

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

На правах рукопису

ЗІНЧЕНКО ВАСИЛЬ ДЕМИДОВИЧ

Процеси метаболізму макроергічних сполук і трансмембранного  
перенесення неелектролітів і іонів водню в умовах  
кріоконсервування

03.00.22 - кріобіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття вченого  
ступеня доктора біологічних  
наук

Харків 1994

577.21  
AB 29.787

Робота виконана в Інституті проблем проблем кріобіології  
і кріомедицини АН України

Науковий консультант:

доктор. біол. наук, професор  
лауреат Держ. премії України Моїсєєв В.А.

Офіційні опоненти:

доктор фізико-математичних наук, професор  
Малеєв В.Я.

доктор біологічних наук, ст.н.с.  
Тугай В.А.

доктор хімічних наук, професор  
Засєв Є.О.

Ведуча організація: Інститут біоколоїдної хімії АН України

Захист відбудеться " 17 " травня 1994 р. в 13.30 год  
на засіданні спеціалізованої ради Д 016.60.01 при  
Інституті проблем кріобіології і кріомедицини АН України  
/ЗІООІ5, Харків-15, вул. Переяславська, 23/

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ІПКІК АН України

Автореферат розіслано " 15 " квітня 1994 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради  
доктор медичних наук, проф.

А.М. Гольцев

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00802235 (K)

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

AB-29.787

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обмін біологічно активних речовин і їх перенесення в клітинних системах являють собою групу взаємопов'язаних явищ, що відіграють ключову роль в забезпеченні існування живої матерії. Цим визначається загальнобіологічний інтерес до вивчення процесів перенесення і обміну речовин в клітинах. Важливе місце в даній проблемі займають процеси з перетворенням матеріальних носіїв енергії в біологічних системах. Утворення метаболічного фонду цих речовин і їх утилізація залежить від функціонування складних ферментативних ансамблів, регуляція яких здійснюється через взаємозв'язок з іншими ферментами, білковими інгібіторами і активаторами ферментів. Порушення в будь-якій з ланок цих взаємопов'язаних механізмів викликає патологічні зміни в живих системах.

З іншого боку, розробка штучних способів довгострокового зберігання живої матерії тісно пов'язана із створенням умов оборотного гальмування процесів метаболізму. Таким чином, проблема вивчення процесів метаболізму і перенесення речовини поряд з її загальнобіологічним значенням дуже важлива в кріобіології.

В даній роботі досліджували процеси утилізації макроергічних сполук в еритроцитах людини і деякі супутні процеси перенесення речовин в клітинах і їх розподіл між внутрішньо- і зовнішньоклітинним середовищем на різних стадіях кріоконсервування з використанням методу ядерного магнітного резонансу. Об'єктом дослідження служили як природні метаболіти - аденозинтрифосфат (АТФ), 2,3-дифосфогліцерат (2,3-ДФГ), неорганічний фосфат (Фн), так і екзогенні речовини, що застосовуються в кріобіології як кріозахисні агенти.

Результати досліджень використовували для виявлення механізмів порушення енергетичного статусу клітин в процесі кріоконсервування. Аналізували також деякі аспекти природної холодостійкості живих систем. Одним з об'єктів в цих дослідях служили гібернучі ховрашки *Citellus Undulatus* в різних фізіологічних станах, в яких вивчали процеси утилізації макроергічних сполук в печінці. Інший аспект аналізу природної холодостійкості був пов'язаний з вивченням стану води при температурах нижче 0°C в об'єктах різного рівня

організації (рослини, личинки комах), еволюційно пристосованих до переживання субнульових температур.

В роботі було виявлено існування кореляції між особливостями фазових перетворень води в об'єктах, стійких до дії холоду і в таких, у яких здатність переносити заморожування - відтавання створена за допомогою штучних прийомів. Одержані результати дозволили сформулювати ідею про існування деяких подібностей у властивостях водного компонента живих систем при температурах нижче 0°C у випадках природного і штучного криозахисту.

#### Актуальність проблеми.

Розв'язання практичних задач кріобіології багато в чому залежить від розвитку фундаментальних досліджень структурного і функціонального стану біологічно важливих молекул і надмолекулярних комплексів, що регулюють внутрішньоклітинний метаболізм і інтеграцію фізіологічних функцій клітини в цілому. Важливим інструментом для розв'язання цих задач є дослідження впливу температури на вказані системи, оскільки температура являє собою один з найважливіших факторів регулювання біокаталізу, мембранної проникності і швидкості обміну речовин і енергії в будь-якій живій системі. В кріобіології, де створюються умови виключення активної життєдіяльності шляхом припинення обміну речовин і енергії і передбачається, щоб викликане низькою температурою інгібування життєдіяльності було цілком оборотним при поверненні до фізіологічних температур, дослідження явищ переносу і метаболізму являють собою особливий інтерес [Valeri C.R., 1976, Виноград-Финкель, 1978].

Інформація про молекулярні рухи, про дифузію і самодифузію, про транспорт речовин через клітинні мембрани, співставлення цих даних з рівнем метаболітів і їх фізіологічною функцією являють собою основу для розробки більш точних уявлень про те, як піддаються контролю і інтеграції метаболічні перетворення і фізіологічна активність в умовах криоконсервування. Цим визначається актуальність проблеми як в науковому, так і в практичному плані.

Метою даної роботи було дослідження метаболізму 2,3-дифосфогліцерату, трансмембранного перенесення іонів  $H^+$ , неорганічного фосфату і криозахисних речовин в еритроцитах людини.

на різних стадіях кріоконсервування, дослідження молекулярної рухливості в біологічних системах при температурах, нижчих від 0°C і перенесення речовини в умовах консервування біологічних об'єктів методом заморожування - висушування.

Для досягнення поставленої мети необхідно було розв'язати такі задачі:

1) дослідити швидкість деградації 2,3-ДФГ в еритроцитах на стадіях інкубації з кріопротектором, після заморожування - відтавання, після відмивання кріопротектора і перенесення еритроцитів у суспендуюче середовище;

2) дослідити зміни рН в клітинах в присутності кріопротекторів з різною проникністю через мембрани еритроцитів;

3) дослідити залежність коефіцієнта розподілу кріопротекторів між внутрішньо- і зовнішньоклітинним середовищем еритроцитів від молекулярної маси і вплив температури на розподіл кріозахисних речовин різних молекулярних мас між клітиною і середовищем;

4) на основі аналізу протонного обміну дослідити молекулярну рухливість в бінарних водних розчинах кріопротектора (гліцерину) і в розчинах гліцерину з додаванням білка (сироваткового альбуміну людини);

5) дослідити процес вимерзання води при зниженні температури і оцінити відношення пула зв'язаної води до всієї води в об'єктах з природною стійкістю до холоду і в таких, у яких кріостійкість створена штучно;

6) дослідити динаміку видалення вологи з біологічних об'єктів в процесі їх висушування з замороженого стану.

### Наукова і практична цінність.

Можна виділити декілька проблем в кріобіології, в розв'язання яких певний вклад вносить дана робота.

1. Відомо існування низькотемпературних пошкоджень, зумовлених осмотичною дегідратацією клітин, що призводить до високих (токсичних) концентрацій речовин в цитоплазмі (Levitt J., 1958; Love R.M., 1966; Meryman M.T., 1966, Mazur P., 1970. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., 1975). Ці ефекти залежать від селективної проникності клітинних мембран (Белоус А.М., Бондаренко В.А., 1978, Фаррант Дж., 1988, Де Лекер Р., Пеннінкс Ф., 1989). Дія осмотичного стресу в значній мірі пов'язана з розподілом екзогенних кріозахисних речовин

між зовнішньо- і внутрішньоклітинним середовищем (Mazur P., 1965, Rowe A.W., 1966, Karow A.M., 1969, Белоус А.М., Пушкарь Н.С., Шраго М.И., 1975). Інший аспект дії кріопротекторів і знижених температур на клітини пов'язаний із змінами доннанівської рівноваги на мембрані внаслідок перерозподілу проникаючих через мембрани іонів під дією непроникаючих речовин.

В даній роботі неруйнівним методом ЯМР-спектроскопії слідували за розподілом кріопротекторів між внутрішньо- і зовнішньоклітинним середовищем еритроцитів при різних температурах і за змінами доннанівської рівноваги на мембранах еритроцитів.

Експериментальна методика, що використовувалась, дозволила спостерігати за динамікою змін доннанівської рівноваги в процесі інкубації клітин в різних захисних середовищах, після заморожування - відтанення, після відмивання кріопротектора. Одержані експериментальні дані про вплив екзогенних речовин на доннанівську рівновагу розширюють наші уявлення про адаптацію клітин до холоду і про дію кріопротекторів.

2. Існування в біологічних системах води, що не кристалізується, відноситься до числа факторів забезпечення резистентності до низьких температур окремих клітин, субклітинних структур і біополімерів (Merzhan H.T., 1958, Mazur M. et al., 1966, Luyet B., 1966, Simatos D., Faure M. et al., 1975, Boutron P., Kaufman A., 1979, Аксенов С.И., 1977, Фаррант Дж., 1988).

Одна з гіпотез, висунутих для пояснення кріорезистентності, базується на уявленнях про компартментацію клітинної води і про існування фракцій води з різним ступенем зв'язаності. В таких системах вода або сильно переохолоджується при температурах нижче 0°C, або частина її не переходить у кристалічний стан (Kuntz I.D., 1969, Cuy T.J., Derbyshire W. et al., 1971, Fahy G.M., Levi D.I., Ali S., 1987). Фізичні властивості кожної фракції води, їх взаємодія з кріопротекторами, вимагають детального експериментального дослідження. Обмін води між різними фракціями забезпечується молекулярними рухами і відноситься до явищ переносу.

В роботі досліджували протонний обмін в системі вода - кріопротектор - білок методом ЯМР. З одержаних результатів випливає, що фракція води, зв'язаної з біополімером, залучена в швидкий протонний обмін з кріопротектором, причому частота обміну змінюється при денатурації білка.

