

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ **ПОВЕРХНОСТНЫХ ЯВЛЕНИЙ**

УДК 535:537:539:546

ГИДРАТНЫЕ СТРУКТУРЫ В ЧАСТИЧНО ДЕГИДРАТИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ПО ДАННЫМ ^1H ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

В.В. Туров, В.М. Гунько, С.В. Керусь

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, 03164 Киев-164*

Незамерзающие вода и водно-органические смеси, связанные в частично обезвоженных клетках костного мозга, выделенного из трубчатых костей курицы, были изучены методом ^1H ЯМР спектроскопии при 210 – 290 К. ^1H ЯМР спектры внутриклеточной воды включают два сигнала: сильно- (SAW, химический сдвиг протонного резонанса $\delta_{\text{H}} = 4...5$ м. д.) и слабоассоциированной воды (WAW, $\delta_{\text{H}} = 1,2...1,7$ м. д.), которые могут быть также разделены на слабо- (замерзает при $260 < T < 273$ К) и сильносвязанную (замерзает при $T < 260$ К) внутриклеточную воду. Такие растворители, как ацетонитрил-d₃, хлороформ-d и диметилсульфоксид-d₆, добавленные к клеткам, по-разному изменяют структуру, свободную энергию Гиббса и молекулярную подвижность внутриклеточной воды. Максимальная фракция слабоассоциированной и минимальная фракция сильносвязанной воды наблюдаются во внутриклеточной воде при добавлении к клеткам ацетонитрила. Диметилсульфоксид увеличивает связывание, структурирование и понижает точку замерзания внутриклеточной воды.

Введение

В настоящее время при длительном хранении клеточных материалов в основном используют криоконсервирование и лиофилизацию [1 – 4]. При применении этих методов концентрация внутриклеточной воды уменьшается в десять и более раз. Такие сильно дегидратированные клетки представляют собой систему взаимосвязанных наноразмерных полостей, сформированных структурными элементами биополимеров, органелл и клеточных мембран, которые лишь частично заполнены водой. Если дегидратация осуществляется оптимальным путем, то во внутриклеточном пространстве обеспечиваются условия, необходимые для быстрой регидратации клеток и последующего возобновления их жизнедеятельности. Примером могут служить многие микроорганизмы, способные легко переходить в состояние анабиоза и быстро восстанавливать процессы активной жизнедеятельности [5]. Значительно труднее осуществляется переход в состояние анабиоза функционально дифференцированных клеток, хотя именно для них разработка эффективных способов длительного хранения представляет наибольший практический интерес. Проблемы, возникающие на этом пути, обусловлены плохой приспособляемостью дифференцированных клеток к глубокому обезвоживанию. Эти проблемы могут быть частично решены путем введения во внутриклеточное пространство некоторых веществ-медиаторов, устраняющих или ослабляющих негативное влияние дегидратации. С одной стороны, эти вещества могут удерживать некоторое количество воды и, тем самым, предотвращать слишком глубокую дегидратацию, а с другой – влиять на строение водных полиассоциатов в наноразмерных полостях, частично заполненных водой.

Следует отметить, что физико-химические свойства водных систем в ограниченном пространстве нанопор могут сильно отличаться от объемных. Это обусловлено тем, что в нанополостях сильное влияние поверхностных сил распространяется на весь объем [6 – 8], а возможность формирования типичной пространственной сетки водородных связей при $R < 1$ нм ограничена стерически. Водно-органические системы переходят в нанополостях в кластерное состояние, параметры которого контролируются минимумом свободной энергии и зависят от соотношения концентраций компонент, гидрофильно-гидрофобных свойств стенок и химической природы органических веществ. Кластерное строение воды широко обсуждается в литературе [9 – 11]. Для объемной воды наибольшее распространение получила икосаэдрическая (нанодоменная) модель воды, в которой предполагается, что первичный домен образован 280 молекулами воды, из которых на поверхности находится 120 молекул. Структура воды в нанодомене (~ 3 нм) соответствует структуре гексагонального льда [9]. В порах меньшего размера формируются кластеры с частично разрушенными водородными связями [12].

Разработка методов низкотемпературной ^1H ЯМР спектроскопии с послойным вымораживанием объемной и поверхностной фазы [13 – 16] позволяет рассчитывать количество связанной воды, ее термодинамические характеристики, а также распределение по размерам заполненных водой пор или наноразмерных полостей. Величина химического сдвига связанной воды позволяет оценивать среднее число водородных связей, в которых участвует каждая молекула воды. При этом учитывается, что молекула воды может образовывать четыре водородных связи со своими соседями. Поскольку химический сдвиг неассоциированной воды (газовая фаза, раствор в слабополярном растворителе) равен 1 – 1,5 м. д., а тетракоординированной воды во льду – 7 м. д. [17], можно считать, что формирование одной Н-связи для молекулы в качестве протонно-донора приводит к увеличению химического сдвига на 2,7 м. д. Исследования, выполненные для высокодисперсных, мезо- и микропористых адсорбентов [14] и некоторых биологических объектов [18, 19], показали, что при определенном гидрофобно-гидрофильном балансе поверхностных структур и размере пор вода может переходить в слабоассоциированное состояние, когда среднее число водородных связей, приходящихся на молекулу воды (как протонодонор), меньше единицы. Оказалось, что такая вода довольно широко распространена в природе. Она регистрируется в частично обезвоженных дрожжевых клетках [19], сухих семенах растений [20] и губчатой составляющей костной ткани [19].

Целью настоящей работы было определение структуры связанной воды в частично обезвоженных клетках костного мозга курицы и влияние на состояние этой воды добавок слабополярных и электронодонорных органических растворителей.

Результаты и их обсуждение

Клетки костного мозга. Основу красного костного мозга составляют ретикулярные клетки с длинными отростками и ретикулиновые волокна. В пространстве между ними располагаются островки гемопоэтических клеток. Костный мозг пронизан синусоидными капиллярами. К эндотелию капилляров примыкают макрофаги, образующие длинные отростки. В большом количестве присутствуют жировые клетки [21]. Красный костный мозг содержит также много созревающих эритроцитов, что придает костномозговому очагам гемопоэза красный цвет. Строма состоит из ретикулярных клеток с длинными отростками, ретикулиновых волокон, синусоидных капилляров и адипоцитов, составляющих почти половину объема костного мозга. Ретикулиновые волокна вместе с отростками ретикулярных клеток формируют трехмерную сетку и образуют полости, заполненные островками гемопоэтических клеток. Зрелые клетки

крови выходят в кровоток через щели в стенке синусоидных капилляров. Помимо кроветворения, в костном мозге, как и в селезенке и печени, происходит удаление из кровотока старых и дефектных клеток крови. Костный мозг играет центральную роль в иммунной защите, так как в нем образуются В-лимфоциты, а также присутствует большое количество плазматических клеток, синтезирующих антитела [21].

