

В. Н. Кучков, В. Д. Зинченко

**Активность воды как показатель связывания криопротектора с эритроцитами***(Представлено академиком НАН Украины В. И. Грищенко)*

*За допомогою вдосконаленої моделі криоскопічного осмометра, який дозволяє визначати активність води в біологічних середовищах з точністю  $\pm 0,001 Aw$ , досліджено зміни активності води в суспензіях еритроцитів коня після додавання криопротекторів 1,2-пропандіолу, диметилсульфоксиду і гліцерину в концентраціях від 0,004 до 0,1% (мас.). Встановлено існування концентраційних областей криопротекторів, в яких дія криопротекторів на активність води відображає такі процеси взаємодії криопротектор/клітина, як адсорбція і конкурентне зв'язування криопротектора в гідратній оболонці клітинних структур.*

Взаимодействие криопротекторов с клетками является показателем того, что криопротекторы не являются инертными веществами по отношению к клеткам. Известно, что многие, наиболее часто используемые криопротекторы, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), глицерин (ГЛ), являются пертурбантами плазматических мембран и обладают способностью заменять гидратную воду, стабилизирующую конформацию белков, липидов и других биомолекул [1]. Токсичность данных веществ рассматривается с точки зрения гипотезы денатурации белков [2], согласно которой криопротекторы связывают воду, препятствуя тем самым нормальной гидратации белков и других макромолекул. В работе [3] в контексте токсичности криопротекторов рассмотрены перестройки внутриклеточной воды, индуцированные данными агентами, а также влияние каждого из них на макромолекулы (например, превращение глицерина в токсические вещества в ходе реакций метаболизма). Бакалчевой и др. [4] показано, что физико-химическая токсичность алканолов, диолов и глицерина при инкубировании с эритроцитами может быть результатом температурозависимых гидрофобных взаимодействий данных веществ с мембранами клеток, а также следствием их способности изменять диэлектрическую проницаемость среды и самой мембраны.

Реакционная способность ферментов в системе криопротектор–белок–вода при низкотемпературном хранении биообъектов зависит от состояния воды в системе, для характеристики которого в работе [5] используется такой показатель, как активность воды.

Термин “активность воды”, как и активность любого компонента раствора, известен из основ физической химии и представляет собой произведение коэффициента активности данного компонента раствора на его концентрацию [6]. Коэффициент активности — это функция, впервые введенная Льюисом [7], характеризующая изменения взаимодействия молекулы *i*-го компонента раствора между собой при переходе от разбавленного раствора к данному. Другими словами, изменение активности вещества, в том числе и воды, в растворе является индикатором межмолекулярных взаимодействий в рассматриваемой системе.

Среди экспериментальных методов определения активности воды наибольшее распространение получили методы, основанные на измерении давления насыщенного пара над

поверхностью образца, которое, согласно закону Рауля, является функцией активности воды. Эти методы имеют высокую точность и требуют малого времени для измерения (около 5 мин на одно измерение), однако для анализа необходимо значительное количество образца (рекомендуемый объем — около 7 мл). В то же время приборы с диэлектрическим датчиком влажности более низкого класса точности ( $\pm 0,02 A_w$  —  $\pm 0,01 A_w$ ) и не пригодны для исследования малых изменений активности воды ( $\pm 0,001 A_w$ ), к тому же длительность измерения составляет от 30 до 90 мин [8]. Метод криоскопии, обычно применяемый для нахождения молекулярных масс растворенных веществ или осмолярности растворов, может быть использован для определения активности воды в водных растворах.

Привлекательность данного метода состоит в использовании малых объемов исследуемого материала (около 0,15 мл) [9] и экспрессности получаемой информации (одно измерение занимает примерно 5 мин).

В настоящей работе приведены результаты изучения взаимодействия криопротекторов — 1,2-ПД, ДМСО и глицерина с эритроцитами лошади на основании анализа активности воды в суспензиях этих клеток. Главное внимание было уделено диапазону низких концентраций криопротекторов, где вклад адсорбционных взаимодействий криопротекторов с клетками существенный.

