свободной воды, при температурах ниже $-15^{\circ}C$ наблюдается излом в область сильных полей, как для сигналов ЯМР H_2O , так и для групп *NH*. Такой характер зависимостей химических сдвигов от температуры связан с проявлением анизотропии экранирования протонов при вымораживании основной части свободной воды в результате возникновения заторможенных движений. Симпатный характер изменений химических сдвигов сигналов ЯМР указывает на то, что между группами *NH* и молекулами H_2O существуют межмолекулярные водородные связи.

Для установления стехиометрии водородных связей проводили анализ производной $d\delta/dT$.

Из рис.2 видно, что зависимость $d\delta/dT$ от концентрации имеет экстремальный характер для обоих сигналов, достигая максимума при соотношении компонентов 3 моля H_2O на 1 моль *N*-МАЦ. На основании этого можно сделать вывод, что при этой концентрации молекулы H_2O и *N*-МАЦ максимально вовлечены в межмолекулярные водородные

связи и, следовательно, такое соотношение компонентов должно быть близко к числу гидратации N -МАЦ.

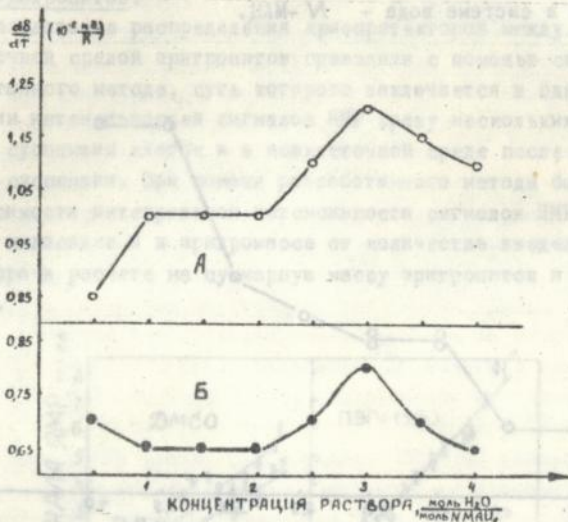


Рис. 2. Зависимость производной $d\delta/dT$ сигналов ЯМР H_2O /А/ и $>NH/B/$ от концентрации водного раствора N -МАЦ.

Другой способ определения числа гидратации N -МАЦ заключался в анализе интенсивности сигнала ЯМР незамерзавшего компонента воды. Температурные зависимости интегральной интенсивности сигнала ЯМР H_2O в растворах N -МАЦ при разных концентрациях показали, что при малых количествах воды (0,5 моля H_2O на 1 моль N -МАЦ) общее количество подвижной фракции воды не меняется вплоть до $-40^\circ C$. Это указывает на то, что молекулы H_2O вовлечены в водородные связи с N -МАЦ и кристаллы льда в системе не образуются.

На основании измерений интенсивности сигнала ЯМР воды при $-50^\circ C$ нами было найдено количество невымерзшей воды при этой температуре в растворах различных концентраций (рис.3).

Из рисунка видно, что при концентрациях около 3 молей H_2O на 1 моль N -МАЦ и выше нормированное на моль N -МАЦ количество невымерзавшей воды уже не зависит от концентрации раствора. Это

значение хорошо согласуется с найденным выше числом гидратации из анализа производной $d\delta/dT$ и может быть принято, как количество связанной воды в системе вода - N-МАЦ.

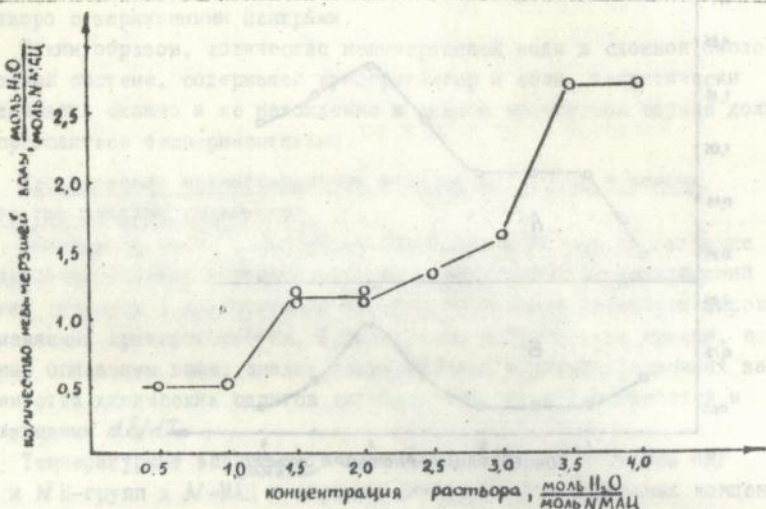


Рис. 3. Зависимость количества невымёрзшей воды при температуре -50°C от концентрации водного раствора N-МАЦ.