Дослідження стану води в живих об'єктах з природною стійкістю

до холоду дозволило виявити деякі подібності в стані компонента зв'язаної води в них і в тих системах, в яких для кріозахисту використовуються екзогенні кріопротектори.

Одержані результати важливі для побудови моделі модифікуючої дії кріопротекторів на різні фракції води в біологічних системах і захисної дії кріопротекторів.

3. Поряд з проблемами фізики і фізичної хімії водних систем при температурах, нижчих від 0°C, важливе місце в описанні реакції біологічних систем на холод займає аналіз впливу низьких температур на механізми і швидкості реакцій, що каталізуються ферментами (Darbyshire B., 1974, Sheppard H., Tsien W.H., 1974, Луговой В.И., 1974). Такі експерименти краще виконувати на препаратах *in vivo*, для чого метод ЯМР, що використовувався нами, виявився надзвичайно цінним. Методом ЯМР досліджували ферментативні процеси утилізації макроергічних сполук - АТФ і 2,3-ДФГ в циклі Ембдена - Мейергофа і дів шунта Рапопорта -Луберінга в еритроцитах людини на різних стадіях кріоконсервування. Одночасно неруйнівними методами спектроскопії ЯМР слідували за градієнтом рН на мембранах еритроцитів, трансмембранним розподілом природних метаболітів і екзогенних речовин. Вся сукупність одержаних даних використана для розробки модельних уявлень про контроль метаболізму і про порушення енергетичного статусу клітин в ході кріоконсервації.

#### На захист виносяться

1) розробка концепції визначення енергетичного статусу клітин на різних стадіях кріоконсервування на базі неруйнівних методів аналізу;

2) розробка неінвазивних методів дослідження розподілу речовин між зовнішньо- і внутрішньоклітинним середовищем в суспензіях клітин;

3) вияснення природи існування кореляції в стані води при температурах нижче від 0°C в об'єктах з природною холодостійкістю і в таких, в яких кріостійкість створена штучно;

4) розвиток фізичних уявлень про протонний обмін і про молекулярну рухливість в водних розчинах кріозахисних речовин в присутності біополімерів.

5) розроблені методичні підходи і прилади для вимірювання осморності біологічних рідин і для контролю обезводжування

біологічних об'єктів під час сублимаційної сушки.

### Апробація, публікації і структура роботи

Основні матеріали дисертації доповідались на ІУ, V, VI і VII Всесоюзних конференціях з спектроскопії біополімерів, Харків, 1981, 1984, 1988, 1991, на XX конгресі AMPERE, Таллін, 1978 на Міжнародному симпозиумі з біокалориметрії, Тбілісі, 1981 на I Всесоюзному біофізичному з'їзді, Москва, 1982, на II Всесоюзній конференції з теоретичних і прикладних питань кріобіології, Харків, 1988 на III Всесоюзній конференції "Научне основы промышленного производства ветеринарных и биологических препаратов", Москва 1987, на Міжнародній конференції "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины", Харків, 1988, на III Всесоюзній конференції "Проблемы физиологии и биохимии древесных растений", Петрозаводськ, 1989, на VIII Всесоюзній конференції "Магнитный резонанс в биологии и медицине", Черногоровка, 1990, на Всесоюзному симпозиумі "Механизмы зимней спячки", Махачкала, 1990, на II Міжнародній конференції "Успехи современной криобиологии" Харків, 1992.

Матеріали дисертації опубліковані в 51 науковій роботі, з них 8 авторських свідоцтв.

Робота викладена на 203 сторінках машинописого тексту, містить 46 рисунків, 14 таблиць і список літератури, який включає 325 робіт, з них 122 – вітчизняних і 203 зарубіжних авторів.

### Об'єкти і методи дослідження.

В роботі використовували еритроцити з донорської крові людини. Венозну кров, зібрану в пробірки з гепарином або з цитратом натрію центрифугували при 800g протягом 10 хв і відділяли плазму. Еритроцитарну масу відмивали фізіологічним розчином або 0.15 М фосфатним буфером ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) два або три рази. Титрування еритроцитарної маси проводили безпосередньо в ампулі ЯМР, додаючи до суспензії еритроцитів малими порціями розчин кріопротектора концентрації 30 – 50% при постійному перемішуванні і доводили таким чином концентрацію кріозахисної речовини в суспензії до 10–15%. Бактерії *Y. Pestis* КV76 вирощували на твердому середовищі живлення Хоттінгера при 28° С протягом 48 годин, змивали фізіологічним розчином і суспендували в кріозахисних середовищах, як описано вище.

Спектри  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реєстрували на імпульсних Фур'є - спектрометрах Bruker СХР200, Bruker СХР300, Bruker WH360 і Varian VXR300. Типові умови запису спектрів  $^{31}\text{P}$ -ЯМР в режимі Фур'є: 60-градусний імпульс, час затримки 0.3с, накоплення на участку пам'яті розміром 8К. При вимірюванні хімічних зрушень  $^{31}\text{P}$ -ЯМР використовували як еталон розчин натрієвої солі етилендіамінтетрафосфонової кислоти в  $\text{D}_2\text{O}$ . Спектри  $^1\text{H}$ -ЯМР реєстрували на приладі Tesla BS 567A з робочою частотою 100 МГц для протонів в режимі SW. Похибки визначення хімічних зрушень  $\pm 0.01$  м.д., інтенсивності сигналу ЯМР +10%, температура зразка в датчику спектрометра ЯМР підтримувалась з точністю  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

Для приготування розчинів криозахисних речовин використовували поліетилєнглїколі молекулярних мас 300-4000 фірми "Мегок" квалїфікації ричип, гліцерин, 1,2-пропандїол, метанол, етанол, ДМСО - вітчизняного виробництва квалїфікації ХС. Використовували також індивїдуальні поліетилєнглїколі і олігомери ПЕГ з вузьким молекулярно - масовим розподїлом з середніми молекулярними масами 150, 200, 300, 1500, одержані в віддїлі криопротекторів ІПКІК АН України.

#### Розподїл криопротекторів між клітиною і середовищем.

Проникність клітин для криозахисних речовин і розподїл криопротекторів між зовнішньо- і внутрішньоклітинним середовищем являють собою частину надзвичайно важливої в криобїологїї проблеми - вивчення механїзмів захисної дії криопротекторів. З найбільш загальних міркувань ясно, що розподїл криопротекторів між клітиною і середовищем пов'язаний з властивостями напівпроникної клітинної мембрани і з гїдратацією колоїдів протоплазми, яка змінюється внаслідок проникнення речовин всередину клітини.

В даній роботі розподїл криозахисних речовин між клітиною і середовищем визначали за допомогою методичних підходів на основі спектроскопїї ЯМР [13, 17, 19, 20, 22, 50].

В основу першого методичного підходу покладений спосіб роздїлення суспензїї клітин на щільний осад і міжклїтинну рїдину з наступним визначенням концентрації досліджуваної речовини в кожній з фракцій методом ЯМР. Для дослідів використовували розчини криозахисних речовин з концентрацією неелектроліту 30 мас.%, які готували на фізіологічному розчині. Розчин неелектроліту змішували

у об'ємному відношенні 1:1 з еритроцитами, відмитими від плазми, еквілібрували деякий час для досягнення дифузійної рівноваги (не менше 10 хв), центрифугували 10 хв при 800g і реєстрували спектри ЯМР клітин, що осіли і надосадкової рідини. Як кількісну міру розподілу речовин між клітиною і середовищем використовували коефіцієнт розподілу Q, що дорівнює відношенню концентрації речовини в клітині до концентрації її в міжклітинному середовищі. Коефіцієнт Q знаходили з відношення інтенсивності сигналу ЯМР в цільному осаді клітин до інтенсивності сигналу в надосадковій рідині з урахуванням залишкового міжклітинного об'єму.

Оцінку залишкового міжклітинного об'єму проводили на основі вимірювання гематокритного відношення досліджуваного осаду клітин за допомогою стандартної методики центрифугування в тонкому капілярі. Величина гематокритного відношення складала біля 0.9 для еритроцитів у середовищах з низькомолекулярними неелектролітними добавками (етанол, метанол, гліцерин) і збільшувалась при збільшенні молекулярної маси останніх. В присутності ПЕГ-1500 вона досягала значення, близького до 1.

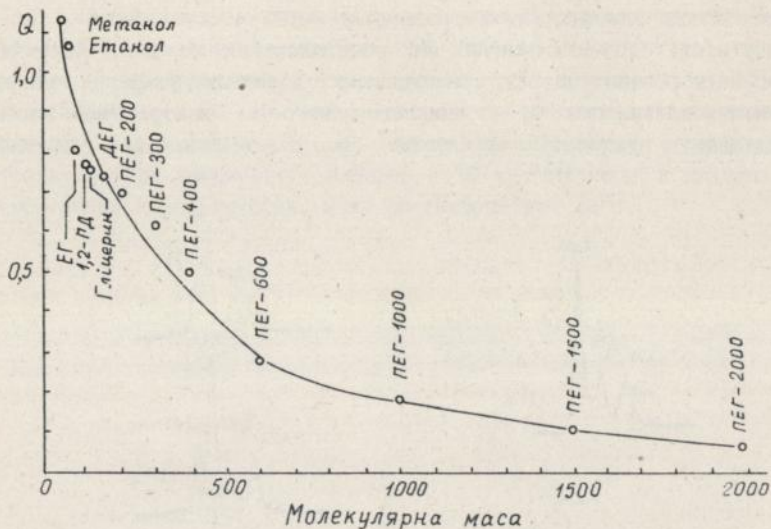
При визначенні Q для ПЕГ з молекулярною масою 400 і більше ми враховували той факт, що препарати ПЕГ мають в своєму складі досить широкий набір олігомерів з різними молекулярними масами. До розрахунку приймали молекулярно - масовий розподіл досліджуваного неелектроліта, знайдений хроматографічним методом. Сумарне значення Q знаходили, враховуючи внесок кожного з низькомолекулярних компонентів з ваговим множником, пропорціональним вмістові компонента.