Для исследований использовали посмертный костный мозг курицы, хранившийся в течение 12 – 14 ч при 4 °С [22]. Миелокариоциты получали путем вымывания костного мозга из трубчатых костей буферным физиологическим раствором (0,01 М фосфатно-буферный раствор, рН 7,2 – 7,4; 0,15 М натрия хлорида), содержащим добавки гепарина и гентамицина. Суспензию клеток осаждали центрифугированием (10 мин при 1000 об/мин) при комнатной температуре. Надосадочную жидкость полностью удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 10-кратном объеме буферного физиологического раствора. После этого суспензию центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин при комнатной температуре, осадок клеток высушивали с помощью насоса при температуре 22 °С и взвешивали. Сухой остаток составлял 17,4 % от первоначальной массы образца.

На рис. 1 приведены фотографии выделенных клеток костного мозга, полученные на фазово-контрастном микроскопе с увеличением $\times 1000$. На фотографиях могут быть идентифицированы несколько типов клеток, находящихся на разных стадиях созревания. В дальнейших экспериментах разделение разных типов клеток не производилось, а для ЯМР исследований использовали дегидратированные образцы клеточной массы, полученной в результате высушивания. Для этого навески клеточной массы (100 – 200 мг) помещались в стандартную 5 мм ампулу ЯМР и к ней добавлялись требуемое количество воды и органических веществ. Время установления адсорбционного равновесия составляло 1 – 2 ч.

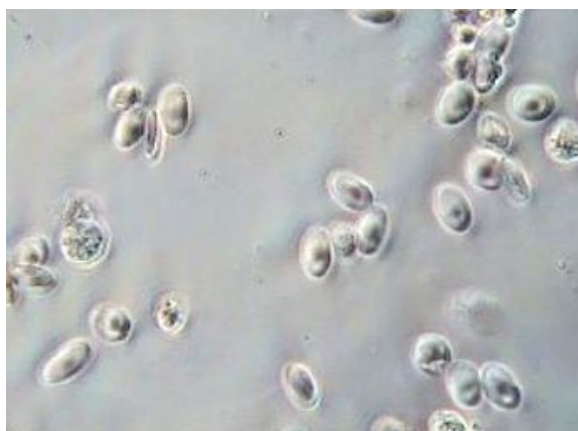


Рис. 1. Микрофотография клеток костного мозга курицы $\times 1000$.

^1H ЯМР спектроскопия. Спектры ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400. Температуру регулировали с точностью ± 1 К, используя термоприставку Bruker VT-1000. Интенсивности сигналов определяли с точностью ± 10 %. Для предотвращения переохлаждения суспензий спектры ^1H ЯМР незамерзающей воды записывали при нагревании суспензий, предварительно охлажденных до температуры 210 К.

Способ определения характеристик межфазных слоев воды с помощью ^1H ЯМР спектроскопии подробно изложен в [14 – 16]. Он основан на влиянии межфазной границы на температуру фазового перехода вода – лед. Благодаря адсорбционным взаимодействиям температура замерзания межфазной воды понижается тем сильнее, чем уже поры. Свободная энергия льда с понижением температуры изменяется по линейному закону [23]. Поэтому изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) может быть расчи-

тано по понижению температуры ($273 - T$) фазового перехода вода – лед. Площадь, ограниченная графиком $\Delta G(C_{uw})$, определяет величину межфазной энергии (γ_s), которая равна модулю суммарного понижения свободной энергии воды, обусловленному присутствием границы раздела фаз:

$$\gamma_s = A \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}, \quad (1)$$

где C_{uw}^{\max} – концентрация незамерзающей воды при $T \rightarrow 273$ К.

На графике зависимости $\Delta G(C_{uw})$ могут быть выделены участки, относящиеся к слабосвязанной ($\Delta G < -0,5$ кДж/моль) и сильносвязанной ($\Delta G > -0,5$ кДж/моль) воде. Слабосвязанная вода замерзает при температуре вблизи 273 К. Сильносвязанная вода может не замерзнуть даже при сильном охлаждении [16]. Количественные (C_{uw}^s и C_{uw}^w для сильно- и слабосвязанной воды соответственно) и энергетические (ΔG^s и ΔG^w) характеристики слоев связанной воды могут быть получены экстраполяцией соответствующих участков кривых $\Delta G(C_{uw})$ к осям абсцисс и ординат. По способности молекул межфазной воды образовывать водородные связи со своими соседями она подразделяется на сильно- ($\delta_H \sim 3 \dots 5$ м. д.) и слабоассоциированную ($\delta_H \sim 1 \dots 2$ м. д.). В случае, когда процесс перехода воды в слабоассоциированное состояние энергетически выгоден, слабоассоциированная вода является сильносвязанной и замерзает при очень низкой температуре. Если же формирование слоя слабоассоциированной воды определяется в основном энтропийным фактором, то слабоассоциированная вода может быть слабосвязанной.

Процесс замерзания воды в узких внутриклеточных полостях может быть описан уравнением Гиббса – Томпсона [24]:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl} T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (2)$$

где $T_m(R)$ – температура плавления льда, локализованного в порах (пустотах) радиусом R , $T_{m,\infty}$ – температура плавления объемного льда, ρ – плотность твердой фазы, σ_{sl} – энергия взаимодействия твердого тела с жидкостью, ΔH_f – объемная энтальпия плавления. Это уравнение может быть использовано для расчета распределений пор по размерам (IPSD) на основе зависимостей $C_{uw}(T)$.

