

ВИВЧЕННЯ МІЖФАЗНИХ ВЗАЄМОДІЙ У СИСТЕМІ КЛІТИНИ/ВОДА/КРЕМНЕЗЕМ МЕТОДОМ ¹Н ЯМР СПЕКТРОСКОПІЇ

С.П. Горбик, В.В. Туров, О.О. Чуйко

*Інститут хімії поверхні Національної академії наук України
вул. Ген. Наумова 17, 03680 Київ-164*

Для широкого діапазону зміни концентрації дріжджів у водних суспензіях живих клітин визначалися характеристики шарів зв'язаної води і величини міжфазної енергії (γ_s). На основі залежності γ_s від концентрації зовнішньоклітинної води визначено енергію міжклітинної взаємодії. У клітинній суспензії зареєстровано фазовий перехід типу золь-гель при концентрації клітинної маси $C_{др} = 10-12$ % мас. Для розведених клітинних суспензій розраховано величину сил адгезії. Визначено зміну вільної енергії колоїдної системи в результаті взаємодії клітина-поверхня високодисперсного кремнезему.

Characteristics of bound water layers and values of interface energy (γ_s) in the living cell suspensions were determined over a wide range of concentration change for the yeast suspensions. Based on the γ_s value dependence on the concentration of extracellular water, an energy of the intercellular interaction was determined. In cell suspension the phase transition of sol-gel type was registered at the cell mass concentration of 10-12 wt %. The values of adhesive forces were estimated for the diluted cell suspensions. Change in free energy of the colloid system resulting from the cell-high disperse silica surface interaction was determined.

Вступ

В роботі [1] показано можливість застосування методу ¹Н ЯМР спектроскопії для визначення величини міжфазних взаємодій у водних суспензіях живих клітин. Так, зокрема, існуючими на даний час методами неможливо визначати параметри міжклітинної взаємодії таким чином, щоб у процесі вимірювань не змінювалось взаємне розташування клітин у суспензіях. Для кількісного визначення параметрів таких взаємодій успішно застосовано методику виморожування рідкої фази [2].

Основною метою роботи є вивчення впливу високодисперсного кремнезему (ВДК) на параметри взаємодії в системі клітини/вода/кремнезем. При цьому параметром, що найбільш повно описує взаємодію клітин між собою, з водним середовищем і з поверхнею ВДК, є величина міжфазної енергії. Міжфазна енергія визначає сумарне зменшення вільної енергії колоїдної системи, зумовлене наявністю межі розділу фаз.

Оскільки більшість клітин у процесі заморожування-відтавання гинуть, для експериментів ми використовували культуру хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, клітини яких мають високу кріостійкість. Умовою замерзання води на міжфазній межі клітина/вода є рівність вільних енергій молекул адсорбованої води і льоду. При цьому зниження температури замерзання адсорбованої води ($273 - T$) визначається зменшенням вільної енергії води, викликаним адсорбційними взаємодіями ($G = G_0 - G$, де G_0 – вільна енергія льоду при 273К) [3-5]. Оскільки вільна енергія льоду зі зниженням температури змінюється за лінійним законом [6], то

$$\Delta G = 0,036(273 - T). \quad (1)$$

Відповідно до методики, описаної в [3-4], за залежностями зміни вільної енергії незамерзаючої води від її концентрації можуть бути розраховані концентрації сильно- і слабкозв'язаної води ($C_{H_2O}^s$ і $C_{H_2O}^w$), максимальне зменшення вільної енергії в шарах сильно- і слабкозв'язаної води (ΔG^s і ΔG^w), а також величина міжфазної енергії адсорбентів у водному середовищі (γ_s):

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{H_2O}^{\max}} \Delta G dC_{H_2O}. \quad (2)$$

У цьому виразі $C_{H_2O}^{\max}$ – товщина шару незамерзаючої води при $T \rightarrow 273K$.

Експериментальна частина

Спектри знімали на ЯМР спектрометрі високої роздільної здатності Bruker WP-100 SY з робочою частотою 100 МГц і смугою пропускання 50 кГц. Температура в датчику регулювалася термоприставкою Bruker VT-1000 з точністю ± 1 град. Інтенсивності сигналів визначалися електронним інтегратором з точністю $\pm 10\%$. Для запобігання переохолодження суспензій виміри концентрації незамерзаючої води проводилися при нагріванні суспензій, попередньо охолоджених до 210К.