Показано, що встановлення дифузійної рівноваги між внутрішньою і зовнішньоклітинним середовищем в еритроцитах для досліджуваних криозахисних речовин відбувається досить швидко. Коефіцієнт Q досягає величини, що складає 0.9 від рівноважного значення вже через 5 хв еквілібрації еритроцитів при температурах +4 - +37°C не лише для низькомолекулярних криопротекторів, але і для таких речовин, як ПЕГ-1500 і ПЕГ-2000.

На рис.1 показана залежність коефіцієнта Q в умовах дифузійної рівноваги для еритроцитів від молекулярної маси досліджуваних неелектролітів при 37°C.

Видно, що в досліджуваному нами ряду криозахисних речовин відсутня різка межа між речовинами проникними і непроникними через мембрани еритроцитів. Знайдені значення Q були використані в

розрахунках за теорією Кедем-Качальського коефіцієнта відбиття  $\sigma$  мембран еритроцитів для кріозахисних речовин. Для ПЕГ-1500 і ПЕГ-2000  $\sigma = 0.18 \pm 20\%$ . Для інших кріозахисних речовин величина  $\sigma$  не розраховувалась, оскільки із зростанням  $Q$  збільшується похибки розрахунку.



**Рис.1** Залежність коефіцієнта розподілу кріозахисних речовин між внутрішньо- і зовнішньоклітинним середовищем від молекулярної маси при 37°C.

Спостереження за динамікою більш швидких процесів перерозподілу кріопротекторів в клітинних суспензіях ми проводили за допомогою спектроскопії ЯМР на ядрах  $^{31}\text{P}$  [7, 19, 20]. В основі експериментальної методики лежить той факт, що хімічне зрушення сигналу  $^{31}\text{P}$ -ЯМР неорганічного фосфату в клітинах є функцією рН середовища, а більшість з використовуваних в нинішній час кріопротекторних добавок впливають на кислотність водних середовищ. Додання кріопротекторів, які легко проникають через мембрани

(значення  $Q$  близьке до 1) спричинюють зміни рН як внутрішньо-, так і зовнішньоклітинного середовища. У випадку кріопротекторів, що локалізуються головним чином у міжклітинному середовищі ( $Q < 1$ ) виникає значна нееквівалентність рН внутрішнього і зовнішнього середовища клітин.

На рис.2 показані спектри  $^{31}\text{P}$ -ЯМР контрольного зразка еритроцитів без кріопротектора і після додавання кріопротектора з явно малим коефіцієнтом розподілу (ПЕГ-4000). Видно, що в присутності ПЕГ-4000 сигнал  $\Phi_n$  розщиплюється на два. Додаючи в суспензію розчин цитрату марганцю, ми досягали уширення сигналу зовнішньоклітинного  $\Phi_n$  і зникнення його в спектрі ЯМР високої роздільної здатності. В такий спосіб здійснювали віднесення

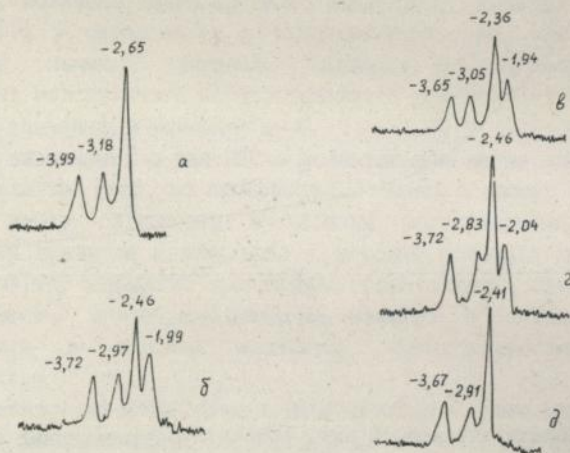
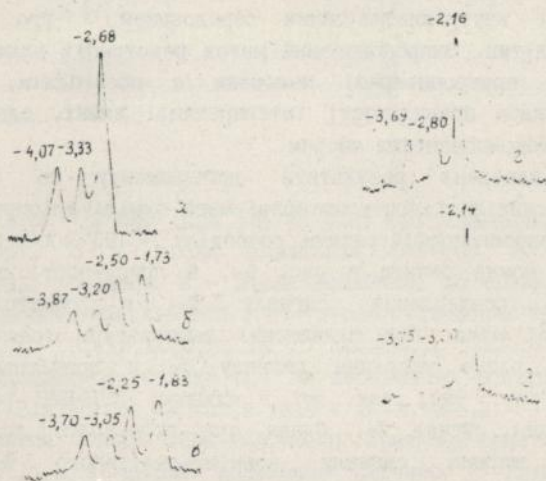


Рис.2 Спектри  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (при 145.78 МГц) еритроцитарної маси: початкової (а), після додавання ПЕГ-4000 до кінцевої концентрації 10 об% (б), при охолодженні зразка до 5°C (в), при нагріванні зразка до 40°C (г), після додавання 0.1 мл насиченого розчину цитрату марганцю (в). Віднесення сигналів на прикладі спектра (б): сигнали при -3.72 і -2.97 м.д. належать фосфатним групам 2,3-ДФГ в третьому і другому положеннях відповідно, -2.46 і -1.99 м.д. -  $\Phi_n$  всередині і зовні еритроцитів. Хімічні зрушення наведені відносно 85%  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

сигналів зовнішньо- і внутрішньоклітинного  $\Phi_n$ . Величина рН зовнішнього середовища в присутності слабо проникаючого кріспротектора виявилась нижчою, ніж всередині клітин. Нагрівання до  $40^\circ\text{C}$  і охолодження до  $5^\circ\text{C}$  не змінює вигляду спектра.

При додаванні низькомолекулярних неелектролітів ( $M < 200$ ) в спектрі  $^{31}\text{P}$ -ЯМР еритроцитів реєструється один сигнал  $\Phi_n$ .

На рис.3 показані результати аналогічного експерименту з ПЕГ-300. При підвищенні температури відбувається злиття сигналів внутрішньо- і зовнішньоклітинного  $\Phi_n$ , причому температурні зміни виявляються необоротними. Таким чином, в гомологічному ряду поліетиленгліколів ПЕГ-300 займає пограничне положення по характеру розподілу між зовнішньо- і внутрішньоклітинним середовищем еритроцитів. При температурі близько  $20^\circ\text{C}$  він проникає в клітину в значно менших концентраціях, ніж при температурі  $40^\circ\text{C}$ .

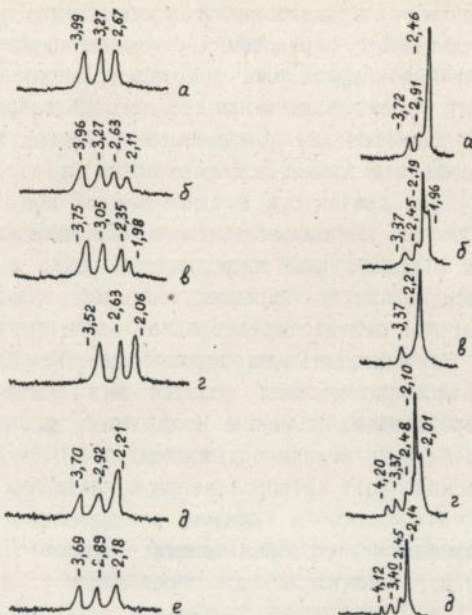


**Рис.3** Спектри  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (при  $146.78\text{ МГц}$ ) початкової еритромаси (а); після додавання ПЕГ-300 до кінцевої концентрації 10 об. % (б); після охолодження до зразка до  $5^\circ\text{C}$  (в); після нагрівання зразка до  $40^\circ\text{C}$  (г); після повернення до кімнатної температури (д). Віднесення сигналів таке ж, як на рис.2.

Відомо, що диметилсульфоксид (ДМСО) здатний впливати на проникність клітинних мембран для багатьох речовин. В даній роботі досліджувався вплив ДМСО на розподіл ПЕГ-500 між еритроцитами і середовищем. На рис.4 подані результати титрування еритроцитарної маси кріопротектором ПЕГ-500, який, як видно з рис.1, має невеликий коефіцієнт розподілу (близько 0,3 при 37°C). Додання до вихідної еритроцитарної маси ПЕГ-500 при кімнатній температурі призводить до розщеплення сигналу  $\Phi_n$  в спектрі  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (рис.4б). Після додання до зразка ДМСО при кімнатній температурі розщеплення сигналу  $\Phi_n$  в спектрі  $^{31}\text{P}$ -ЯМР зберігається (рис.4в), однак наступне підвищення температури до 40°C приводить до реєстрації тільки одного сигналу  $\Phi_n$  (рис.4г), тобто відбувається різке збільшення концентрації ПЕГ-500 в клітинах, можливо, внаслідок збільшення розмірів мембранних пор. Повернення до кімнатної температури не призводить до змін вигляду спектра (рис.4д). Спектри, одержані після додавання до розчину цитрату марганцю (рис.4е), свідчать про розподіл  $\Phi_n$  між зовнішньо- і внутрішньоклітинним середовищем і про збереження цілісності клітин. Запропонований метод реєстрації впливу ДМСО на розміри пор еритроцитарної мембрани є посереднім, необхідні додаткові докази правильності інтерпретації даних, одержаних при аналізі багатокомпонентних систем.