На рис. 2 приведены спектры ^1H ЯМР воды в частично дегидратированных клетках костного мозга курицы, содержащих 20 % масс остаточной воды и добавки органических растворителей – CDCl_3 (*б*) CD_3CN (*в*, *г*) $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (*д*, *е*). В исходном образце (рис. 2, *а*) вода регистрируется в виде одиночного сигнала с химическим сдвигом в области $\delta \sim 5$ м. д., что совпадает с химическим сдвигом жидкой воды и, в соответствии с классификацией, приведенной в [14], может быть отнесена к сильноассоциированной воде. С понижением температуры интенсивность сигнала воды уменьшается так, что при $T < 230$ К он перестает регистрироваться в спектрах высокого разрешения. При этом ширина сигнала возрастает вследствие уменьшения молекулярной подвижности воды [25]. На правом крыле сигнала сильноассоциированной воды в области $\delta \sim 1$ м. д. можно различить слабый сигнал слабоассоциированной воды, интенсивность которого быстро убывает с понижением температуры.

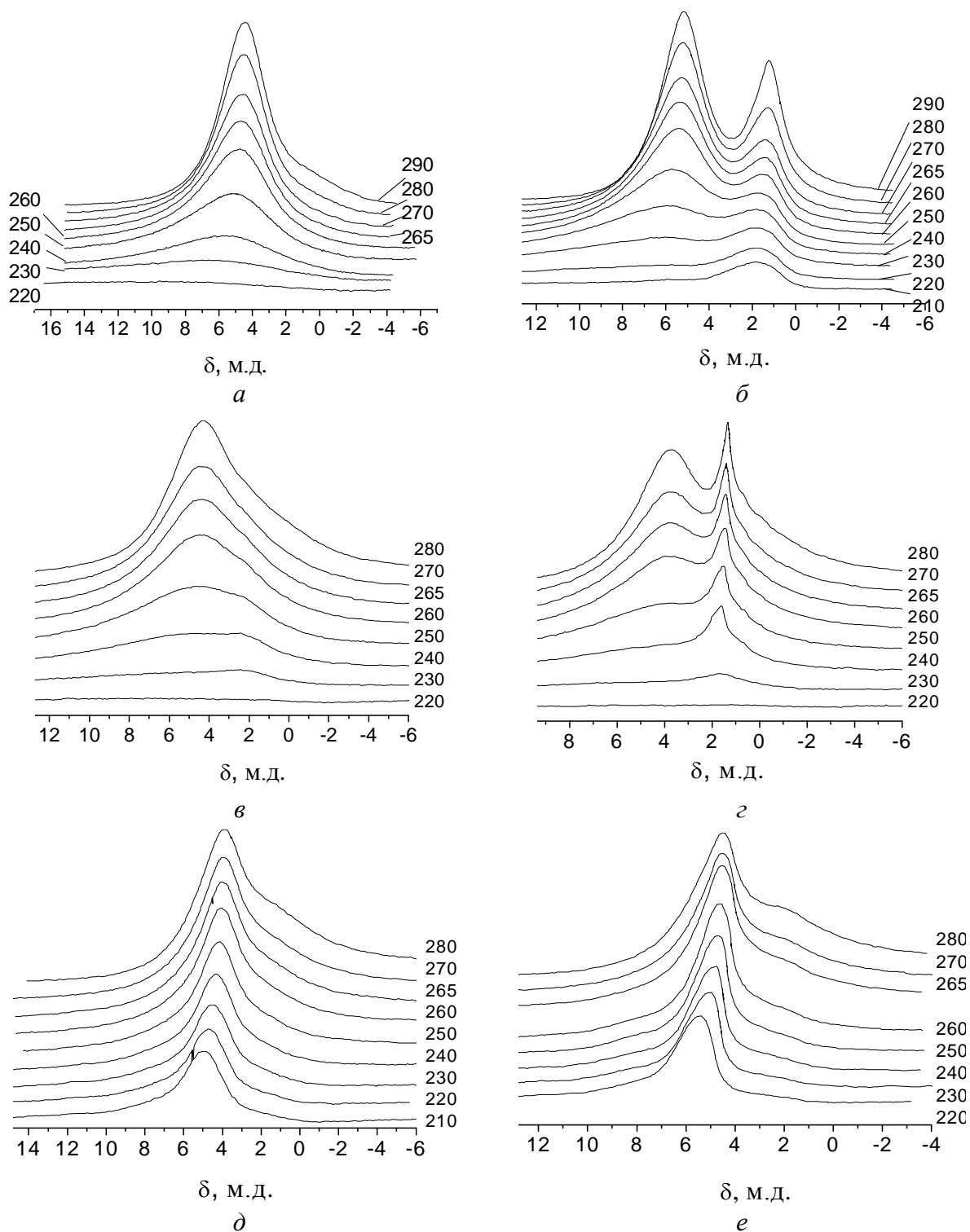


Рис. 2. Незамерзающая вода в частично дегидратированных клетках костного мозга курицы, содержащих 20 % масс. остаточной воды: *a* – исходных; *b* – с добавкой 2 г/г CDCl_3 ; *c* – 0,4 г/г CD_3CN ; *d* – 0,4 г/г DMSO-d_6 ; *e* – 0,8 г/г DMSO-d_6 . Температура указана в К.

Среда дейтерохлороформа полностью изменяет вид спектров внутриклеточной воды (рис. 2, б). Под влиянием хлороформа более трети воды из сильноассоциированной превращается в слабоассоциированную. Эта вода не замерзает вплоть до температуры 210 К, следовательно, она может быть идентифицирована как сильносвязанная [16]. К

аналогичным изменениям в спектрах внутриклеточной воды приводят добавки ацетонитрила, который в отличие от хлороформа может смешиваться с водой в любых пропорциях (рис. 2, в, з). Спектры на рис. 2, в относятся к случаю, когда весь добавленный к образцу ацетонитрил поглощается клеточной массой, а рис. 2, з – при наличии на поверхности образца жидкой пленки ацетонитрила. Хотя спектры, приведенные на рис. 2, в, и похожи на те, которые наблюдаются для исходного образца (рис. 2, а), сигнал слабоассоциированной воды в них имеет несколько большую интенсивность, которая возрастает с понижением температуры и ростом концентрации ацетонитрила (рис. 2, з).