Результати та їхнє обговорення

На рис. 1, а наведені графіки залежності відносної інтенсивності сигналу незамерзаючої води від температури для водних суспензій дріжджів, що містять від 3 до 100% мас. культури. Усі інтенсивності нормовані відносно сигналу 1H ЯМР води досліджених зразків при $T=275K$.

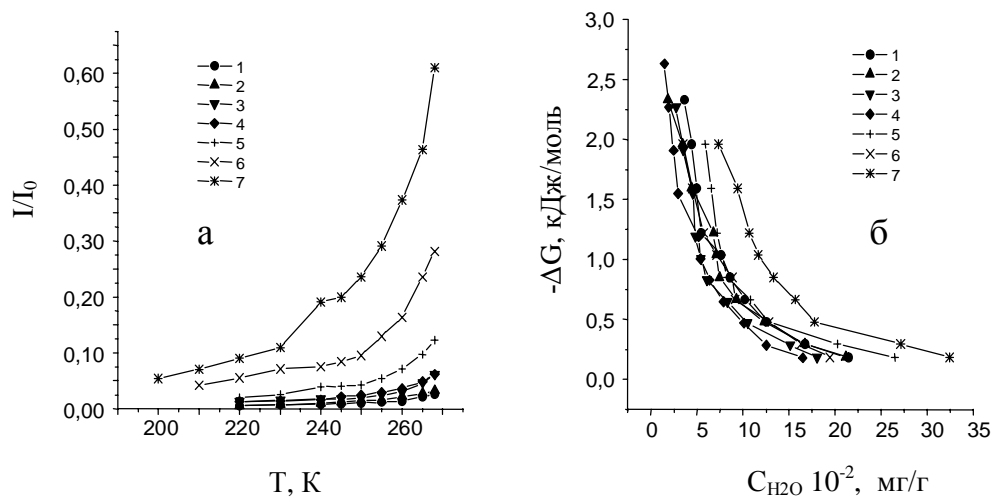


Рис. 1. Залежність відносної інтенсивності сигналу незамерзаючої води від температури для заморожених водних суспензій дріжджів різних концентрацій (а) і побудовані на її основі залежності диференціальної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (б).

Концентрація клітин (% мас):

(а): 1 – 3; 2 – 6; 3 – 10; 4 – 12,5; 5 – 25; 6 – 50; 7 – 100%;

(б): 1 – 12,5; 2 – 25; 3 – 50; 4 – 100; 5 – 10; 6 – 6; 7 – 3%.

Залежності зміни вільної енергії незамерзаючої води від її концентрації наведені на рис. 1, б. Потрібно при цьому зазначити, що вимірювана величина C_{H_2O} відноситься як до внутрішньоклітинної, так і до позаклітинної води. При цьому якщо зовнішня поверхня клітин нам відома, то внутрішня поверхня є величиною, що важко піддається експериментальній оцінці. Тому величину міжфазної енергії варто відносити не до зовнішньої поверхні клітин, а до маси сухої речовини, що входить до складу дріжджевої культури [7]. Вкажемо, що в заморожених клітинних суспензіях, на відміну від суспензій дисперсних адсорбентів і біополімерів, частина внутрішньоклітинної води є незамерзаючою не внаслідок взаємодії з поверхнею, а через концентрування розчину низькомолекулярних речовин (відповідно до закону Рауля), що присутні у внутрішньоклітинній рідині. Експериментально розділити ці типи незамерзаючої води важко, тому розрахована за формулою (2) величина міжфазної енергії буде містити деякий внесок від зміни хімічного потенціалу води, викликаного наявністю низькомолекулярних речовин. Можна очікувати, що на залежності $\Delta G(C_{H_2O})$ «об'ємна» незамерзаюча вода буде проявлятися переважно на ділянці, що відповідає слабкозв'язаній воді.