Такой же методический подход был использован для водных растворов формамида, имеющего другой гидрофильный центр - амидную группу $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-$. Было найдено, что число гидратации, соответствующее максимальной вовлеченности молекул в водородные связи соответствует концентрации 3,5 моля H_2O на I моль ФА. Найденные числа гидратации близки к аналогичным характеристикам таких широко употребляемых криопротекторов, как полиэтиленгликоли. Следовательно, соединения с функциональными группами $>\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ согласно их характеристикам гидратации могут быть использованы для создания криопротекторов на их основе. При этом синтез криозащитных соединений должен быть направлен на то, что добиться снижения токсичности, одновременно с незначительным изменением гидратационных свойств. Это возможно путем оксиэтилирования, поскольку гидратация будет определяться атомами эфирного кислорода оксиэтильных звеньев, а вклад концевых групп будет незначителен, как это

наблюдается при наращивании числа звеньев у полиэтиленгликолей.

Распределение криопротекторов между внутри- и внеклеточной средой эритроцитов.

Исследование распределения криопротекторов между внутри- и внеклеточной средой эритроцитов проводили с помощью специально разработанного метода, суть которого заключается в одновременном измерении интенсивностей сигналов ЯМР сразу нескольких веществ в плотной суспензии клеток и в межклеточной среде после центрифугирования суспензии. При помощи разработанного метода были рассчитаны зависимости интегральной интенсивности сигналов ЯМР криопротекторов в надсадке и в эритромассе от количества введенного криопротектора в расчете на суммарную массу эритроцитов и надсадку (рис.4).

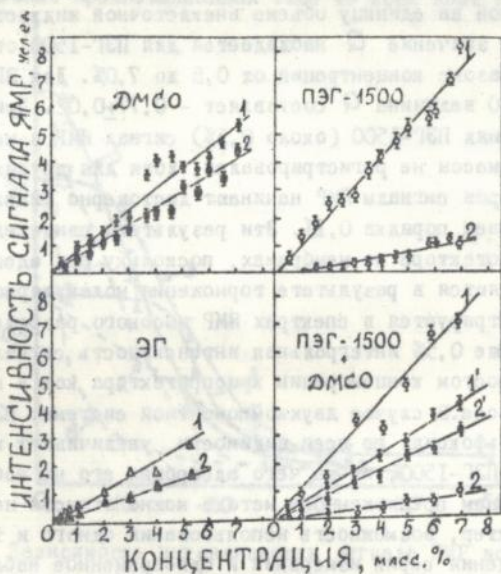


Рис.4. Зависимости интегральной интенсивности сигналов ЯМР функциональных групп криопротекторов от их концентрации в расчете на суммарную массу суспензии эритроцитов: ДМСО, ЭГ, ПЭГ-1500, смеси ДМСО и ПЭГ-1500.

1, 1' - надсадок; 2, 2' - эритромаassa.

Видно, что интегральная интенсивность сигналов ЯМР криопротекторов внутри- и в межклеточном пространстве эритромаcсы меньше, чем для криопротекторов, находящихся в надосадке. В случае непроницающего криопротектора ПЭГ-1500 различия сильнее: количество криопротектора в надосадочной жидкости примерно в 7 раз превышает его количество в эритромаcсе. Если в системе присутствуют одновременно ПЭГ-1500 и ДМСО, то в этом случае интегральная интенсивность сигналов ЯМР для высокомолекулярного криопротектора больше низкомолекулярного в надосадке и меньше в эритромаcсе во всем диапазоне концентраций.

Исходя из зависимостей интегральных интенсивностей от концентрации были вычислены коэффициенты распределения Q для всех исследуемых веществ, равные отношению концентрации криопротектора, нормированной на единицу объема внутриклеточной жидкости, к концентрации, нормированной на единицу объема внеклеточной жидкости. В этом ряду минимальное значение Q наблюдается для ПЭГ-1500 от $0,09$ до $0,14 \pm 0,02$ в диапазоне концентраций от $0,5$ до $7,0\%$. Для ЭГ - $0,56 \pm 0,02$, а для ДМСО величина Q составляет - $0,77 \pm 0,02$. При этом при малых концентрациях ПЭГ-1500 (около $0,5\%$) сигнал ЯМР в межклеточной среде эритромаcсы не регистрировался, хотя для других проникающих криопротекторов сигналы ЯМР начинают достоверно фиксироваться уже с концентрацией порядка $0,1\%$. Эти результаты свидетельствуют об адсорбции криопротектора на мембранах, поскольку при адсорбции сигналы ЯМР ушிரяются в результате торможения молекулярной подвижности и не регистрируются в спектрах ЯМР высокого разрешения. При концентрациях выше $0,5\%$ интегральная интенсивность сигнала ЯМР начинает расти с ростом концентрации криопротектора как в надосадке, так и в эритромаcсе. В случае двухкомпонентной системы: ПЭГ-1500-ДМСО, диметилсульфоксид, по всей видимости, увеличивает молекулярную подвижность ПЭГ-1500, из-за чего адсорбция его не наблюдается.