Нижче наведені результати експерименту по одночасному додаванню до вихідної еритроцитарної маси суміші кріопротекторів з сильно відмінними коефіцієнтами розподілу - ПЕГ-4000 і гліцерину (рис.5). Як можна бачити з рис. 5а, в присутності обох сполук відбувається розщеплення сигналу  $\Phi_n$  в спектрі  $^{31}\text{P}$ -ЯМР еритроцитарної маси. При підвищенні температури зразка до 40°C відбувається різке уширення сигналу  $\Phi_n$  в зовнішньоклітинному середовищі (рис. 5в), так, що в спектрі  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реєструється практично один сигнал  $\Phi_n$ . Однак при поверненні до кімнатної температури ширина сигналу зовнішньоклітинного  $\Phi_n$  набуває початкового значення (рис. 5г) і знову реєструється розщеплення сигналів. Віднесення сигналів внутрішньо- і зовнішньоклітинного  $\Phi_n$  було виконано за допомогою цитрату марганцю (рис. 5д).

Таким чином використання спектроскопії  $^{31}\text{P}$ -ЯМР високої роздільної здатності дозволило одержати нові експериментальні докази збільшення розмірів пор в мембранах еритроцитів людини під дією ДМСО і показати збереження впливу температури на розміри пор, збільшених диметилсульфоксидом.



**Рис.4** Спектри  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (при 145.78 МГц) еритроцитарної маси: а - початкової, б - після додавання ПЕГ-500 до кінцевої концентрації 10 об%, в - після додавання до зразка ДМСО до кінцевої концентрації 5 об%, г - після підвищення температури до 40°C, д - після повернення до кімнатної температури, е - після додавання до зразка 0.1 мл насиченого розчину цитрату марганцю. Віднесення сигналів таке ж як на рис.2.

**Рис.5** Спектри  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (при 145.78 МГц) еритроцитарної маси: а - початкової, б - після додавання ПЕГ-400 і гліцерину до кінцевих концентрацій 6 і 10 об% відповідно, в - після підвищення температури до 40°C, г - після повернення до кімнатної температури, д - після додавання до зразка 0.1 мл насиченого розчину цитрату марганцю. Віднесення сигналів таке ж, як на рис.2. Сигнал при 4.20 і 4.12 м.д., що повторюється в спектрах г і д, належить, мабуть, фосфатним групам сахарів. Віднесення сигналів не проводилось.

Результатом виконаного в даній роботі дослідження розподілу кріопротекторів між клітиною і середовищем стало встановлення того факту, що досить поширений в кріобіології поділ кріопротекторів на проникні і непроникні (так звані ендо- і екзоцелюлярні дії) потребує уточнення. В ряду речовин з близькими фізико - хімічними властивостями різка межа між даними двома класами кріопротекторів відсутня. "Пограничні" кріопротектори в одних умовах можуть діяти, як "екзоцелюлярні", тобто їх концентрація в зовнішньоклітинному середовищі може бути більшою, ніж всередині клітини, а в інших випадках - як "ендоцелюлярні". Характер їх дії залежить від температури, від термічної передісторії зразка і від присутності в середовищі речовин, що впливають на проникність мембран і на розподіл екзогенних кріопротекторних добавок між внутрішньо- і зовнішньоклітинним середовищем. Значення коефіцієнта розподілу для "пограничних" кріопротекторів лежить в діапазоні 0.3-0.5. Отже, для в'яснення характеру локалізації кріопротектора в клітинних системах і його осмотичної дії слід в кожному конкретному випадку експериментально визначати і аналізувати числові значення коефіцієнта розподілу його між клітиною і середовищем.

Дослідження метаболізму макроергічних сполук на різних  
стадіях кріоконсервування еритроцитів і природної адаптації  
біологічних об'єктів до холоду.

Енергетичний статус клітин є важливим показником здатності їх до репарації після кріогенних впливів. Вживання клітин після кріоконсервування багато в чому залежить від темпів відновлення клітинного метаболізму і зокрема, енергетичної системи клітин. Внутрішній пул макроергічних сполук, проникність мембран і величини потоків субстратів слід розглядати, як важливі параметри клітини, що забезпечують її життєздатність на різних стадіях кріоконсервування. Разом з тим розглянутий вище складний характер залежності трансмембранного розподілу кріозахисних речовин від молекулярної маси, температури, термічної передісторії та інших факторів дає підстави думати, що на процеси клітинного метаболізму по-різному будуть впливати екзогенні речовини навіть з досить близькими фізико - хімічними властивостями. Тому дослідження клітинного метаболізму являє значний інтерес з точки зору

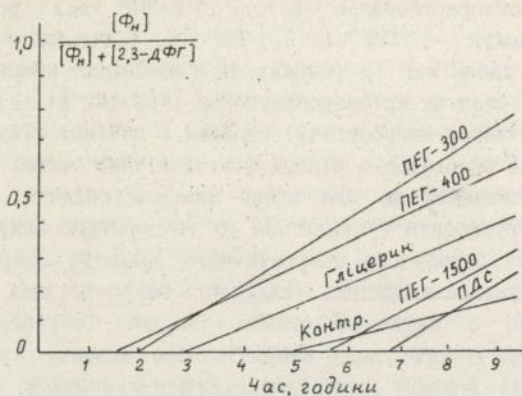
кріобіології.

В роботі використовували метод  $^{31}\text{P}$ -ЯМР для реєстрації макроергічних сполук - АТФ і 2,3-ДФГ в еритроцитах і для спостереження за динамікою їх розпаду та накоплення неорганічного фосфату на різних стадіях кріоконсервування [16, 18, 21, 29, 38, 48, 46]. Досліджували також макроергічні сполуки в печінці гібернруючих ховрашків *Citellus Undulatus* в різних фізіологічних станах [39, 40, 41, 42]. Було показано, що для стану зимової сплячки, в якому ховрашки здатні переносити охолодження до температури близько  $0^{\circ}\text{C}$ , характерні глибокі перебудови енергетичного апарату. Зокрема, при цьому значно знижується швидкість утилізації макроергічних сполук в печінці порівняно з активним станом тварин. Існування таких механізмів природної перебудови енергетичного апарату в клітинах тварини вказує на важливу роль енергетичного статусу клітин в адаптації до холоду і є ще одним аргументом, що доводить необхідність дослідження стану макроергічних сполук в умовах штучного кріоконсервування.

Такі дослідження в даній роботі виконували на еритроцитах з донорської крові людини. Еритроцити досліджували на стадіях інкубації в кріозахисному середовищі, після заморожування - відтавання, після відмивання кріопротектора і перенесення клітин в нове середовище інкубації. Розпад макроергічних сполук в клітинах супроводжується ростом концентрації неорганічного фосфату. Вимірювання інтенсивності сигналу  $\Phi_n$  на протязі часу інкубації еритроцитів можна використовувати для визначення швидкості розпаду макроергічних сполук.

На рис.6 показана залежність від часу інтенсивності сигналу  $\Phi_n$ , нормованого до сумарної інтенсивності сигналів  $\Phi_n + 2,3\text{-ДФГ}$  для еритроцитів в середовищах з різними кріозахисними добавками [46]. Видно, що після початкової фази постійних значень (лаг-фаза) настає фаза зростання інтенсивності сигналу  $\Phi_n$ . Числові значення тривалості лаг-фази і швидкості зростання сигналу  $\Phi_n$  подані в табл.1. В присутності різних кріопротекторів тривалість лаг-фази або зростає, як наприклад у випадку кріозахисної суміші пропандіосахароль (ПДС), або скорочується (гліцерин, ПЕГ), однак швидкість зростання сигналу  $\Phi_n$  у всіх випадках збільшується.

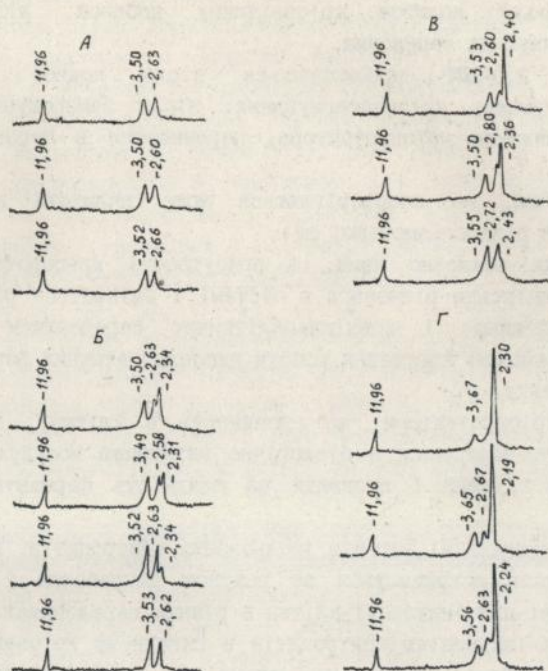
На рис.7 показані спектри  $^{31}\text{P}$ -ЯМР еритроцитів після різних стадій кріоконсервування. Видно, що зміни енергетичного стану



**Рис.6** Залежність інтенсивності сигналу  $^{31}\text{P}$ -ЯМР  $\Phi_n$  від часу в еритроцитах здорового донора в середовищах без кріопротектора і з 15% добавками кріопротектора. Спектри реєструвались при температурі  $20^\circ\text{C}$ .

**Таблиця 1.** Тривалість лаг-фази і швидкості зростання інтенсивності сигналу ЯМР  $\Phi_n$  в еритроцитах в процесі інкубації при  $20^\circ\text{C}$  в різних середовищах.

Склад середовища інкубації	Лаг-фаза (години)	Швидкість зростання сигналу $\Phi_n$ , %/годину.
Контроль	4.5	5
15% ПЕГ-300	1.5	10
15% ПЕГ-400	1.7	8
15% гліцерину	2.6	7
15% ПЕГ-1500	5.5	7
15% 1,2-ПД в складі ПДС	6.5	8



**Рис.7** Спектри  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (при 145.78 МГц) в процесі інкубації без глюкози при 37°C еритромаси: А - початкової, Б - після криоконсервування і відтавання, В - після наступного двохстадійного відмивання від криоконсервуючого розчину, Г - після перенесення в середовище ЦНИИГПК 8в. Віднесення сигналів таке ж, як на рис.2. Сигнал при -11.96 м.д. належить еталону - розчину натрієвої солі етилендіамінтетрафосфорової кислоти в  $\text{D}_2\text{O}$ . Хімічні зрушення в м.д. наведені відносно 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Час, що пройшов від початку інкубації при 37°C до одержання спектра, вказаний на рисунку.