Некоторые отличия наблюдаются при введении в клетки сильного электронодона – диметилсульфоксида (рис. 2, д, е), который широко используется как эндоцеллюлярный криоконсервант [1]. Хотя в спектрах и появляется сигнал слабоассоциированной воды, его интенсивность невелика. Она не превышает 15 % от общей интенсивности сигнала внутриклеточной воды. В отличие от данных, приведенных на рис. 2, б – з, слабоассоциированная часть внутриклеточной воды остается слабосвязанной и с понижением температуры замерзает. В то же время сильноассоциированная вода в присутствии ДМСО-d6 замерзает при значительно более низкой температуре, т.е. становится сильносвязанной. Можно было ожидать, что при введении в клетки столь сильного электронодона, как ДМСО, пространственная сетка Н-связей сильноассоциированной воды будет существенно разрушена (химический сдвиг воды, растворенной в ДМСО, составляет 3,5 м. д.). Однако из рис. 2, д, е следует, что несмотря на значительную концентрацию ДМСО, химический сдвиг сильноассоциированной воды не только не уменьшается, но даже несколько возрастает.

На рис. 3 приведены зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды, а на рис. 4 – химического сдвига воды (δ_H) и величины $\frac{dC_{uw}(T)}{dT}$ от величины ΔG для сильно- и слабоассоциированной воды. Расчеты выполняли путем деконволюции спектров и интегрирования кривых, относящихся к разным типам связанной воды. Характеристики слоев связанной воды, рассчитанные по зависимостям $\Delta G(C_{uw})$ для слабо- и сильноассоциированной воды, а также величины межфазной энергии, приведены в таблице.

Таблица. Характеристики слоев связанной воды внутри клеток костного мозга курицы, содержащих 20 % масс. остаточной воды, в присутствии органических растворителей

Орг. раств.	Конц. г/г	Сильноассоциированная вода				Слабоассоциированная вода			
		C_{uw}^s , мг/г	C_{uw}^w , мг/г	ΔG^{\max} , кДж/моль	γ^s , Дж/г	C_{uw}^s , мг/г	C_{uw}^w , мг/г	ΔG^{\max} , кДж/моль	γ^s , Дж/г
-	-	170	-	-2	9,2	-	30	-2	-
CDCl ₃	1	130	-	-2,2	6,9	55	15	-3,5	5,8
	2	125	-	-2,5	6,7	60	15	-3,5	5,9
CD ₃ CN	0,2	160	-	-2	8,4	40	-	-	-
	0,4	110	-	-2	4,6	60	30	-2	3,1
	0,8	70	-	-2	2,8	80	50	-2	4,5
(CD ₃) ₂ SO	0,2	120	20	-2,25	11,8	-	60	-1	1,2
	0,4	130	15	-3	16,1	-	55	-1	1,4
	0,8	145	-	-3	16,4	10	45	-1	1,3

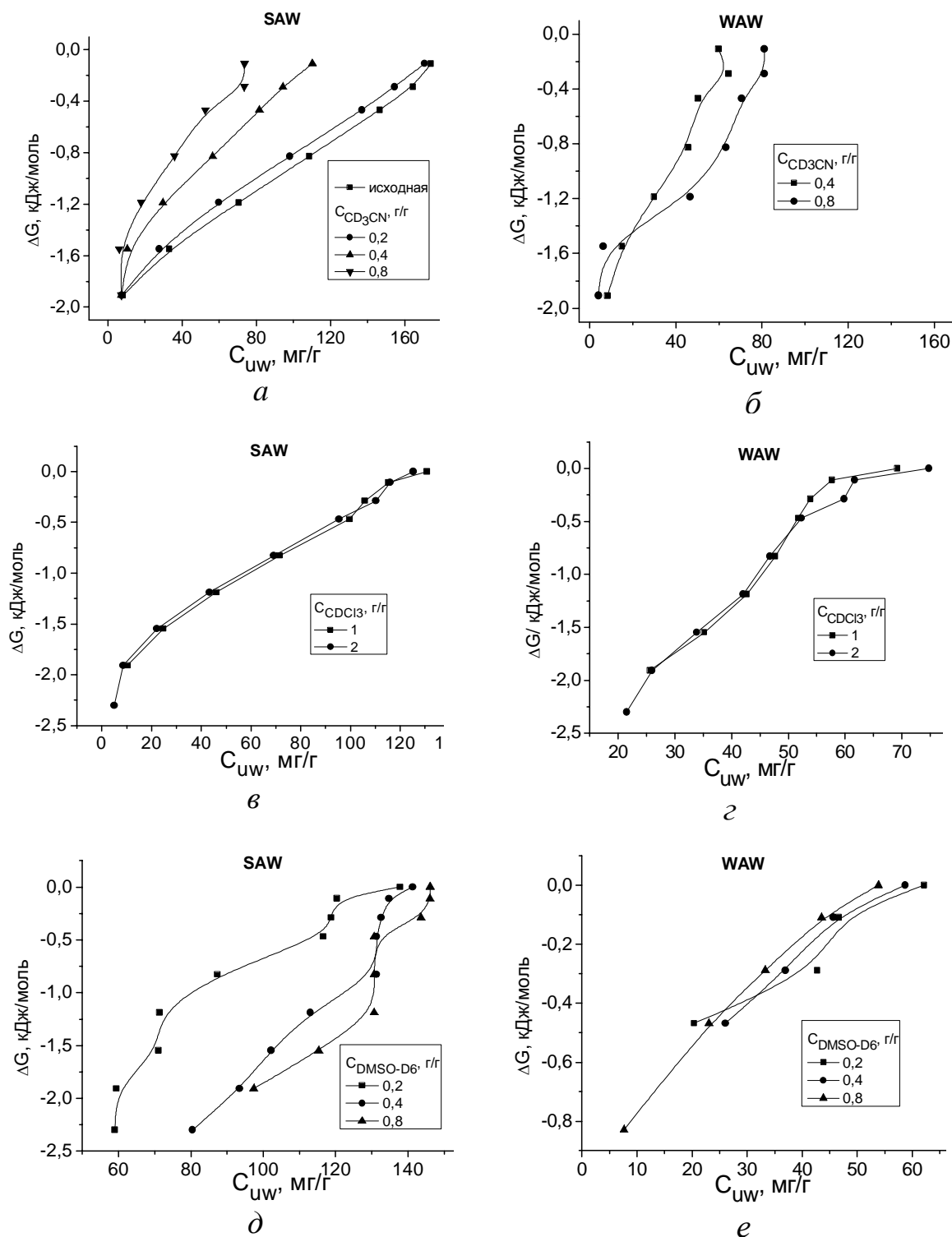


Рис. 3. Зависимости изменения свободной энергии Гиббса незамерзающей воды в клетках костного мозга курицы, содержащих добавки CD_3CN (а, б), $CDCl_3$ (в, г) и $(CD_3)_2SO$ (д, е), где SAW – сильно- и WAW – слабоассоциированная вода.