К достоинствам предложенного метода можно отнести неповреждающий его характер, возможность использования одного и того же образца для проведения серий измерений и одновременное наблюдение сигналов ЯМР функциональных групп различных криопротекторов, присутствующих в системе.

Гидратационные параметры естественно-устойчивых к холоду объектов растительного происхождения и куколок насекомых

Для выявления общих закономерностей поведения воды при низких температурах в живых системах, устойчивых к холоду и искусственно

создаваемых, путем введения криопротекторов, в работе исследовались температурные зависимости интегральной интенсивности сигналов ЯМР воды побегов березы бородавчатой и яблони сорта Кальвиль снежный, обладающих различной холодоустойчивостью. На рис.5 показаны зависимости интенсивности сигнала ЯМР воды от температуры в побегах березы в устойчивом к холоду состоянии (1,2); яблони, менее устойчивой к холоду (3,4) и березы в состоянии вегетации (5,6), когда побеги легко повреждаются холодом.

Различия в температурах начала кристаллизации и разная величина падения интегральной интенсивности сигнала H^I -ЯМР воды в момент начала кристаллизации свидетельствует о различном количестве слабо-связанной воды. Видно, что чем более устойчивы побеги к холоду, тем выше отношение прочносвязанной воды ко всей воде в растениях (рис.5)

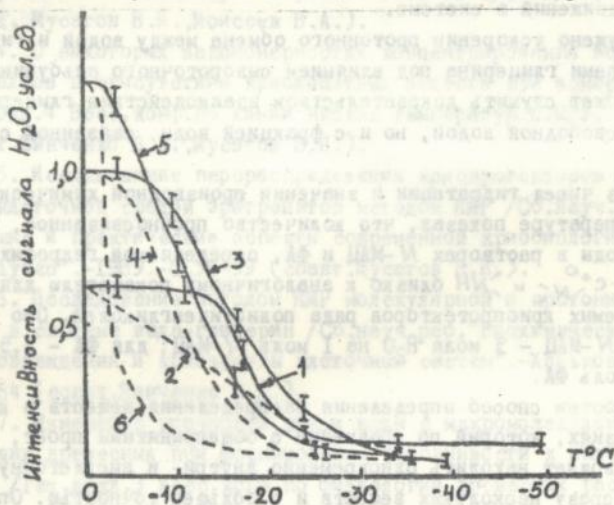


Рис.5. Зависимость интенсивности сигнала ЯМР воды от температуры у побегов березы и яблони.

1,2 - побеги березы, взятые непосредственно с дерева,

3,4 - побеги яблони, взятые непосредственно с дерева,

5,6 - побеги березы после отращивания в комнатных условиях.

(1,3,5 - охлаждение; 2,4,6 - отогрев).

Аналогичная закономерность наблюдалась в куколках американской белой бабочки *Hyalantzia Cunea* Dr., которые способны переносить более низкие температуры, чем в активном состоянии бабочки.

Таким образом, здесь наблюдается та же закономерность, что и в случае искусственной криозащиты, т.е. увеличение пула связанной воды в объекте по отношению к общей воде в устойчивом к холоду состоянии.

ВЫВОДЫ

1. Методом N^1 ЯМР исследована молекулярная подвижность глицерина в системе вода-глицерин, оценены времена протонного обмена между молекулой H_2O и гидроксильной группой глицерина при различных рН. Результаты объясняются на основании двухстадийной схемы обмена, согласно которой скорость всего процесса определяется скоростью молекулярных движений в системе.

2. Обнаружено ускорение протонного обмена между водой и гидроксильными группами глицерина под влиянием сывороточного альбумина человека, что может служить доказательством взаимодействия глицерина не только со свободной водой, но и с фракцией воды, связанной с белком.

3. Анализ чисел гидратации и значений производной химического сдвига по температуре показал, что количество прочносвязанной, невымораживающей воды в растворах *N*-МАЦ и ФА, определяемой гидрофильными центрами: $-C^{\circ}N < \text{и} > NH$ близко к аналогичному показателю для широко используемых криопротекторов ряда полиэтиленгликолей. Оно составляет: для *N*-МАЦ - 3 моля H_2O на 1 моль *N*-МАЦ; для ФА - 3,5 моля H_2O на 1 моль ФА.