**Материалы и методы.** В качестве криопротекторов использовали 1,2-ПД, глицерин и ДМСО. Калибровочные растворы NaCl, по температурам замерзания которых определяли температуру замерзания исследуемых образцов, готовили согласно протоколу, прилагаемому к осмометру ОМКА 1Ц-01 (“Медлабортехника”, Одесса). Образцы цельной крови, взятые из яремной вены лошади, стабилизировали гепарином (ЗАТ “Біолік”, Украина).

*Измерение активности воды.* Лабораторные осмометры, применяемые в клинической практике, в большинстве случаев предназначенные для определения осмолярности биологических жидкостей, не требуют высокой точности. Такие осмометры не позволяют регистрировать малые изменения осмолярности растворов, которые возникают при малых вариациях концентрации осмотически активных веществ.

Для достижения необходимой точности измерения использовали охлаждающую и термоизмерительную системы осмометра ОМКА 1Ц-01 с модифицированной нами криоскопической ячейкой [10]. Объем кюветы составлял 0,12 мл. Погрешность определения активности воды не превышала  $\pm 0,001 A_w$ .

Ранее метод криоскопии использовали В. И. Шипулин, Г. А. Аксенова и Н. Д. Лупандина [11] для изучения показателей активности воды в мясных полуфабрикатах, С. Г. Юзов [9] — в высоковлажных продуктах, С. F. Fontan, J. Chirife [12] — в различных растворах электролитов и неэлектролитов.

Значения активности воды находили по формуле, полученной из уравнения Клаузиуса–Клапейрона [13]:

$$\ln(a) = \frac{L(T - T_0)}{\nu R T T_0}, \quad (1)$$

где  $a = P/P_0$  — активность воды;  $T_0$  и  $T$  — температуры замерзания чистой воды и исследуемого раствора соответственно;  $P_0$  и  $P$  — давление насыщенного пара над чистой водой и над исследуемым раствором соответственно;  $\nu$  — количество молей воды;  $L$  — теплота плавления льда;  $R$  — универсальная газовая постоянная.

*Схема эксперимента.* К четырехкратно отмытым эритроцитам лошади, ресуспендированным раствором хлорида натрия (300 mOsm), добавляли криопротекторы в различных

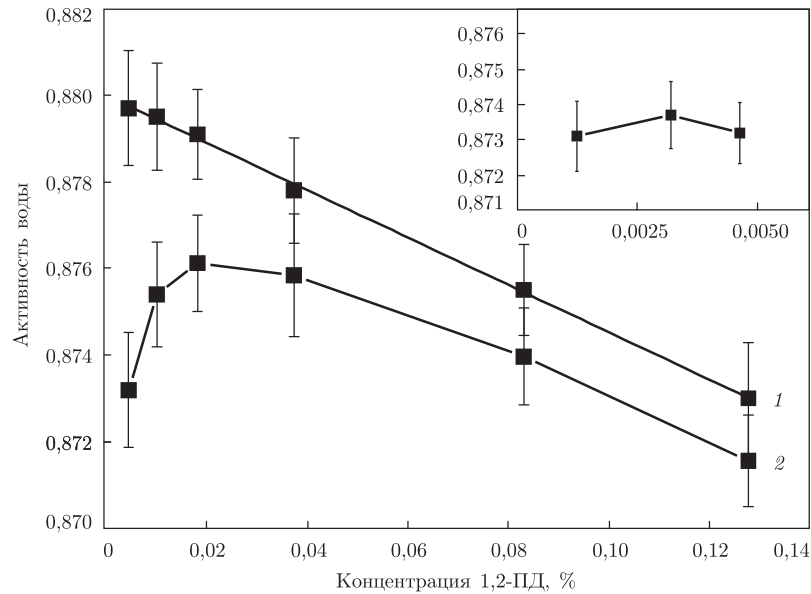


Рис. 1. Зависимость активности воды от концентрации 1,2-пропандиола в физиологическом растворе (0,15 М NaCl): 1 — без эритроцитов; 2 — в том же растворе в присутствии эритроцитов лошади (гематокрит 34%). На вставке показан фрагмент кривой 2 в диапазоне концентраций криопротектора от 0 до 0,004%