еритроцитів зумовлені не стільки власне процесом заморожування - відтавання, стільки впливом криозахисних добавок, відмивних розчинів і суспендуючих середовищ.

Деградація 2,3-ДФГ прискорюється після кожної стадії технологічного процесу криоконсервування: після заморожування - відтавання, відмивання криопротектора, перенесення в суспендуюче середовище.

Механізм явищ, що спостерігаються може включати в себе декілька факторів різноспрямованої дії.

По-перше, як показано нами, в присутності криопротекторів порушується доннанівська рівновага в системі і змінюється розподіл іонів між внутрішньо- і зовнішньоклітинним середовищем [19]. Внаслідок цього можливі порушення роботи цитоплазматичних ферментів гліколітичного шляху.

По-друге, криопротектори, що проникають в клітину, здатні, мабуть, утворювати комплекси з біологічно активними молекулами, в тому числі і з 2,3-ДФГ і впливати на швидкість ферментативних реакцій.

По-третє, енергетичні витрати ізольованих еритроцитів, які при відсутності глікози покриваються за рахунок витрачання 2,3-ДФГ, мабуть, неоднакові при інкубації клітин в різних середовищах. Разом з тим, приклад з інкубацією еритроцитів в складному криозахисному середовищі ПДС (табл.1) вказує на можливість керування процесом деградації макроергічних сполук шляхом підбору багатокomпонентних криозахисних середовищ.

#### Дослідження стану води в біологічних системах з природною і штучно створеною холодостійкістю.

Явища переносу в живих системах тісно пов'язані з фізичними властивостями водного компонента біологічного об'єкта. Холодові пошкодження багато в чому визначаються змінами властивостей розчинника, що виникають при замерзанні системи. Криозахисні речовини справляють широкий спектр дії на компоненти живих систем, в тому числі і на фізико - хімічні властивості водного компонента. Зокрема вони сприяють ослабленню осмотичних стресів при криогенних діях на клітини. Разом з тим відомі біологічні об'єкти різного

рівня організації (рослини, комахи та ін.), здатні зберігати життєздатність після досить глибокого охолодження. Являє інтерес співставити властивості водного компонента і його реакцію на охолодження в об'єктах з природною холодостійкістю і в таких, у яких ця властивість створена штучно. Інтерес до такого аналізу зрозумілий як з наукової точки зору, так і в зв'язку з практичними задачами кріобіології. З проблемою дії кріопротекторів тісно пов'язаний і аналіз фізико-хімічних властивостей розчинів, міжмолекулярних взаємодій в них, молекулярної рухливості, міжмолекулярного обміну. Такі дослідження були здійснені в даній роботі [12, 30, 32, 33, 37, 43, 44, 47, 49]. Досліди проводили на об'єктах, що значно відрізняються генетично. Досліджували деревні рослини з різною холодостійкістю (береза *Betula Vulgaris*, яблуня *Malus Domestrika* сорту Кальвіль). Методом <sup>1</sup>H-ЯМР вивчали фазові переходи води в цих об'єктах при температурах, нижчих від 0°C. Експериментальна методика базується на тому факті, що при переході води в тверду фазу її сигнал ЯМР уширюється на декілька порядків і не реєструється в спектрах ЯМР високої роздільної здатності. Фракція води, зв'язаної з гідрофільними центрами біологічних молекул, або яка входить до складу гідратних оболонок іонів, не переходить в кристалічну фазу і реєструється в спектрі ЯМР нижче температури кристалізації основної маси розчинника. Ця властивість дозволяє відрізнити вільну і зв'язану воду (метод Кюнца).

Пагігці берези і яблуні брали в другій половині зими, коли температура утримувалась довгий час нижче -20°C. При цьому рослини знаходяться в стані вимушеного спокою і мають високу стійкість до холоду. В кімнатних умовах проводили регідратацію, занурюючи пагігці в воду. На рис. 8 показані залежності інтенсивності сигналів ЯМР від температури в пагігцях з різним обводненням. Видно, що в пагігцях берези, взятих безпосередньо з дерева, інтенсивність сигналу води не змінюється до -14°C, а в пагігцях яблуні до -7°C. Нижче цих значень температури відбувається поступове зменшення інтенсивності сигналу води внаслідок кристалізації слабо зв'язаної фракції. В обводнених (тобто не адаптованих до дії холоду) рослинах кристалізація води починається при більш високих температурах. Мабуть в обводнених рослинах змінюється співвідношення пулів міцно і слабо зв'язаної води, причому в останньому розвивається кристалізація. Відповідно підвищується і температура холодогового пошкодження. Можна думати, що холодостійкість зв'язана не з

абсолютним вмістом зв'язаної води, а з відносним розміром компартментів слабо і міцно зв'язаної води. Зменшення відносного вмісту слабо зв'язаної води сприяє більш глибокому переохолодженню

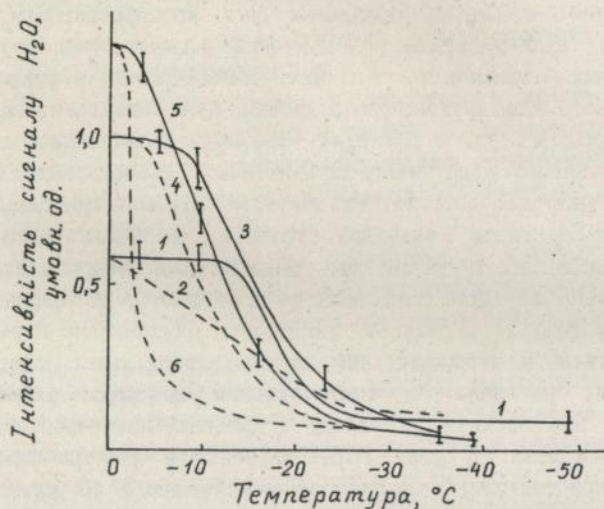


Рис.8 Залежність інтенсивності сигналу води від температури в пагінях берези і яблуні. 1,2 - пагінци берези взяті безпосередньо з дерева, 3,4 - пагінци яблуні, взяті безпосередньо з дерева, 5,6 - пагінци берези після відрошування в кімнатних умовах (1,3,5 - охолодження, 2,4,6 - нагрівання).

і ослабленню пошкоджень внаслідок кристалізації льоду.

Відомо, що деяке насіння, спори і пилок рослин мають дуже малу залишкову вологість і здатні переносити охолодження впритул до температури рідкого гелію без втрати життєздатності. Мають в таких об'єктах вся вода знаходиться в зв'язаному стані і не зазнає фазових переходів першого роду при охолодженні.

Цей же методичний прийом ми використали при дослідженні

куколок *Nyphantria Cunea* Dr. Було встановлено, що вода в зимуючих куколках при температурах до  $-17^{\circ}\text{C}$  знаходиться в метастабільному переохолодженому стані. При температурі  $-17^{\circ}\text{C}$  настає кристалізація і куколки гинуть. При підвищенні температури повне танення води настає в температурній області близько  $0^{\circ}\text{C}$ . Цей факт вказує на незначний вміст в гемолімфі куколок осмотично активних речовин, що виконують роль "природних кріопротекторів". Звідси видно, що холодостійкість досліджуваного виду *Nyphantria Cunea* Dr зв'язана з стійким переохолодженням води в температурній області нижче  $0^{\circ}\text{C}$ . Високий вміст слабо зв'язаної води сприяє утворенню кристалів льоду і веде до кріопшкодження. Системи з штучно створеною стійкістю до холоду характеризується тим, що стан води в них модифікований введенням неводних кріозахисних добавок. В даній роботі досліджували стан води в бінарних системах вода - кріопротектор [1, 2, 26], в розчинах кріопротекторів з добавками біополімерів [2, 3, 10, 14, 15, 30, 45] і в суспензіях клітин з кріозахисними речовинами [30,47]. На прикладі еритроцитів і бактерій *Y. Pestis* EV76 було показано, що в присутності кріозахисних речовин в системі збільшується відносна кількість зв'язаної води. Внесок кожного з компонентів в сумарну гідратацію системи лише в деяких випадках підкоряється правилу простої аддитивності, але частіше всього така аддитивність відсутня. Особливо сильний вплив кріопротекторів з ряду ПЕГ на стан води виявляється при дослідженні цілого органа, де може спостерігатись відтікання вільної води з окремих компартментів [4, 27].

Досліджуючи осмолярність розчинів за допомогою спеціально розробленого приладу [34], ми виявили, що осмолярність багатокомпонентних розчинів, як і гідратація, не підкоряються правилу простої аддитивності. Однак у всіх випадках для біологічних систем з різним рівнем організації спостерігається збільшення відносної кількості зв'язаної води при додаванні кріопротекторів.

Таким чином, подані експериментальні результати вказують на те, що в біологічних об'єктах з природною стійкістю до холоду і в таких, у яких холодостійкість створена шляхом введення штучних кріозахисних речовин, існує загальна властивість - високий вміст компонента зв'язаної води в об'єкті.

Дослідження молекулярної рухливості в водних  
розчинах кріопротектора з добавками білків.

Для кріопротекторів, як було показано вище, багато в чому визначається їх здатністю зв'язувати воду, внаслідок чого змінюється склад незамерзаючих мікрофаз в системі і частина рідини склеться при температурах, нижчих від 0°C.

Важливою властивістю, яка дозволяє характеризувати міру зв'язаності води, є швидкість переорієнтації і трансляції молекул в процесі міжмолекулярного і протонного обміну. Метод ЯМР дозволяє виявити різницю між центрами, що обмінюються.