В выбранном диапазоне изменения концентрации органической компоненты в присутствии хлороформа треть воды из сильноассоциированной превращается в слабоассоциированную. Поскольку межфазная энергия (γ_s) характеризует суммарное понижение свободной энергии воды, обусловленное наличием границы раздела фаз или

наличием органической составляющей, можно заключить, что среда хлороформа увеличивает межфазную энергию почти в полтора раза. Вся сильноассоциированная и значительная часть слабоассоциированной воды является сильносвязанной. Величина ΔG^{max} , которая характеризует изменение свободной энергии в слое воды, граничащем с поверхностью раздела фаз, существенно меньше для слабоассоциированной воды. Присутствие в клетках ацетонитрила сопровождается некоторым уменьшением величины γ_s . При этом с ростом количества органической составляющей вклад от сильносвязанной воды в слое сильноассоциированной воды уменьшается, а в слое слабоассоциированной – возрастает. Однако величина ΔG^{max} для обоих типов связанной воды остается практически такой же, как и в исходном образце (см. табл.). ДМСО, проникая в клетки, существенно повышает межфазную энергию внутриклеточной воды. С ростом концентрации ДМСО в слое сильноассоциированной воды концентрация сильносвязанной воды возрастает, а в слое слабоассоциированной воды количество слабосвязанной воды уменьшается. При высокой концентрации ДМСО величина ΔG^{max} достигает -3 кДж/моль.

Удобным способом изучения трансформации структурных и энергетических характеристик кластеров воды под влиянием внешних факторов (органической среды и изменения температуры) может служить анализ зависимостей $\frac{dC_{uw}}{dT}(\Delta G)$ и $\delta(\Delta G)$

(рис. 4). Перегибы на зависимостях $\Delta G(C_{uw})$ (рис. 3) свидетельствуют об энергетической неоднородности слоев сильно- или слабоассоциированной воды. Эти перегибы на зависимостях $\frac{dC_{uw}}{dT}(\Delta G)$ проявляются в виде максимумов, разделяющих разные типы

связанной воды. Так, максимум в области $\Delta G \sim 0,5$ кДж/моль разделяет сильно- и слабосвязанную воду. На рис. 4, *а – в* он регистрируется как для сильно-, так и для слабоассоциированной воды. Максимумы, лежащие в области более высоких или более низких значений ΔG , отвечают замерзанию воды во внутриклеточных полостях определенного размера либо реорганизации структуры водно-органических систем, которая происходит при определенных температуре и соотношениях концентрации водной и органической компонент (рис. 4). О реорганизации вещества можно судить также по изменению химического сдвига сильно- и слабоассоциированной воды. В присутствии электронодонорных органических растворителей, ацетонитрила и ДМСО (рис. 4, *а, в*) с ростом $-\Delta G$ (уменьшением температуры) химический сдвиг сильно- и слабоассоциированной воды имеет тенденцию роста, что свидетельствует об увеличении ассоциированности воды. При этом может возрастать как среднее число водородных связей между молекулами воды (самоассоциация), так и происходить формирование кластеров вода – электронодонор. В присутствии хлороформа (рис. 4, *б*) химический сдвиг воды с ростом $-\Delta G$ (уменьшением температуры) уменьшается, что обусловлено стабилизацией менее ассоциированных форм воды.

Распределение по размерам заполненных водой пустот в клетках костного мозга, рассчитанное в соответствии с уравнением (2), и влияние на них присутствия органических растворителей разной химической природы показаны на рис. 5. В соответствии с данными рис. 5 вода в дегидратированных клетках костного мозга находится в полостях с радиусами 2,5 и 5 нм, причем в узких порах сосредоточена преимущественно слабоассоциированная вода (рис. 5, *а*, кривая 1). В присутствии $CDCl_3$ вода в этих полостях из сильноассоциированной превращается в слабоассоциированную (рис. 5, *б*). Кроме того, в среде $CDCl_3$ происходит реорганизация внутриклеточного пространства формированием полостей большего размера. При добавках CD_3CN внутренняя структура полостей сохраняется. С ростом концентрации CD_3CN слабоассо-

цированная вода вначале заполняет полости со средним радиусом $R \sim 2,5$ нм, а затем при $R \sim 5$ нм (рис. 5, а). Присутствие ДМСО-d6 влечет за собой коренную перестройку внутриклеточного пространства (доступного для водно-органической смеси), которая зависит от концентрации добавки (рис. 5, в). Формируются узкие поры с радиусом < 1 нм и поры с радиусами 2 и 20 нм. В отличие от других систем наиболее узкие поры в присутствии ДМСО-d6 заполняются преимущественно сильноассоциированной водой.

