

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВОДНО-ГЛИЦЕРИНОВЫХ РАСТВОРОВ КАК ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕД ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ КЛЕТОК

Иванова А.А.¹, Прядун В.В.¹, Ефанов А.Н.², Яковенко С.А.¹, Симоненко Е.Ю.¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: Annetkurella@yandex.ru

² CFEL, DESY

Notkestraße 85, Hamburg, 22607, Germany

Поступила в редакцию: 10.07.20

Аннотация. Криобиология активно развивается последние 10 лет и представляет собой не только фундаментальные исследования изменений, происходящих в растворах и клеточных структурах при низких температурах, но и несёт прикладное значение. Прикладными задачами современной криобиологии являются разработка криопротекторных сред, методов криоконсервации клеток, тканей, эмбрионов животных и человека, создание криобанков и прочее. При криоконсервации степень и скорость повреждения биологического материала определяется как образованием кристаллов льда вне и внутри клеток, сопровождающимся нарушением осмотического равновесия, избыточной дегидратацией, изменением величины pH и зарядовых характеристик мембран и др., так и скоростью охлаждения биообъекта. Известно, что глицерин, ДМСО, этиленгликоль не формируют кристаллических структур при понижении температуры, а остаются в аморфном стеклоподобном состоянии. При этом глицерин как наименее токсичное соединение для клеток является главным компонентом криопротекторных сред при замораживании больших объемов биологического материала. В работе проведено исследование термодинамических характеристик, а также рентгеноструктурный анализ водно-глицериновых растворов, позволяющих расширить понимание физико-химических процессов и структурных изменений криопротекторных сред.

Ключевые слова: криопротектор, калориметрия, рентгеноструктурный анализ, ВРТ.

В современной медицине и биологии всё более широкое применение находят методы работы с клетками, связанные с низкими температурами, такие как криохирургия, криофиксация, криоконсервация. Метод криоконсервации активно используется для сохранения плазмы крови, пуповинной крови, стволовых клеток, а также для создания криобанков гамет для вспомогательных репродуктивных технологий [1,2]. Несмотря на то, что методы заморозки биоматериала активно развиваются, для некоторых типов клеток процент сохранения жизнеспособности после заморозки-разморозки остается низким. Так, при заморозке сперматозоидов, потери клеток составляют 40-60%. Основными причинами повреждения клеток при низкой температуре являются: температурный и осмотический шок, повреждения мембран из-за образования кристаллов экзо- и эндоцеллюлярного льда. При наличии в воде ядер нуклеации льда или ледонуклеирующих агентов (чужеродных частиц и примесей) происходит гетерогенная нуклеация (чаще в диапазоне от -2°C до -15°C). Также важную роль в степени повреждения клеток играет скорость охлаждения биообъекта. При «быстрой» заморозке биоматериал ускоренно проходит стадии фазовых превращений, что снижает время нахождения клеток в дегидратированном состоянии, сокращается время пребывания клеток в осмотическом неравновесии. Однако, при больших скоростях замораживания возрастает частота образования внутриклеточных кристаллов льда и повреждений, вызванных его воздействием, а также процесс медленного отогрева сопровождается рекристаллизацией, также приводящей к нарушениям физиологических концентраций растворов солей вне и внутри клеток, приводящим к лизису клеток. При медленной заморозке происходит формирование и рост внеклеточных кристаллов льда, которые могут повреждать клетки при сдавливании, а также происходит концентрация растворенных в цитоплазме клетки веществ. Использование криопротекторных растворов позволяет влиять на процесс нуклеации, уменьшая интервал температур, соответствующий данной области, а значит, избежать образования большого количества кристаллов льда. В качестве проникающих внутрь клетки компонент криопротектора чаще всего используют глицерин, так как водные растворы глицерина способны формировать стеклоподобное состояние, необходимое для повышения выживаемости клеток при заморозке. При приближении к температуре стеклования происходит резкое возрастание вязкости раствора без образования ядер кристаллизации и дальнейшее его затвердевание без формирования кристаллов льда. При замораживании чистый глицерин очень редко затвердевает, на его кристаллизацию влияет добавление воды или других примесей. Глицерин обладает высокой вязкостью, связанной с наличием в его молекуле гидроксильных групп, вследствие чего в его присутствии образуется пространственная сетка водородных связей, плотность которых в 3 раза больше, чем одноатомных спиртов. Было показано, что при концентрации глицерина в растворе выше 60% все молекулы воды образуют водородные связи с глицерином, поэтому с повышением концентрации глицерина вязкость водно-глицериновой смеси увеличивается, при этом снижаются скорость движения молекул растворенного вещества и их кинетическая энергия, что приводит к снижению скорости физико-химических процессов в биологических объектах [3]. При взаимодействии с водой глицерин формирует гидратную оболочку вокруг молекул воды. Формирование такой оболочки способствует стабилизации гидратационных решеток белков за счет перехода