Роздільне спостереження сигналів вдається в тих випадках, коли різниця хімічних зрушень  $\delta$  компонентів, що обмінюються і час обміну  $\tau$  зв'язані співвідношенням:

$$\tau\delta \gg 1$$

В даній роботі досліджували процеси міжмолекулярного і протонного обміну в системі вода - сироватковий альбумін людини - гліцерин [31, 35]. Використовували важку воду  $D_2O$ . Спостерігали за протонними сигналами залишкової  $H_2O$  в складі  $D_2O$ .

На рис.9 (вставка) показані спектри ЯМР протонів  $H_2O$  і OH в розчині гліцерину в важкій воді з доданням сироваткового альбуміну людини (САЛ). Як можна бачити з рис.9, в бінарній суміші  $D_2O$  - гліцерин з масовим відношенням компонентів 1:9 при pH=6.6 сигнали  $H_2O$  і OH реєструються роздільно у всьому досліджуваному діапазоні температур, причому залежність хімічного зрушення від температури  $\delta = f(T)$  лінійна. Це характерно для систем з водневими зв'язками.

При додаванні САЛ сигнали  $H_2O$  і OH зливаються в один в діапазоні температур, вищих від 10°C, а нижче від цієї температури стає можливим їх роздільне спостереження. Час обміну при 10°C складає біля  $10^{-3}$ с. Звідси видно, що протонний обмін в присутності САЛ прискорюється. Якщо САЛ піддати тепловій денатурації шляхом нагрівання розчину до 100°C, то сигнали  $H_2O$  і OH вдається спостерігати роздільно при температурі, нижчій від 20°C. Отже, в присутності денатурованого білка обмін прискорюється в меншій мірі, ніж з нативним білком. Згідно з існуючими уявленнями, елементарний акт протонного обміну здійснюється в воднево-зв'язаних комплексах

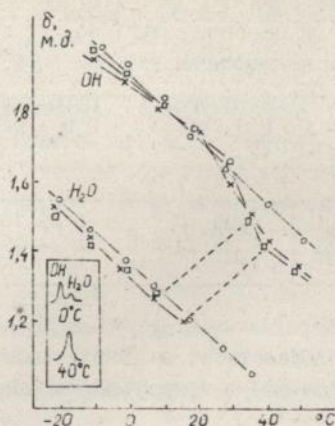


Рис.9 Залежності хімічних зрушень сигналів  $^1\text{H-NMR}$   $\text{H}_2\text{O}$  і групи  $\text{OH}$  гліцерину від температури в системі гліцерин -  $\text{D}_2\text{O}$ , мас. відношення компонентів 9:1.

- o - суміш гліцерин -  $\text{D}_2\text{O}$ ;
- x - система гліцерин -  $\text{D}_2\text{O}$  з добавками САЛ, 1 мг/мл;
- - після денатурації САЛ нагріванням.

компонентів, що обмінюються. У відповідності з цим, каталітична дія білка на обмін повинна виявлятися через його вплив на воднево-зв'язані комплекси вода - гліцерин. Одним з показників міри залученості функціональних груп молекул у водневі зв'язки може бути величина похідної хімічного зрушення сигналів  $^1\text{H-NMR}$   $\text{H}_2\text{O}$  і  $\text{OH}$  по температурі  $d\delta/dT$  в досліджуваних системах, які знаходили з нахилу прямих  $\delta = f(T)$  на рис.9. Числові значення похідних  $d\delta/dT$  подані в табл.2.

В присутності нативного САЛ величина  $d\delta/dT$  має найменше значення, а протонний обмін у цьому випадку найшвидший. Мабуть, в даному випадку молекули гліцерину втягаються в утворення крупних міжмолекулярних агрегатів і зростає частота утворення воднево-зв'язаних комплексів з молекулами  $\text{H}_2\text{O}$ , в яких взаємне розташування функціональних груп сприятливе для здійснення акту протонного обміну.

Таблиця 2. Значення похідної хімічного зрушення сигналів  $^1\text{H-NMR}$   $\text{H}_2\text{O}$  і  $\text{OH}$  по температурі  $d\delta/dT$  в системі гліцерин  $\text{D}_2\text{O}$  з масовим відношенням 9:1 при  $\text{pH}=6.6$ .

Склад розчину		Гліцерин+ $\text{D}_2\text{O}$ (9:1)	Гліцерин+ $\text{D}_2\text{O}$ + САЛ	Гліцерин+ $\text{D}_2\text{O}$ + САЛ, теплова денатурація
$d\delta/dT$ , м.д./К	$\text{H}_2\text{O}$	$0.85 \cdot 10^{-2}$	$0.89 \cdot 10^{-2}$	$0.69 \cdot 10^{-2}$
	$\text{OH}$	$0.89 \cdot 10^{-2}$	$0.67 \cdot 10^{-2}$	$0.79 \cdot 10^{-2}$

Одержані експериментальні результати дають підстави думати, що ця взаємодія відбувається в шарі води, який знаходиться в безпосередньому контакті з гідрофільними центрами біополімера.

Дослідження міцності зв'язування води і процесів переносу при сублімаційному висушуванні біологічних матеріалів.

Фракція зв'язаної води, як було показано вище, відіграє істотну роль в холодостійкості живих систем. Тому значний інтерес для кріобіології являє собою вивчення саме тієї частини водного компонента в біологічних об'єктах, що безпосередньо взаємодіє з гідрофільними центрами. Для таких досліджень в даній роботі був виготовлений спеціальний калориметр [7] і виміряна теплота десорбції води з деяких біологічних об'єктів при різних значеннях їх вологості. В таблиці 3 подані значення теплот десорбції води з деяких вірусних вакцин і з захисних середовищ, які використовуються в технології сублімаційної сушки біологічних об'єктів. Зразки висушували з водних розчинів в захисних середовищах, склад яких вказаний в таблиці 3. Висушені зразки доводили до необхідного значення залишкової вологості, витримуючи їх в середовищі з необхідним значенням тиску насиченої пари води до досягнення рівноваги.

Аналогічні дослідження були виконані на зразках лізину в діапазоні вологості зразків 20% - 1.8%.

Було встановлено, що при вологості менше 18% , коли відбувається десорбція міцно зв'язаної з біологічним матеріалом

води, теплота десорбції перевищує теплоту випаровування чистої води при відповідній температурі. Різниця теплот збільшується при зменшенні вологості і досягає 80 - 120 кал/г  $H_2O$  ( $3.34 \cdot 10 - 5.02 \cdot 10$  кДж/кг  $H_2O$ ) при вологості зразка менше 4%. Ця загальна закономірність спостерігалась для всіх зразків, що досліджувались. Приймаючи до уваги, що теплота кристалізації води при  $0^\circ C$  складає 80 кал/г  $H_2O$  ( $3.34 \cdot 10$  кДж/кг  $H_2O$ ), на основі одержаних результатів можна зробити висновок, що в розчинах біоматеріалів перехід зв'язаної води в кристалічну ґратку льоду енергетично невигідний. Ця фракція води реєструється, як незамерзаюча при температурах нижче температури кристалізації основної маси розчинника, що було показано вище.

Таблиця 3. Теплота десорбції води з біопрепаратів при вологості 3,5%.

Препарат	Склад захисного середовища	Кількість десорбованої води, %	Теплота десорбції кал/г $H_2O$	Температура, $^\circ C$
Чисте середовище для протибруцельозної вакцини	Сахароза (5%) Желатин (1.2%) Декстран (2%)	1.6	664	40
	Сахароза (5%) Желатин (7%) Декстран (5%)	0.9	604	50
Протибруцельозна вакцина в різних середовищах	Сахароза (5%) Декстран (5%)	1.1	640	50
	Сахароза (5%) Желатин (0.7%) Декстран (5%)	0.7	670	50
	Сахароза (5%) Желатин (5%) Декстран (5%)	0.8	690	50
Суша вірусвакцина проти хвороби Нью-Касла, штамм Ла-Сота"	Обезжирене молоко (15%)	1.2	674	50
	Пептон (5%)	0.8	616	50

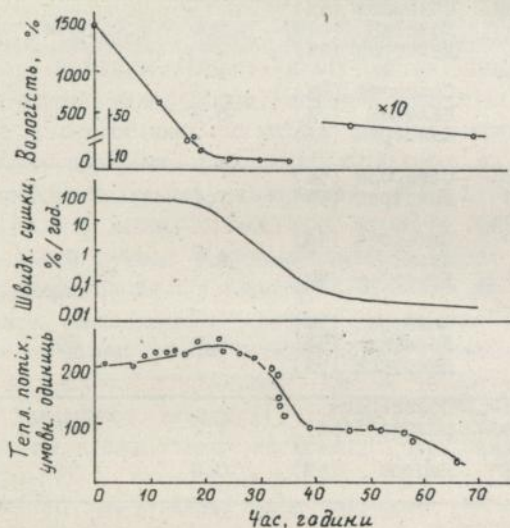
Розглянутий вище калориметричний метод дослідження зв'язаної з біологічним об'єктом води був використаний нами для побудови приладів для контролю процесів тепло- і масопереносу під час

сублимаційного висушування біологічних матеріалів.

Висушування біоматеріалів з замороженого стану є однією з криогенних біотехнологій, що має в нинішній час досить широке застосування не лише в лабораторних, але і в промислових масштабах. Тому розробка неперервних методів контролю тих процесів, що відбуваються на протязі технологічного циклу висушування являє собою певний практичний інтерес.

В даній роботі були запропоновані експериментальні методи і виготовлене відповідне обладнання для неперервного контролю теплопереносу безпосередньо в сушильних апаратах в ході технологічного процесу сушки [5, 8, 9, 11, 23, 24, 25, 28]. В основі запропонованих методів лежить вимірювання теплового потоку від сточуючих тіл до висушуваного матеріалу.

На рис.10 показана залежність теплового потоку від часу, одержана за допомогою розробленого датчика теплового потоку в процесі сублимаційної сушки зразка захисного середовища на основі пептону. На рисунку також показана залежність вологості



**Рис.10** Залежність вологості, швидкості сушки і теплового потоку сушки від часу висушування для захисного середовища на основі пептону.