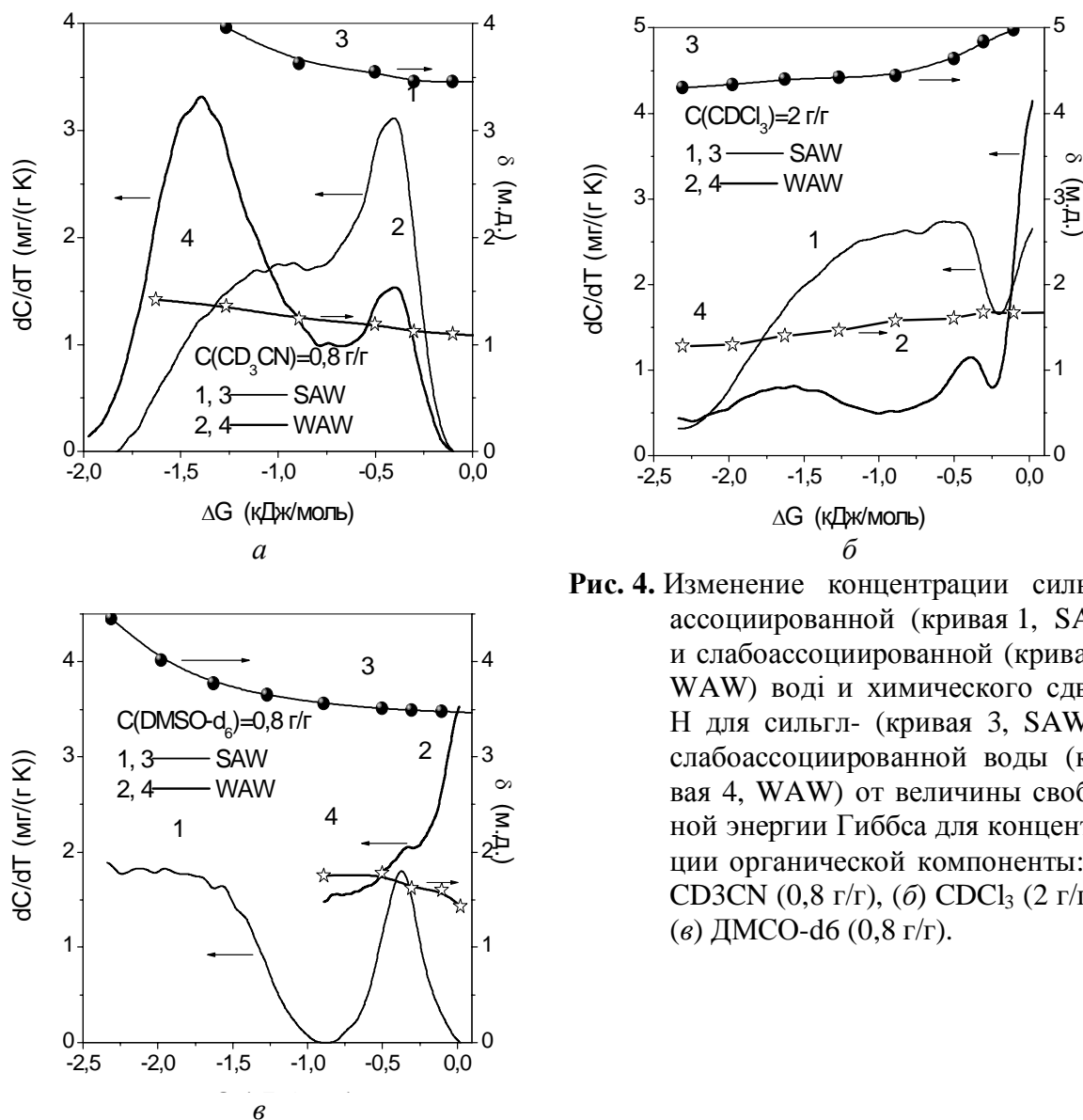


Рис. 4. Изменение концентрации сильноассоциированной (кривая 1, SAW) и слабоассоциированной (кривая 2, WAW) воды и химического сдвига Н для сильгл- (кривая 3, SAW) и слабоассоциированной воды (кривая 4, WAW) от величины свободной энергии Гиббса для концентрации органической компоненты: (а) CD₃CN (0,8 г/г), (б) CDCl₃ (2 г/г), и (в) ДМСО-d6 (0,8 г/г).

Таким образом, водно-органические смеси внутри частично дегидратированных клеток костного мозга существуют в виде некоторой пространственно неоднородной (кластерной) системы, в которой вода входит в состав кластеров разного типа. Поскольку слабо- и сильноассоциированная вода наблюдаются отдельно, молекулярный обмен между разными типами кластеров осуществляется медленно (в шкале времени ЯМР). Строение формирующихся во внутриклеточных наноразмерных полостях водно-органических кластеров зависит от природы органической добавки. Ранее при изучении оксидных материалов [26 – 28] было показано, что слабополярные органические вещества уменьшают взаимодействие водных полиассоциатов со слабогидрофильной поверхностью. В результате происходит такая перестройка системы, что с поверхностью граничит слабополярная компонента, а сильноассоциированная вода вытесняется в поры

большого размера. В рассматриваемой нами системе подобное явление если и происходит, то оно накладывается на процессы изменения строения внутренних полостей.