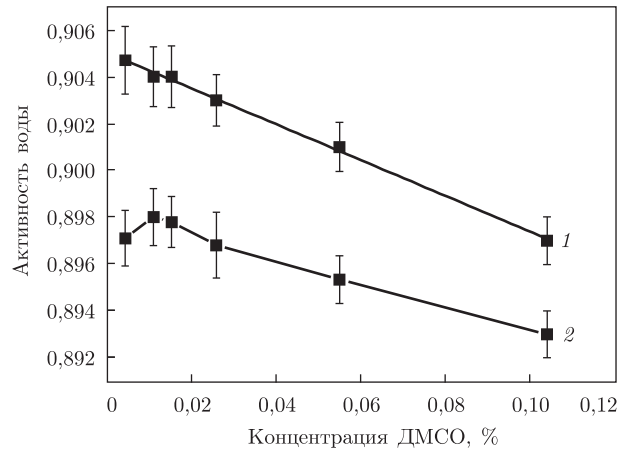


Рис. 2. Зависимость активности воды от концентрации диметилсульфоксида в физиологическом растворе (0,15 М NaCl): 1 — без эритроцитов; 2 — в том же растворе в присутствии эритроцитов лошади (гематокрит 52%)

концентрациях. Все образцы центрифугировали (3000 g 5 мин), после чего в измерительную кювету отбирали супернатант для определения температуры замерзания раствора.

Исследуемые растворы содержали криопротекторы в низких концентрациях (0,004–0,1%), что позволило оценить влияние адсорбционных взаимодействий криопротекторов с эритроцитами. Все значения концентраций здесь и далее указаны в массовых процентах.

Количество общей воды в образцах поддерживалось постоянным (варьировалось не более чем на 0,001 г при массе образца 1,100 г).

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1, 2, 3 (кривые 1) приведены зависимости активности воды от концентрации криопротекторов 1,2-ПД, ДМСО и глицерина, растворенных

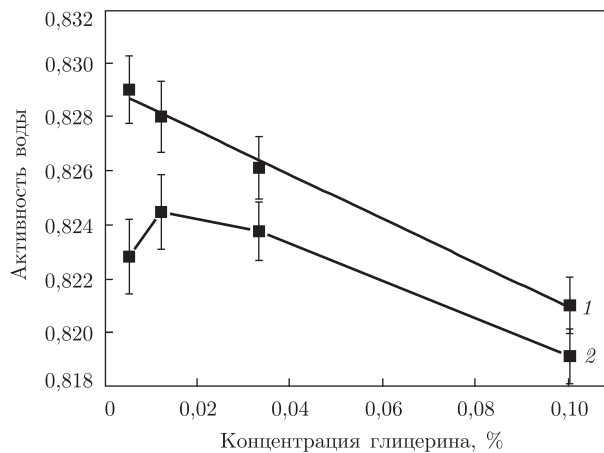


Рис. 3. Зависимость активности воды от концентрации глицерина в физиологическом растворе (0,15 М NaCl): 1 — без эритроцитов; 2 — в том же растворе в присутствии эритроцитов лошади (гематокрит 48%)

в изотоническом (0,15 М) растворе хлорида натрия без эритроцитов. Наблюдается линейное снижение активности воды при увеличении концентрации криопротектора от 0,004 до 0,1%.

Полученная экспериментальная зависимость хорошо согласуется с выражением (1) при малых значениях концентраций растворенных веществ, при которых логарифм может быть разложен в ряд по малым значениям аргумента и взят линейный член разложения. Отклонение от зависимости, описываемой выражением (1), указывает на образование молекулярных ассоциатов или диссоциацию растворенного вещества [14]. Следовательно, при добавлении криопротекторов в водный раствор хлорида натрия в данном концентрационном диапазоне не происходит образование молекулярных ассоциатов криопротектор–криопротектор или криопротектор–ион.