молекул свободной воды в связанное состояние. Важно, что в присутствии глицерина формируется мелкозернистый лед, который переходит в аморфное состояние. При мелкокристаллическом замерзании растворов центры кристаллизации хотя и очень многочисленны, но не способны к росту. При наличии в среде глицерина при физиологических температурах он проникает внутрь клетки, где, предотвращает дегидратацию цитоплазмы, а также способствует образованию стеклообразной аморфной фазы. К числу положительных эффектов глицерина следует отнести также его способность уменьшать размер кристалла льда, поскольку его охлаждение сопровождается сжатием объема, что способствует снижению давления водного льда. Свойство глицерина сжиматься при замерзании является существенным, так как превращение воды в лед не сопровождается увеличением его объема. Кроме того, глицерин не является чужеродным соединением для биологических объектов, он поступает в пищу в составе жиров, образуется в ходе обмена веществ в печени, эфиры глицерина и триглицеридов включаются в состав клеточных мембран. Таким образом, он является менее токсичным, по сравнению с другими проникающими криопротекторами, однако его высокие концентрации, которые позволили бы полностью избежать формирования кристаллов льда, также токсичны для клеток. Поэтому многие современные криопротекторные среды основаны на водно-глицериновом растворе, но концентрация глицерина в них от 10 до 15% по объему. Физико-химические свойства таких растворов плохо изучены, так как в них присутствует много стадий структурных изменений при понижении температуры. Поэтому важно исследовать термодинамические и структурные характеристики данных растворов, а также изучить процесс образования кристаллов льда при заморозке.

В настоящей работе для получения термодинамических показателей был использован метод адиабатической калориметрии, адаптированный для исследования жидких сред [4]. В работе использовался калориметр PPMS (Physical Property Measurement System, **Quantum Design, Inc., USA**). Изучаемый образец массой $m=28,42$ мг помещался в экспериментальный контейнер, охлаждался в калориметре до $T=77,4$ К со скоростью $0,115$ К/с, после чего методом квази-адиабатической калориметрии была получена зависимость теплоемкости от температуры при нагревании образца до $T=300$ К с шагом $0,002$ К/с. Процесс кристаллизации растворов был исследован с помощью рентгеноструктурного анализа. Измерения проводились на PETRA III (DESY, Гамбург, Германия). Проводилось исследование водно-глицеринового раствора с концентрацией глицерина 12%, основанного на буфере Hepes 20мМ (Sigma). Буфер включал в себя различные компоненты в обычных для клеточных сред концентрациях, воду (Sigma, W3500).

Молярная масса многокомпонентной среды M_{cp} была определена по формуле 1, где $v_i / \sum v_i$ - мольные доли компонентов, M_i – молярная масса, и составила $20,84$ г/моль.

$$M_{cp} = \sum_{i=1}^k \left(\frac{v_i}{\sum v_i} M_i \right). \quad (1)$$

Такой раствор по составу схож с базовой частью большинства коммерческих криопротекторов, таких как SpermFreeze (LifeGlobal, США).