4. Разработан способ определения распределения веществ в клеточных суспензиях, который по сравнению с общепринятыми прост, безопасен и позволяет находить одновременно внутри- и внеклеточную концентрацию сразу нескольких веществ и с большей точностью. Определены коэффициенты распределения (Q) ряда криопротекторов в эритроцитах человека, которые составляют в диапазоне концентраций от 0,5 до 7,0%: для ПЭГ-1500 - от 0,09 до 0,14 \pm 0,02; для ЭГ - 0,56 \pm 0,02; для ДМСО - 0,77 \pm 0,02.

5. Установлена корреляция между характером вымораживания воды в системах, с искусственно созданной холодустойчивостью путем введения криозащитных веществ и свойствами воды в биологических объектах, естественно-устойчивых к холоду. В обоих случаях наблюдается

существование значительной фракции прочносвязанной воды по отношению ко всей воде в объекте исследования.

Список опубликованных работ по теме диссертации

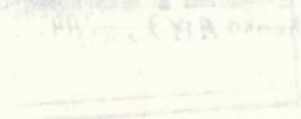
1. А.с.1642342, МКИ ОI 24/ 08, 33/ 483 Способ оценки проникновения веществ в клеточные суспензии (соавт. Зинченко В.Д., Мусатов В.И., Моисеев В.А.). Оубл. 15.04.91 Бюл. № 14.
2. О состоянии воды в мультислойных липосомах из яичного лецитина /Тез. докл. 6 Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров. Харьков.-1988.-С.136-138 (соавт. Зинченко А.В., Дегтярев А.В., Леонов Б.Н.).
3. О влиянии сывороточного альбумина человека на протонный и изотопный обмен в системе D₂O-глицерин /Тез. докл. 6 Всес. конф. по спектроскопии биополимеров. Харьков.-1988.-С.138-139. (соавт. Зинченко В.Д., Мусатов В.И., Моисеев В.А.).
4. О некоторых закономерностях концентрирования водных растворов белков в присутствии криозащитных веществ при замораживании /Тез. докл. 4 Всес. конф. по химии низких температур. М. МГУ.-1988.-С. 174. (соавт. Зинченко В.Д., Мусатов В.И.).
5. Исследование перераспределения криопротекторов между внутри- и внеклеточной средой эритроцитов методом ЯМР /Сб. науч. раб. "Теоретические и практические аспекты современной криобиологии".-Киев: Наук. думка".-1989.-С.36-39 (соавт. Мусатов В.И.).
6. Исследование методом ЯМР молекулярной и протонной подвижности в системе вода-глицерин /Сб. науч. раб. "Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем".-Харьков.-1989. -С.58-64 (соавт. Зинченко В.Д.).
7. Изменение прочности связи воды с макромолекулами у тканей зимующих древесных при формировании устойчивости к низким температурам /Тез. докл. 3 Всес. конф. по физиологии древесных растений.-Петрозаводск.-1989.-С.36-37 (соавт. Мануильский В.Д., Пачепская Л.Б., Зинченко В.Д.).
8. Состояние воды в куколках насекомых при температурах ниже 0°C по данным метода ЯМР и холодовые повреждения /Тез. докл. 8 Всес. конф. "Магнитный резонанс в биологии и медицине". Звенигород.-1989.-С.238 (соавт. Зинченко В.Д., Генсикский И.П.).
9. Peculiarities of phase transitions of water in multilayer liposomes / 11th IUPAC CONFERENCE ON CHEMICAL THERMODYNAMICS, Como, Italy, 1990. (Zinchenko V.D.) p. 14.

10. ЯМР исследования фазового перехода воды у куколок американской бабочки *Hypanthaia Cunea* Dr. при низких температурах /Сб. науч. тр. "Влияние охлаждения на биологические объекты". Харьков.-1990.-С.22-24 (соавт. Генюцкий И.П., Зинченко В.Д., Моисеев В.А.).

11. О межмолекулярных взаимодействиях в водных растворах амидов /Сб. науч. тр. "Холодовой анабиоз". Киев: Наук. думка.-1991.-С.57-63 (соавт. Чеканова В.В.).

12. Протонный магнитный резонанс воды при изменениях оводненности древесных в зимний период // Физиология растений.-1991, т. 38, вып. 3.-С.552-559 (соавт. Мануильский В.Д., Зинченко В.Д., Пачепская Л.Я., Моисеев В.А.).

13. О межмолекулярных взаимодействиях в водных растворах N-метилацетамида /Сб. науч. тр. "Физико-химические процессы в криобиологических системах". Харьков.-1991.-С.165-170 (соавт. Зинченко В.Д., Чеканова В.В., Ханина Л.А.).



468441

Подп. к печ. *21.09 88* Формат 60×84¹/₁₆. Бумага тип. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1.0
Уч.-изд. л. 1.0. Тираж 110 экз. Зак. № *215* Бесплатно.

Харьковское межвузовское арендное полиграфическое предприятие,
310093, Харьков, ул. Свердлова, 115.

AB 25.949