від часу сушки, одержана періодичним зважуванням зразка в ході висушування. Диференціюючи цю криву по часові, знаходили швидкість сушки. Одержана залежність швидкості сушки від часу дозволяє зареєструвати період постійної швидкості сушки (фазу сублимації) і фазу досушування. Як видно з рис.10, ці ж фази реєструються і за допомогою датчика теплового потоку, причому в технологічному відношенні вимірювання теплового потоку реалізуються досить простими засобами. За допомогою вимірювання теплового потоку сушки можна вирахувати швидкість сушки зразка. Таким чином, сигнал датчика теплового потоку може бути використаний для керування процесом сушки [24], наприклад для переходу на форсований режим сушки.

## В И С Н О В К И

1. Розроблена концепція визначення енергетичного стану еритроцитів на різних стадіях кріоконсервування на основі аналізу динаміки розпаду макроергічних сполук в клітинах в умовах виснаження по глікозі.

2. На основі дослідження швидкості деградації 2,3-ДФГ в еритроцитах в присутності кріопротекторів з різною проникною здатністю крізь мембрану виявлено, що кріопротектори, які слабо проникають через цитоплазматичну мембрану, здатні викликати сильніші порушення в метаболізмі клітин, ніж кріопротектори, що легко проникають в клітину. Це суперечить традиційним уявленням і вимагає їх уточнення. Запропонований механізм явищ, що спостерігаються в присутності слабо проникних кріопротекторів.

3. Проведено дослідження енергетичного стану еритроцитів на стадіях підготовки їх до кріоконсервування, після заморожування - відтанення, після відмивання від кріопротектора і перенесення клітин в нове середовище суспендування. Показано, що дія кожної стадії кріоконсервування на енергетичний апарат клітин виявляється в зміні тривалості лаг-періоду і швидкості деградації макроергічних сполук в ізольованих еритроцитах.

4. Проведено дослідження енергетичного стану еритроцитів після їх консервування в захисному середовищі ПДС і показано, що процедура заморожування - відтанення мало впливає на рівень 2,3-ДФГ в клітинах, але швидкість його деградації після кріоконсервування

збільшується.

5. Виявлено виникнення трансмембранного градієнта рН в еритроцитах в присутності криозахисних речовин, що локалізуються в міжлітинному середовищі. Ефект пояснюється порушенням доннанівської рівноваги на мембранах клітин.

6. Серед досліджених криозахисних речовин з класу неелектролітів молекулярних мас 32-2000, які найбільш широко використовуються в кріобіології, не виявлено різкої границі між речовинами проникними і непроникними через мембрану еритроцитів. Коефіцієнт розподілу між клітиною і середовищем для цих речовин монотонно знижується з ростом їх молекулярної маси. Коефіцієнт відбиття мембран еритроцитів для неелектролітів зменшується з ростом молекулярної маси останніх.

7. Експериментально показано, що проникнення кріопротекторів в еритроцити відбувається по механізму пасивної дифузії і в значній мірі визначається співвідношенням розмірів молекул кріопротектора і мембранних пор.

8. В гомологічному ряду ПЕГ для олігомерів молекулярних мас 200-300 характерне "пограничне" положення по характеру їх розподілу між зовнішньо- і внутрішньоклітинним середовищем еритроцитів. В цьому діапазоні молекулярних мас розподіл кріопротектора між клітиною і середовищем сильніше залежить від температури при 20-40°C, ніж для інших молекулярних мас.

9. Одержані нові експериментальні докази збільшення розмірів мембранних пор еритроцитів під впливом ДМСО і збереження при цьому здатності пор до подальшого збільшення при підвищенні температури до 40°C.

10. Біологічні системи, що мають природну стійкість до температур, нижчих від 0°C, і такі, у яких холодостійкість створена штучно, характеризуються загальною властивістю - більш високим вмістом зв'язаної води по відношенню до всієї води в об'єкті порівняно з об'єктами, не здатними переносити температури нижче 0°C.

11. Міжмолекулярний протонний обмін води з кріопротектором відбувається не лише в об'ємі водного розчину, але і поблизу білкових макромолекул, причому макромолекули виявляють каталітичну дію на обмін.

12. Показано, що для фракції міцно зв'язаної води в

біологічному об'єкті перехід в кристалічну ґратку льоду енергетично не вигідний.

13. Розроблений і виготовлений прилад для вимірювання осмолярності біологічних рідин з більш високою точністю, ніж за допомогою серійних приладів, що випускаються промисловістю.

14. Розроблена методика і виготовлений прилад для неперервного контролю видалення води з біологічних об'єктів в ході технологічного процесу їх сублимаційної сушки.

#### ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Зинченко В.Д. О протонной подвижности в системе вода - полиэтиленгликоль // Современные вопросы криобиологии: Сб.н.тр.- Киев: Наук. думка, 1976. - С. 13-15.

2. Мойсеев В.О., Манк В.В., Зинченко В.Д., Зинченко О.В. Про стан води в розчинах гемоглобіну з добавками поліетиленоксиду // Доповіді АН УРСР, сер. Б.- 1977.- II. - С. 1033-1035.

3. Мойсеев В.А., Зинченко В.Д., Зинченко А.В., Стародуб Н.Ф., Рекун Г.М., Манк В.В. О влиянии полиэтиленоксида на состояние воды в растворах гемоглобина при замораживании-отогреве // Механизмы криповреждения и криопротекции биологических структур.- Киев: Наук. думка, 1977.- С. 38-39.

4. А.с. 894507 СССР ГОИ N 24/08 Способ определения степени дегидратации стекловидного тела / Чердынченко В.М., Бездетко П.А., Зинченко В.Д. Опубл. 1981, Б И N 48, с.211.

5. А.с. 1040884 СССР ГОИ N 24/08. Устройство для автоматического контроля процесса камерной сушки / Пушкарь Н.С., Мойсеев В.А., Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Шевырев Н.С., Токарик Э.Ф., 1983. В открытой печати не публикуется.

6. Zinchenko V.D., Mank V.V., Moiseyev V.A. Nuclear magnetic resonance study of molecular interaction in aqueous solution of polyethyleneglycols // Abstracts XXth congress AMPERE, August 21-26. - Tallin, 1978. - D 3312.

7. А с. 553529 СССР ГОИ N 25/56. Устройство для определения интегральной теплоты десорбции жидкостей и газов / Пушкарь Н.С., Мойсеев В.А., Зинченко А.В., Зинченко В.Д. - Опубл. Б.И. 1977 N 13.

8. А.с. 1018485 СССР F26B, F26B 5/06. Устройство для контроля теплового потока / Пушкарь Н.С., Мойсеев В.А., Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Токарик Э.Ф., Нежута А.А. 1983 г. В открытой печати не публикуется.

9. А.с. 1204007 СССР F26/13, 25/22, 21/10, 5/06 Измеритель теплового потока/ Пушкарь Н.С., Мойсеев В.А., Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Токарик Э.Ф., Нежута А.А. 1985 г. В открытой печати не публикуется.

10. Зинченко В.Д., Мойсеев В.А. О протонном обмене в тройной системе вода-полиэтиленгликоль-белок // IV Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров: Тез. докл. - Харьков, 1981.

11. Pushkar N.S., Moiseev V.A., Zinchenko A.V., Zinchenko V.D. A differential microcalorimeter for studying water desorption in biological systems // Abstracts International simposium on Biocalorimetry. - Tbilisi, 1980

12. Болдырев В. П., Подлятов Г. Г., Белоус А. М., Шраго М. И., Зинченко В. Д. Исследование эффективности применения криопротекторов для повышения морозоустойчивости виноградных растений // Труды ВНИИВ "Магарах": Ялта. - 1981. - т. XX. - С. 69-77.

13. Зинченко В. Д., Воротилин А. М., Моисеев В. А. Исследование проникновения неэлектролитов через клеточные мембраны // I Всесоюз. биофиз. съезд: Тезисы докладов. - М.: Ин-т биол. физики АН СССР, 1982. - т. IV. - С. 17.

14. Зинченко В. Д., Моисеев В. А. О гидрофобных взаимодействиях и протонном обмене в тройной системе сывороточный альбумин-полиэтиленгликоль-вода // I Всесоюз. биофиз. съезд: Тезисы докладов. - М.: Ин-т биол. физики АН СССР, 1982. - IV. - С. 19.

15. Зинченко В. Д. О гидратации сывороточного альбумина человека в присутствии полиэтиленгликоля-400 // Спектроскопия биополимеров: Тез. докл. V Всесоюзная конф. - Харьков, 1984. - С. 44.

16. Белоус А. М., Зинченко В. Д., Бжезовский В. М., Поволоцкий М. И., Басилчук Л. А. Влияние полиэтиленгликоля-1500 на состояние 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах человека при подготовке к криоконсервированию // Доклады АН УССР. - 1991. - № 4. - С. 153-156.

17. Зинченко В. Д., Кнубовец Т. Л., Сибельдина Л. А. Изучение проникающей способности криопротекторов через мембраны эритроцитов методом <sup>31</sup>P-ЯМР спектроскопии // Вторая Всесоюзная конференция по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии: Тезисы докладов. - Харьков, 1984. - I. - С. 39.

18. Зинченко В. Д., Кнубовец Т. Л., Сибельдина Л. А. Сравнение различных способов криоконсервирования по данным <sup>31</sup>P-ЯМР спектроскопии // Вторая Всесоюзная конференция по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии: Тезисы докладов. - Харьков, 1984. - I. - С. 207.

19. Кнубовец Т. Л., Зинченко В. Д., Сибельдина Л. А. Исследование проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов методом <sup>31</sup>P-ЯМР спектроскопии высокого разрешения // Биол. мемб. - 1985. - 2. - № 7. - С. 747-754.

20. Кнубовец Т. Л., Зинченко В. Д., Сибельдина Л. А. Исследование действия диметилсульфоксида на мембраны эритроцитов человека методом <sup>31</sup>P-ЯМР // Биол. мемб. - 1987. - 4. - № 1. - С. 84-89.