Анализ большого количества статей, а также исследования, проведенные нами ранее [4], показали, что для глицериновых растворов разных концентраций существует характерный профиль зависимости теплоемкости от температуры. На графике зависимости $C(T)$ чаще всего выделяются три основные области: область, в которой раствор является жидкостью или истинным раствором, гетерогенная область, низкотемпературная часть, где раствор представляется собой кристаллическое тело. В данной работе для водно-глицеринового раствора (12% об.) был также получен характерный глицериновый профиль (рис.1). На полученном графике представлена высокотемпературная область ($T > T_1 = 246,4$ К), в которой среда представляет собой жидкость. При $T_1 = 246,4$ К происходит переход из жидкого состояния в стеклообразное и представляет собой фазовый переход первого рода. В диапазоне от $T_1 = 246,4$ К до $T_2 = 168,3$ К - область гетерогенного состояния и низкотемпературный промежуток (ниже $T_2 = 168,3$ К). Определение точных температур фазовых переходов и изменений агрегатных состояний проводилось по максимуму производной теплоемкости от температуры. На график зависимости $C(T)$ видно, что при температуре $T = 204,1$ К также наблюдается максимум. Сложно однозначно определить природу этого перехода, скорее всего он вызван структурными изменениями в гетерогенной смешанной фазе. В некоторых статьях описывается образование образуются двухфазной жидкостной дисперсной системы в области этих температур [5]. Температура перехода из жидкости в твердое тело для чистого глицерина была экспериментально определена много раз, ее наиболее точное значение составляет $T = 291,3$ К. Таким образом, по сравнению с глицерином в водном растворе глицерина с солями происходит сдвиг фазового перехода первого рода в область более низких температур.

Для определения термодинамических параметров изучаемых растворов при низких температурах была использована модель теплоёмкости твёрдого тела Дебая. Для этого в области кристаллического состояния исследуемого состава, определяли значение температуры Дебая θ_D и n – число атомов, приходящихся на одну элементарную ячейку. По формуле Дебая рассчитывали экстраполяцию значений теплоёмкости в области высоких температур. Результат можно видеть на рисунке 1. После определения значений θ_D и n из экспериментального графика вычитается величина экстраполированной теплоемкости по Дебаю. После чего могут быть рассчитаны изменения энтропии и энтальпии по следующим формулам:

$$\Delta S = \int_0^{T_n} \frac{c}{T} dT, \quad \Delta H = \int_0^{T_n} c dT,$$

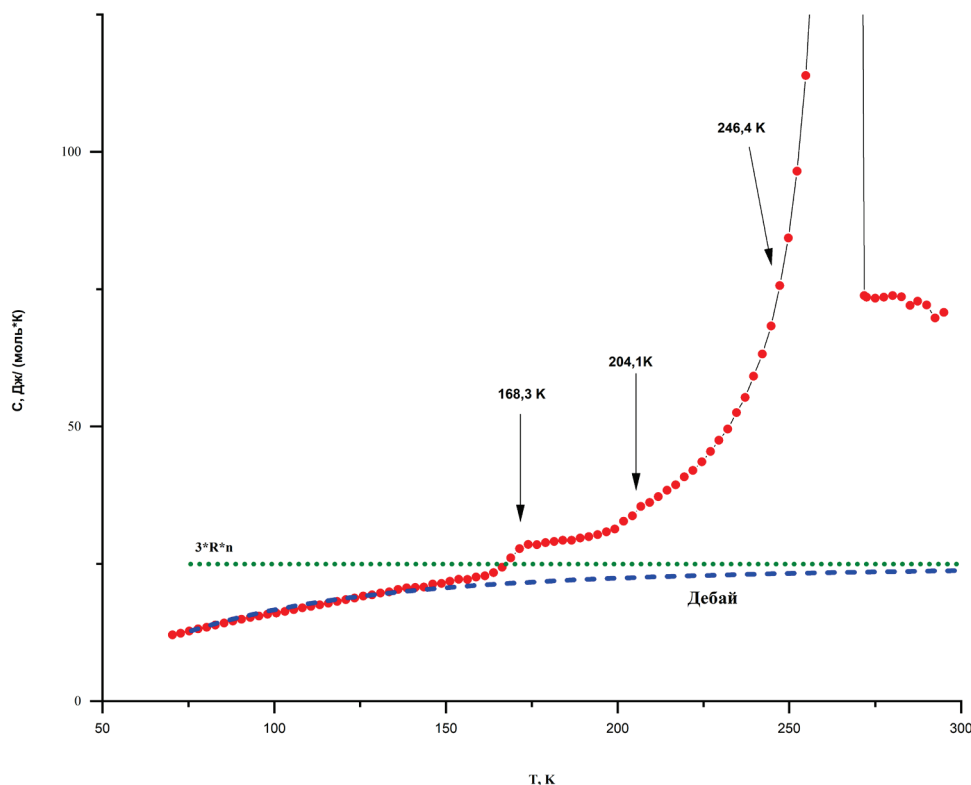


Рисунок 1. Зависимость молярной теплоемкости от температуры для водно-глицеринового раствора 12 об. %

где $T_{п}$ – температура плавления на графике $C(T)$, полученном при вычитании из экспериментального графика $C(T)$ экстраполированной теплоемкости по Дебаю.

Для 12% водно-глицеринового раствора $\Delta S = 6,17 \frac{\text{Дж}}{\text{К} \cdot \text{моль}}$, $\Delta H = 1360 \text{ Дж/моль}$. Для более точного описания агрегатного состояния образца при температурах в районе $T = 170 \text{ К}$ было проведено сравнение экспериментальных данных с данными для глицерина, полученными в работе Гибсона [6]. Так как профили полученных графиков совпадают и температура перехода близка к наблюдаемой, можно предположить, что в данном промежутке наблюдается переход из стеклообразного состояния в кристаллическое. Также в данной работе с помощью метода рентгеноструктурного анализа было проведено сравнение дифракционных картин для водно-глицеринового раствора (50% глицерина), воды и исследуемого раствора (12% глицерина по объему). Дифракционная картина для 50% раствора соответствует стеклоподобному состоянию. Картина для воды демонстрирует небольшое количество очень интенсивных брэгговских пиков, что соответствует формированию нескольких очень больших кристаллов льда. В то же время дифракционная картина 12% раствора содержит множество брэгговских пиков небольшой интенсивности – данная картина характерна для ситуации, когда при замерзании раствора в толще формируется множество небольших кристаллов льда. Появление кристаллов в исследуемой среде связано с низкой концентрацией глицерина в криопротекторной среде и с наличием свободной воды, которая формирует кристаллы. Однако концентрация глицерина в

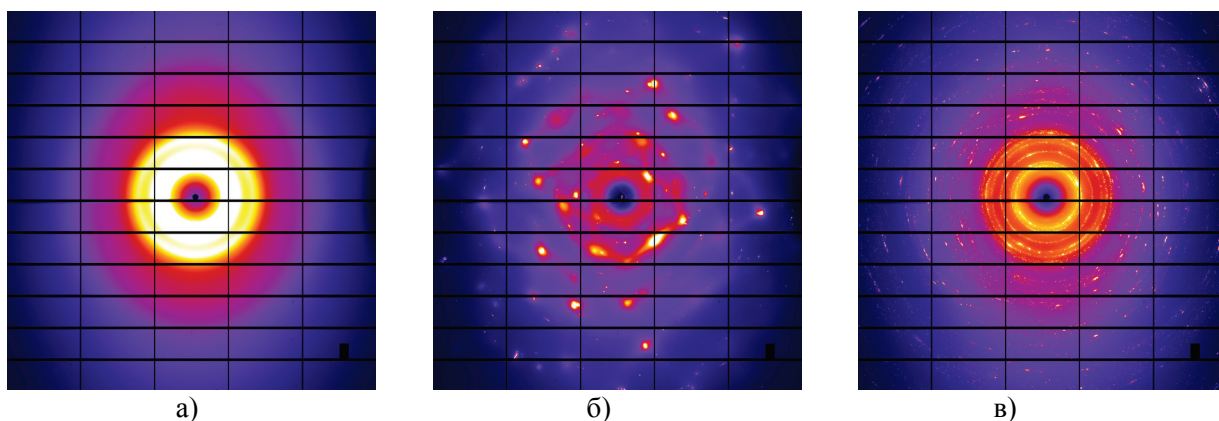


Рисунок 2. Дифракционные картины для водно-глицеринового раствора (50% глицерина) (а), воды (б), исследуемого раствора (12% глицерина) (в)