При внесении в такую систему эритроцитов для всех исследуемых криопротекторов наблюдается общее снижение активности воды в системе — значения активности воды на кривых 2 на рис. 1–3 смещены вниз относительно таковых для соответствующих растворов криопротекторов без клеток (кривые 1 на рис. 1–3). По нашему мнению, это обусловлено связыванием воды с самими клетками. Для проверки этого предположения мы измерили активность воды в растворе криопротектора одной и той же концентрации (0,0847%), но с разным содержанием клеток (рис. 4). С целью обеспечения точности измерений эксперимент проводили таким образом, чтобы общее количество воды в каждом из исследуемых образцов поддерживалось постоянным. Обычно готовилось такое количество образца, что в нем содержалось  $(0,968 \pm 0,001)$  г воды и варьировалось содержание других компонентов. Таким образом, устранялось влияние одной из переменных — общего содержания воды, в результате чего ее активность определялась только соотношением других компонентов системы.

Из рис. 4 видно, что активность воды достоверно снижается при увеличении гематокрита до 67,2%. Для глицерина и ДМСО наблюдалась аналогичная картина. Это является доказательством высказанного выше предположения, что активность воды снижается за счет увеличения доли воды, связанной с клетками, при увеличении их содержания в системе.

Обратимся к зависимостям, приведенным на рис. 1, 2, 3, кривые 2. При нулевой концентрации криопротектора снижение активности воды обусловлено именно действием клеток. Существует область низких концентраций криопротектора, в пределах которой вариации

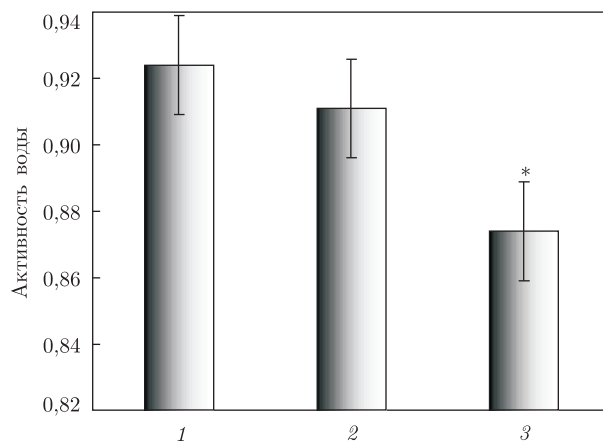


Рис. 4. Значение активности воды в суспензиях эритроцитов лошади с разным гематокритом, содержащих 0,0156% 1,2-ПД: 1 — физиологический раствор, содержащий 0,0156% 1,2-ПД, без клеток; 2, 3 — тот же раствор с эритроцитами с гематокритом 37,9 и 67,2% соответственно. \* — различие между контрольным раствором без клеток и исследуемой суспензией достоверно при  $p \leq 0,05$

его содержания в системе не влияют на активность воды. Это достаточно узкий диапазон концентраций — от 0 до 0,004, 0,005 и 0,0048% для 1,2-ПД, ДМСО и ГЛ соответственно (см. рис. 1, вставка). Мы объясняем это связыванием молекул криопротектора с клетками. Связываясь с клетками, молекулы криопротектора “выбывают из игры” и не влияют на активность воды в системе. При дальнейшем увеличении концентрации криопротектора следовало бы ожидать снижения активности воды в системе согласно выражению (1), поскольку общая концентрация растворенных веществ возрастает. Однако, как видно из рисунков, наблюдается, напротив, повышение активности воды с увеличением концентрации криопротектора в диапазоне концентраций от 0,004 до 0,098% для 1,2-ПД, от 0,005 до 0,025% для ДМСО и от 0,005 до 0,05% для глицерина. Мы объясняем этот эффект конкурентным связыванием криопротектора с поверхностью клеток, в результате которого молекулы криопротектора, взаимодействуя с центрами связывания, вытесняют гидратную воду. При дальнейшем увеличении концентрации криопротектора центры связывания заполняются и снижение активности воды определяется концентрацией добавленного криопротектора.