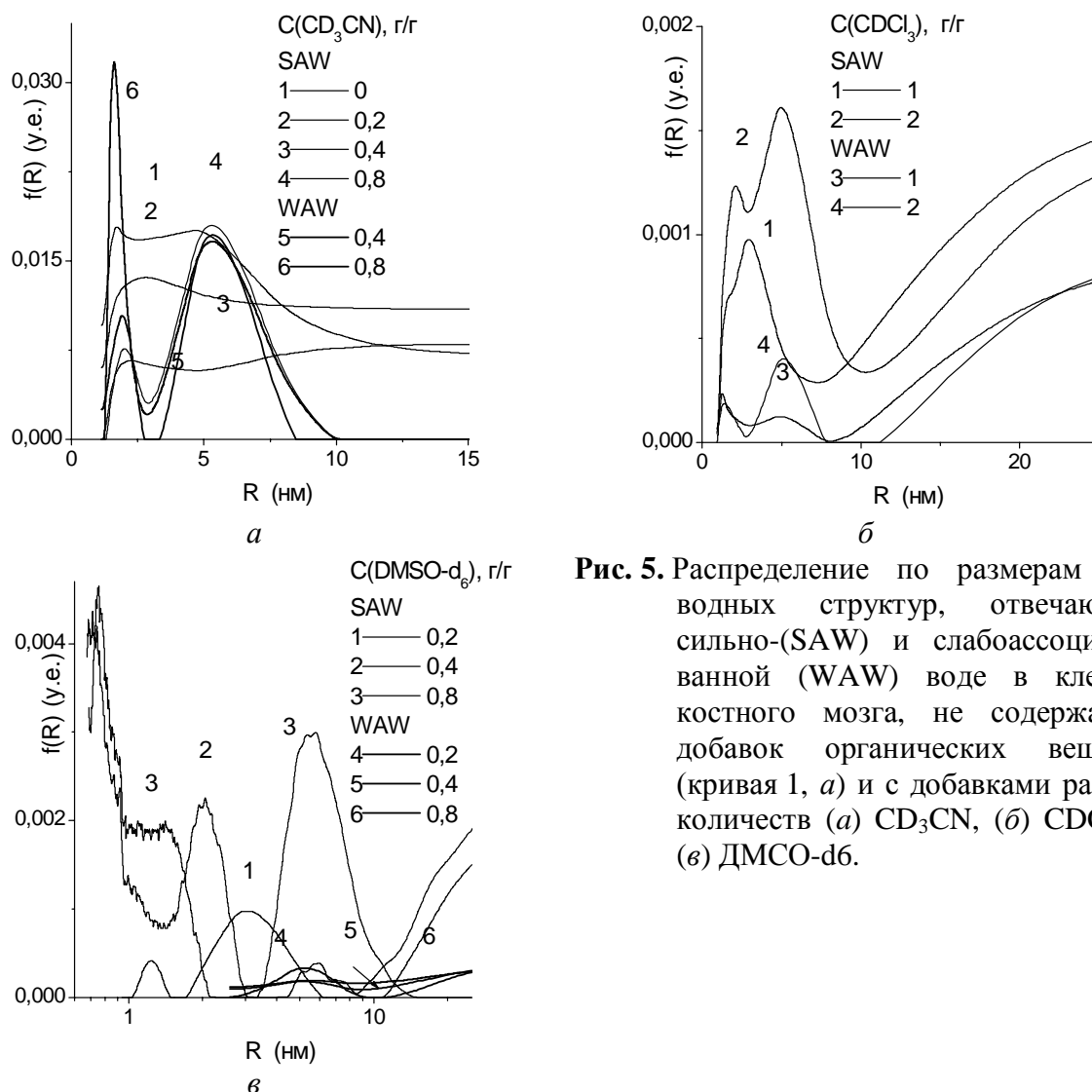


Рис. 5. Распределение по размерам пор водных структур, отвечающих сильно-(SAW) и слабоассоциированной (WAW) воде в клетках костного мозга, не содержащих добавок органических веществ (кривая 1, а) и с добавками разных количеств (а) CD_3CN , (б) CDCl_3 и (в) DMCO-d_6 .

Появление большого количества сильносвязанной, но слабоассоциированной воды при сохранении параметров взаимодействия сильноассоциированной воды с поверхностью может быть связано с такими конформационными изменениями стенок наноразмерных полостей, в результате которых затрудняется формирование нанодоменов воды и стабилизируются слабоассоциированные формы воды. Ацетонитрил заметно уменьшает взаимодействие воды со стенками полостей. Поэтому можно полагать, что в кластерах вода – ацетонитрил с поверхностью контактируют преимущественно молекулы ацетонитрила. Гомогенный раствор вода – ацетонитрил в порах не образуется, поскольку химический сдвиг воды в широком температурном диапазоне слабо зависит от присутствия ацетонитрила (рис. 1). Значительное увеличение межфазной энергии в присутствии ДМСО может быть связано с такой реорганизацией внутриклеточного вещества, которая приводит к значительному уменьшению размеров полостей.

Для таких сложных объектов, как клетки, эффект кластерообразования воды облегчается малыми размерами внутренних полостей и специфичностью пространственно разделенных полостей к кластерам разного типа. В результате под влиянием добавок органических веществ происходит структурная и энергетическая дифференци-

ация внутриклеточной воды. Для частично дегидратированных клеток костного мозга, в отличие от изученных ранее дрожжевых клеток [30], добавки как слабополярных, так и электронодонорных растворителей стабилизируют не сильноассоциированную, а слабоассоциированную форму воды. Под влиянием органических растворителей пространственные характеристики внутренних полостей в клетках изменяются. Увеличивается количество полостей с меньшим радиусом. В присутствии хлороформа именно в них стабилизируются кластеры, слабоассоциированной воды. При введении ДМСО уменьшаются размеры внутренних полостей, заполненных сильноассоциированной водой (связывание воды с поверхностью возрастает). При высокой концентрации ДМСО слабоассоциированная вода, хотя и регистрируется в спектрах, локализуется в полостях большего размера, чем в случае хлороформа.

Выводы

В сложных биологических объектах, таких, как клетки костного мозга, методом ^1H ЯМР спектроскопии могут быть зарегистрированы четыре типа внутриклеточной воды: слабо- ($\Delta G > -0,8$ кДж/моль) и сильно- ($\Delta G < -0,8$ кДж/моль) связанная вода и слабо- ($\delta_{\text{H}} \sim 1,2 \dots 1,7$ м.д.) и сильно- ($\delta_{\text{H}} \sim 4 \dots 5$ м.д.) ассоциированная вода. Формирование малых кластеров внутриклеточной воды или водно-органических смесей обусловлено эффектами ограниченного пространства и наличием функциональных групп в биомакромолекулах с различными гидрофобно-гидрофильными свойствами, по-разному взаимодействующих с водой и органическими молекулами. Поэтому добавки определенных количеств органических растворителей приводят к структурной (отражающейся на величине δ_{H}) и энергетической (ΔG) дифференциации внутриклеточной воды. Для частично дегидратированных клеток костного мозга добавка слабополярных или слабоэлектронодонорных растворителей (хлороформ, ацетонитрил) или сильного электронодонора – ДМСО сильнее стабилизирует слабоассоциированную воду. Под влиянием органических растворителей характеристики внутриклеточных структур существенно изменяются, причем эти изменения отражаются на свойствах внутриклеточной воды и зависят от типа выбранного растворителя. Кластерообразование с участием внутриклеточной воды наиболее сильно проявляется в присутствии ДМСО, в то время как ацетонитрил вызывает лишь небольшие изменения кластерной структуры воды. Вероятно, такая способность ДМСО и позволяет использовать его как эффективный криопротектор при низкотемпературном консервировании клеточных объектов. Проведение подобных ЯМР исследований с использованием различных типов криопротекторов позволит значительно углубить наше понимание механизма их действия и усовершенствовать способы длительного хранения функционально дифференцированных клеток.

Литература

1. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*. – 2003. – V. 46. – P. 205 – 229.
2. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization / Y. Han, G.B. Quan, X.Z. Liu, E.P. Ma, A. Liu, P. Jin, W. Cao // *Cryobiology*. – 2005. – V. 51. – P. 152 – 164.
3. Karlson J.O.M., Toner M. Long-term storage by cryopreservation: critical issues // *Biomaterials*. – 1996. – V. 17. – P. 243 – 256.
4. Yoon Y., Pope J., Wolfe J. Freezing stresses and hydration of isolated cell walls // *Cryobiology*. – 2003. – V. 46. – P. 271 – 276.
5. Feofilova E.P. Deceleration of vital activity as a universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2003. – V. 39. – P. 5 – 24.