Таблица 1. Термодинамические характеристики исследуемого раствора

Параметры	Исследуемый раствор
ΔS , Дж/ (К·моль)	$6,17 \pm 0,03$
ΔH , Дж/ моль	1360 ± 68
Температура плавления, T_1 , К	246,4
Температура стеклования, T_2 , К	168,3

криопротекторных средах не может быть увеличена, так как это может повысить токсичность раствора. Поэтому необходимы дополнительные соединения – непроникающие компоненты (например, сахароза, альбумин), которые будут разбивать формирующиеся кристаллы, но не будут влиять на токсичность среды.

Таким образом, в ходе данной работы были получены температуры плавления и стеклования, а также термодинамические характеристики водно-глицеринового раствора с содержанием глицерина 12% по объему, представленные в таблице 1, был изучен процесс формирования кристаллов в исследуемом растворе. Также подробно с помощью двух экспериментальных методов была изучена гетерогенная область на графике зависимости теплоемкости от температуры (от $T_2=168,3$ К до $T_1=246,4$ К на рис. 1), однако для точного описания изменения агрегатного состояния, происходящего в данной области, необходимо проведение дополнительных исследований.

Список литературы / References:

1. Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. *Cell. Biochem.*, 1997, vol. 64, 278 p.
2. Rall W.F., Fahy G.M., *Nature*, 1985, vol. 313, 573 p.
3. Popov I., Greenbaum G.A., Sokolov A.P., Feldman Y. *Phys. Chem. Chem. Phys. J.*, 2015, vol. 17 (27), pp. 18063-18071.
4. Симоненко Е.Ю., Прядун В.В., Иванова А.А., Бурмистрова Е.В., Васильев А.Н., Яковенко С.А., Биофизика, 2019, т. 64, вып. 1, с. 5-11. [Simonenko E.Yu., Pryadun V.V., Ivanov A.A., Burmistrova E.V., Vasiliev A.N., Yakovenko S.A. *Biophysics*, vol. 64, no. 1, pp. 1-6. (In Russ.)]
5. Ходько А.Т. *Вісник Харківського національного університету*, 2012, № 1026, Хімія. Вип. 21 (44). [Khod'ko A.T. *Kharkov University Bulletin*, 2012, no. 1026, Chemical Series, iss. 21 (44). (In Russ.)]
6. Gibson G.E., Glauque W.F. *J. Am. Chem. Soc.*, 1923, vol. 45, no. 1, 93 p.

TERMODYNAMIC AND STRUCTURAL FEATURES OF WATER-GLYCEROL SOLUTIONS AS THE MAIN COMPONENT OF CRYOPROTECTIVE MEDIA FOR CRYOPRESERVATION OF CELLS

Ivanova A.A.¹, Pryadun V.V.¹, Yefanov A.N.², Yakovenko S.A.¹, Simonenko E.U.¹

¹ Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory, 1, build. 2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: Annetkurella@yandex.ru

² CFEL, DESY

Notkestraße 85, Hamburg, 22607, Germany

Abstract. Cryobiology has been actively developing for the past 10 years and it is not only a fundamental study of changes occurring at low temperatures in solutions and cell structures but it also carries applied value. The applied aims of modern cryobiology are development of cryoprotective media, methods for cryopreservation of cells, tissues, animal and human embryos, creation of cryobanks, etc. During cryopreservation the degree and rate of biological material damage is determined both by the formation of ice crystals outside the cells accompanied by a violation of osmotic equilibrium, excessive dehydration, change in pH and change of membrane characteristics, etc., and the cooling rate of the biological object. It is known that glycerol, DMSO, ethylene glycol do not form crystalline structures with decreasing temperature but remain in an amorphous glass state. At the same time glycerol as the least toxic compound for cells is the main component of cryoprotective media used for freezing of large volumes of biological materials. In the article the study of thermodynamic characteristics as well as X-ray diffraction analysis of water-glycerol solutions is presented. It expands the understanding of physicochemical processes and structural changes in cryoprotective media.

Key words: cryoprotectant, calorimetry, X-ray analysis, ART.