21. Зинченко В. Д., Кнубовец Т. Л., Сибельдина Л. А., Воротилин А. М., Моисеев В. А. Исследование методом <sup>31</sup>P-ЯМР метаболизма некоторых фосфатов эритроцитов человека при криоконсервировании с 1,2-пропандиолом // Криобиология. - 1987. - 2. - С. 37-42.

22. Воротилин А. М., Миросников А. М., Гучок В. М., Зинченко В. Д. Криопротекторные свойства эфиров этиленгликолей при замораживании эритроцитов человека // Криобиология. - 1987. - 3. - С. 31-34.

23. Нежута А. А., Маслов Г. Д., Зинченко В. Д. Применение датчика тепловых потоков в технике сублимационной сушки // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности. - Москва: ВНИИТИБП Госагропрома СССР. - 1987. - С. 3-6.

24. Нежута А. А., Маслов Г. Д., Зинченко В. Д. Определение момента форсированного перехода на фазу досушивания при сублимационной сушке биопрепаратов с помощью датчика тепловых потоков // Научные основы технологий промышленного производства ветеринарных биологических препаратов: Тезисы докладов III Всесоюзной конференции. - Москва, 1987. - С. 263-264.

25. Токарик Э. Ф., Скотникова Т. А., Нежута А. А., Ковальская Л. А., Панферов В. В., Блехерман Б. Е., Константинов В. М., Лихтенштейн Г. И., Зинченко В. Д. Теоретические предпосылки и методические подходы к стабилизации активности биологических препаратов // Научные основы технологий промышленного производства ветеринарных

биологических препаратов: Тезисы докладов III Всесоюзной конференции. - Москва, 1987. - С. 263-264.

26. Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Моисеев В.А. О низкотемпературных фазовых переходах в водных растворах полиэтиленгликолей // Гук. деп. в ВИНТИ 29.04.87 N 3021 - В87. - 21с.

27. Чередищенко В.М., Бездетко П.А., Зинченко В.Д. Исследование методом ЯМР дегидратации стекловидного тела, вызванной криопротектором ПЭО-400 // Криобиология. - 1987. - 4. - С. 45-46.

28. АС 434341 СССР GOIN 25/20. Устройство дифференциального термического анализа / Зинченко В.Д., Зинченко А.В., Подопригора Л.П., Моисеев В.А. Спубл. Б.И. 1988 N 40, с. 203.

29. Кнубовец Т.Л., Зинченко В.Д., Сибельдина Л.А. <sup>31</sup>P-ЯМР исследование влияния криопротекторов на метаболизм эритроцитов человека // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл. Межд. конф. - Харьков, 1988. - С. 18.

30. Терентьев А.Н., Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Мусатов В.И., Шетинский М.И. Влияние некоторых криопротекторов на состояние воды в клетках *Y.Pestis* KV76 при замораживании - оттаивании // Криобиология. - 1973. - N1. - С. 20-26.

31. Зинченко В.Д., Шетинский М.И., Мусатов В.И., Моисеев В.А. О влиянии сывороточного альбумина человека на протонный и изотопный обмен в системе D O-глицерин // VI конференция по спектроскопии биополимеров: Тез. докл. - Харьков, 1986. - С. 138-139.

32. Зинченко В.Д. Использование метода ЯМР для исследования механизмов криоповреждения и криозащиты // Моделирование криобиологических процессов: Сб. н. тр. - Харьков: ИЛКИК АН Украины, 1988. - С. 146-153.

33. Мануильский В.Д., Пачепская Л.Б., Моисеев В.А., Зинченко В.Д., Шетинский М.И. Изменение прочности связи воды с макромолекулами у тканей зимующих древесных при формировании устойчивости к низким температурам // Проблемы физиологии и биохимии древесных растений: Тез. докл. III Всес. конф. - Петрозаводск, 1989. - С. 36-37.

34. АС 1511639 GOIN 13/04 Осмометр // Зинченко В.Д. Спубл. 30.09.89 Б.И. 1989, N 36.

35. Зинченко В.Д., Шетинский М.И. Исследование методом ЯМР молекулярной и протонной подвижности в системе вода-глицерин // Биохимические аспекты криповреждения и криозащиты клеточных систем: Сб. науч. тр. - Харьков: ИЛКИК АН Украины, 1989. - С. 58-63.

36. Зинченко В.Д., Мусатов В.И. Об изменении внутриклеточного pH в эритроцитах после замораживания-оттаивания под защитой 1,2-ПД // Биохимические аспекты криповреждения и криозащиты клеточных систем: Сб. науч. тр. - Харьков: ИЛКИК АН Украины, 1989. - С. 34-37.

37. Зинченко В.Д., Генсикский И.П., Шетинский М.И., Моисеев В.А. Состояние воды в куколках насекомых при температурах ниже 0°C по данным метода ЯМР и холодовые повреждения // Магнитный резонанс в биологии и медицине: Тез. докл. VIII Всесоюз. конф. - Черноголовка, 1990. - с. 49.

38. Мусатов В.И., Зинченко В.Д. Влияние охлаждения и криозащитных веществ на состояние 2,3-ДФГ в эритроцитах человека // Магнитный резонанс в биологии и медицине: Тезисы докл. VIII Всесоюз. конф. - Черноголовка, 1990. - С. 50.

39. Зинченко В.Д., Загнойко В.И., Трачевский В.В., Пашенко Е.А. Исследование фосфорсодержащих соединений в печени зимоспящих животных методом <sup>31</sup>P-ЯМР // Магнитный резонанс в биологии и медицине: Тезисы докл. VIII Всесоюз. конф. - Черноголовка, 1990. -

с. 51.

40. Грищенко В.И., Белоус А.М., Моисеев В.А., Загнойко В.И., Зинченко В.Д., Андриенко А.Н., Трачевский В.В., Пашенко Е.А. Метаболизм фосфорсодержащих соединений в печени длиннохвостых сусликов (*Citellus Undulatus*) при различных физиологических состояниях // ДАН СССР. - 1990. - 312, N 4. - С. 996-999.

41. Зинченко В.Д., Загнойко В.И., Мусатов В.И., Бжезовский В.М. О метаболизме некоторых фосфорсодержащих соединений в печени и эритроцитах зимоспящих животных методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР // Механизмы зимней спячки: Тез. докл. Всес. симп. - Махачкала, 1990. - С. 49.

42. Грищенко В.И., Белоус А.М., Моисеев В.А., Загнойко В.И., Зинченко В.Д., Андриенко А.Н., Трачевский В.В., Пашенко Е.А. Изучение метаболизма фосфорсодержащих соединений в печени длиннохвостых сусликов (*Citellus Undulatus*) методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР // Биохимия. - 1990. - 33, N 10. - С. 1860-1867.

43. Мануильский В.Д., Моисеев В.А., Зинченко В.Д., Щетинский М.И., Пачелская Л.Б. Протонный магнитный резонанс воды при изменениях оводненности древесных в зимний период // Физиология растений. - 1991. - 38, N 3. - С. 552-559.

44. Зинченко В.Д., Терентьев А.Н., Зинченко А.В., Мусатов В.И., Щетинский М.И. О состоянии воды в клетках *J. Pestis ev76* при замораживании-отогреве в присутствии криопротекторов проникающего и непроникающего типов // VII конференции по спектроскопии биополимеров: Тез. докл. - Харьков, 1991. - С. 109-110.

45. Щетинский М.И., Зинченко В.Д., Чеканова В.В., Ханина Л.А. О межмолекулярных взаимодействиях в водных растворах N-метилацетамида // Физико-химические процессы в криобиологических системах: Сб. науч. тр. - Харьков: ИПКиК АН Украины, 1991. - С. 166-170.

46. Мусатов В.И., Зинченко В.Д., Бжезовский В.М. Влияние криопротекторов на состояние 2,3-ДФГ в эритроцитах по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР // Физико-химические процессы в криобиологических системах: Сб. науч. тр. - Харьков: ИПКиК АН Украины, 1991. - С. 96-101.

47. Моисеев В.А., Зинченко В.Д., Нардид О.А. О некоторых молекулярных механизмах криозащиты биологических объектов // Физико-химические процессы в криобиологических системах: Сб. науч. тр. - Харьков: ИПКиК АН Украины, 1991. - С. 78-95.

48. Зинченко В.Д., Мусатов В.И., Моисеев В.А., Кушнир И.Э., Бабак О.Я. Применение метода  $^{31}\text{P}$ -ЯМР при некоторых заболеваниях печени // Научно-технические проблемы современной терапии: Тез. докл. Науч.-практ. конф. - Харьков, 1989. - С. 177-179.

49. Генсидкий И.П., Зинченко В.Д., Моисеев В.А., Щетинский М.И. ЯМР исследования фазового перехода воды у куколок американской бабочки *Hypantria Cunea Dr.* при низких температурах // Влияние охлаждения на биологические объекты: Сб. науч. тр. - Харьков: ИПКиК АН Украины, 1990. - С. 22-24.

50. А.С. 1642342 СССР GOIN 24/08, 33/483 Способ оценки проникновения веществ в клеточные суспензии / Зинченко В.Д., Щетинский М.И., Мусатов В.И., Моисеев В.А. Опубл. 15.04.91, Б.И. N 14.

51. Зинченко В.Д. Исследование метаболизма макроэргических соединений в криоконсервированных эритроцитах методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР // Успехи современной криобиологии: Тез. докл. II Международн. конф. - Харьков, 1992. - С. 72-73.

Ответственный за выпуск - академик АН Украины

В.Т. ГРИЩЕНКО

---

Подписано к печати 29.03.1994 г. Физ. п.л. 2.уч.-изд. 2.

Заказ 23, тираж 100 экз.

---

Ротапринт ФТИНТ АН Украины, Харьков-164, просп. Ленина, 47

462424

AB 29.781