6. Derjaguin B.V., Churaev N.V., Muller V.M. Surface forces. – N. Y.: Consult. Bureau.– 1987. – P. 356.
7. Israelachvili J., Adams G.E. Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous electrolyte solutions in the range 0-100 nm // J. Chem. Soc. Faraday Trans. – 1978. – V. 174. – P. 975 – 1001.
8. Israelachvili J.N., Wennerstrom H. Hydration or steric forces between amphilic surfaces? // Langmuir. – 1990. – V. 6. – P. 873 – 876.
9. Wiggins P.M. Role of water in some biological proceses // Microbiol. Rev. –1990. – V. 54. – P. 432 – 439.
10. Wiggins P.M. High end low density water in gel // Progr. Polim. Sci. – 1995. – V. 20. – P. 1121 – 1163.
11. Chaplin M.F. A proposal for structuring of water // Biophys. Chem. – 1999.– V. 83. – P. 211 – 221.
12. Bernal J.D., Fowler R.H. A theory of water and ionic solutions with particular reference to hydrogen and hydroxyl ions // J. Chem. Phys. – 1933. – V. 1. – № 8. – P. 515 – 517.
13. Gun'ko V. M., Turov V. V. Structure of hydrogen bonds and ¹H NMR spectra of water at the interface of oxides// Langmuir. – 1999 – V. 15. – P. 6405 – 6415.
14. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, R. Leboda, E.V. Goncharuk, A.A. Novza, A.V. Turov, A.A. Chuiko // Adv. Coll. Interf. Sci. – 2005. – V. 118. – P. 125 – 172.
15. Turov V.V., Leboda R. ¹H NMR Spectroscopy of adsorbed molecules and free surface energy of carbon adsorbents // Phys. Chem. Carbons. – 2000.– V. 27. – P. 67 – 124.
16. Turov V.V., Leboda R. Application of ¹H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // Adv. Coll. and Interf. Sci. – 1999. – V. 79. – P. 173 – 211.
17. Kinney D.R., Chaung I-S., Maciel G.E. Water and the silica surface as studied by variable temperature high resolution ¹H NMR. // J. Am. Chem. Soc. – 1993. – V. 115. – P. 6786–6794.
18. Weakly and strongly associated nonfreezable water bound in bones / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, R. Leboda, Jablonski M., M. Gorzelak, E. Jagiello-Wojtowicz // Coll. and Surf. – 2006. – V. 48. – P. 167 – 175.
19. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, P.P. Gorbyk, E.M. Pakhlov, R. Leboda, O.V. Shulga, A.A. Chuiko // J. Coll. Interf. Sci. – 2005. – V. 283. – № 2. – P. 329 – 343.
20. Слабоассоциированная вода в биологических объектах и на межфазной границе кремнеземов / В.М. Гунько, С.П. Туранская, О.В. Нечипор, Е.В. Юхименко, В.В. Туров, А.А. Чуйко // Химия, физика и технология поверхности. – 2006. – Вып. 11 – 12. – С. 397 – 430.
21. Гистология / Э.Г. Улумбеков, Ю.А. Челышев, Н.В. Бойчук, Р.Р. Исламов, С.Л. Кузнецов. – М.: Геотар-Мед., 2002. – 672 с.
22. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application / M. Kondo, A.J. Wagers, M.G. Manz, S.S. Prohaska, D.C. Scherer, G.F. Beihack et al. // Annu. Rev. Immunol. – 2003. – V. 21. – P. 759 – 806.
23. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. Глушко В.П. – М.: Наука, 1978. – Т. 1.
24. Atkins B.D., Davis B.H. Experimental data for a network effect in nitrogen desorption // Langmuir. – 1987. – V. 3. – P. 722 – 725.
25. Abragam A. The principles of nuclear magnetism. – Oxford: Oxford University. – 1961.

26. Influence of organic solvents on interfacial water at surface of silica gel and partly silylated fumed silica / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, M.D. Tsapko et al. // Appl. Surf. Sci. – 2004. – V. 229. – P. 197 – 313.
27. Совместная адсорбция бензола и воды наноразмерными углеродными трубками / В.В. Туров, Г.П. Приходько, С.Я. Бричка, М.Д. Цапко // Журн. физ. химии – 2006. – Т. 80. – № 4. – С. 689 – 694.
28. Behaviour of pure water and water mixture with benzene or chloroform adsorbed onto ordered mesoporous silica / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, A.V. Turov, V.I. Zarko, V.I. Gerda, V.V. Janishpolski, I.S. Berezovska, V.A. Tertykh // Central Europ. J. Chem. – 2007. – V. 5. – № 2. – P. 420 – 454.
29. Emsley J.W., Feenej J., Sutcliffe L.H. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. – Oxford: Pergamon press. – 1965.

INTRACELLULAR WATER IN PARTIALLY DEHYDRATED BONE MARROW CELLS STUDIED BY ¹H NMR SPECTROSCOPY

V.V. Turov, V.M. Gun'ko, S.V. Kerus

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine General
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv-164*

*Nonfreezable water and water/organic solvent mixtures bound in partially dehydrated marrow cells released from tubular bones of broiler chickens has been studied using ¹H NMR spectroscopy at 210 – 290 K. The ¹H NMR spectra of intracellular water include two signals which can be assigned to strongly (SAW, chemical shift of the proton resonance $\delta_H = 4...5$ ppm) and weakly (WAW, $\delta_H = 1,2...1,7$ ppm) associated water which can be also divided into weakly (frozen at $260 < T < 273$ K) and strongly (unfrozen at $T < 260$ K) bound intracellular waters. Such solvents as acetonitrile-*d*₃, chloroform-*d* and DMSO-*d*₆ added to cells differently affect the structure, the Gibbs free energy, and the molecular mobility of intracellular water. A maximum fraction of WAW and a minimum fraction of strongly bound water are observed in intracellular water on addition of acetonitrile to cells. The opposite results are on addition of DMSO which enhances binding, structurization, and the freezing point depression of intracellular water.*