Таким образом, нами разработан методический подход исследования взаимодействия неводного компонента раствора (криопротектора) с клетками. Исследования, проведенные на эритроцитах лошади, позволили установить существование концентрационных областей криопротекторов, в которых действие криопротекторов на активность воды отражает такие процессы взаимодействия криопротектор/клетка, как адсорбция и конкурентное связывание криопротектора в гидратной оболочке клеточных структур.

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология. — Киев: Наук. думка, 1994. — 430 с.
2. Arakawa T., Carpenter J. F., Kita Y. A., Crowe J. H. Basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // *Cryobiology*. — 1990. — **27**, Issue 4. — P. 401–415.
3. Fahy G. M., Wolk B., Wu J., Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity // *Cryobiology*. — 2004. — **48**, Issue 1. — P. 22–35.
4. Bakaltcheva I. B., Odeyaleb C. O., Spargo B. J. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis // *Biochim. et biophys. acta. Biomembranes*. — 1996. — **1280**, Issue 1. — P. 73–80.
5. Fink A. L. Cryoenzymology: the use of sub-zero temperatures and fluid solutions in the study of enzyme mechanisms // *J. Theor. Biol.* — 1976. — **61**, Issue 2. — P. 419–445.

6. *Физическая химия*. Теоретическое и практическое руководство: Учеб. пособие для вузов / Под ред. Б. П. Никольского. – 2-е изд., перераб. и доп. – Ленинград: Химия, 1987. – 880 с.
7. *Льюис Дж. Н., Рендалл М.* Химическая термодинамика. – Ленинград: ОНТИ, Химтеорет, 1936. – 532 с.
8. *Jarrett M. A., Gusler B., Xiang T., Clapper D.* Improved competence in water activity measurement // AADE 2004. – Technology Conference, Radisson Astrodome, Houston, Texas, 2004. – P. 1–8.
9. *Юзов С. Г.* Определение активности воды в высоковлажных пищевых продуктах по криоскопической температуре // Все о мясе. – 2009. – No 1. – С. 29–32.
10. *А.с. 4205120/31-25. СССР.* Осмометр / В. Д. Зинченко. – Оpubл. 30.09.89, БИ No 36. – С. 82.
11. *Шипулин В. И., Аксенова Г. А., Лунандина Н. Д.* Изучение показателя активности воды мясных полуфабрикатов в зависимости от уровня введения лактата натрия // Вестн. Сев.-Кавказ. гос. техн. ун-та. – 2008. – No 2. – С. 97–100.
12. *Fontan C. F., Chirife J.* The evaluation of water activity in aqueous solutions from freezing point depression // Int. J. Food Science & Technology. – 2007. – **16**, Issue 1. – P. 21–30.
13. *Цейтлин Н. А., Зайцев И. Д.* Формулы для расчета температуры замерзания водного раствора электролита по активности воды // Журн. физ. химии. – 1985. – **59**, No 7. – С. 1809–1810.
14. *Reif-Acherman S.* The pre-history of cryoscopy: what was done before Raoult? // Quimica Nova. – 2009. – **32**, Issue 6. – P. 1677–1684.

*Институт проблем криобиологии  
и криомедицины НАН Украины, Харьков*

*Поступило в редакцию 16.03.2010*

**V. N. Kuchkov, V. D. Zinchenko**

### **Water activity as an indicator of cryoprotectant binding with erythrocytes**

*Using the advanced model of cryoscopic osmometer that allows one to determine the water activity ( $A_w$ ) in biological environments with an accuracy of  $\pm 0.001 A_w$ , the changes of  $A_w$  in equine erythrocyte suspensions with cryoprotectant 1,2-propanediol, dimethyl sulfoxide, and glycerin in concentration from 0.004 till 0.1% (weights) are investigated. The existence of cryoprotectant concentration areas, where the cryoprotectants influence on water activity reflects such processes of cryoprotectant/cell interaction as the adsorption and the competitive binding in a hydration shell of cells structures, is established.*