Залежність $\gamma_S(C_{др})$ наведена на рис. 2, а. Для того, щоб оцінити енергію міжклітинної взаємодії, необхідно виключити з розгляду внесок у міжфазну енергію від води, зв'язаної всередині клітин. Можна припустити, що при $C_{др}=100\%$ мас. уся присутня в зразку вода є внутрішньоклітинною, а вимірювана при цьому величина γ_S характеризує внутрішньоклітинну міжфазну енергію (γ_S^{int}). Тоді для позаклітинної води одержимо:

$$\gamma_S^{ext} = \gamma_S - \gamma_S^{int} \text{ і } C_{H_2O}^{ext} = 100 - C_{др} \quad (3)$$

Залежність $\gamma_S(C_{H_2O}^{ext})$ приведена на рис. 2, б. Спостерігаються дві ділянки, одна з яких відповідає малим ($0 < C_{H_2O}^{ext} < 88\%$ мас.), а друга – високим ($C_{H_2O}^{ext} > 90\%$ мас.) концентраціям позаклітинної води (концентровані і розведені клітинні суспензії відповідно). Кожна з цих ділянок може бути охарактеризована максимальною величиною міжфазної енергії (γ_S^1 і γ_S^{max} на рис. 2, б). Наявність зламу на концентраційній залежності $\gamma_S(C_{H_2O}^{ext})$ дозволяє припустити існування в колоїдній системі клітина/вода фазового переходу, аналогічного переходові типу золь-гель. Визначено енергію міжклітинної взаємодії, що становить 109 Дж/г висушеної клітинної маси. Перша з характеристичних величин ($\gamma_S^1=44$ Дж/г) визначає зміну міжфазної енергії, що відбувається при розведенні гелеподібної клітинної суспензії до зникнення вторинної структури. Друга характеристична величина ($\gamma_S^{max} = 109$ Дж/г) визначає руйнування малих клітинних агрегатів у розведених суспензіях.

Таким чином, відповідно до даних рис. 2, можна вважати, що при концентраціях дріжджевої культури $C_{др} \leq 10\%$ мас. клітинна суспензія утворює колоїдний розчин, у якому міжклітинні взаємодії неістотно впливають на поверхню міжфазної взаємодії клітина/вода. Тоді для цього концентраційного інтервалу величина сил адгезії може бути розрахована відповідно до формули:

$$F = \Delta G/x, \quad (4)$$

де x – товщина шару зв'язаної води.

При цьому відстань до поверхні клітин (x) може бути визначена в наближенні плоскої поверхні границі розділу клітина/вода за формулою:

$$x (\text{Å}) = 9 C_{H_2O}^{ext} / S, \quad (5)$$

де S – питома поверхня клітин, яка дорівнює $1 \text{ м}^2/\text{г}$.

Аби визначити, як поверхня кремнезему впливає на величину міжфазної енергії клітина-вода, можна порівняти дані, наведені на рис. 2, б, із відповідною залежністю для трикомпонентної клітинної суспензії, що містить ВДК (рис. 3, а).

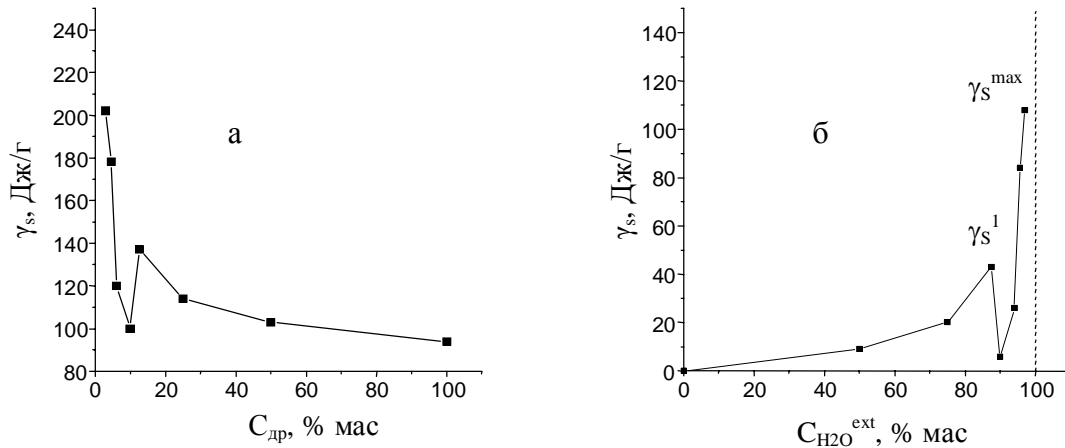


Рис. 2. Залежність сумарної величини міжфазної енергії системи клітина/вода від концентрації клітинної маси у водній суспензії (а) і від концентрації позаклітинної води (б) для клітинних суспензій дріжджів.

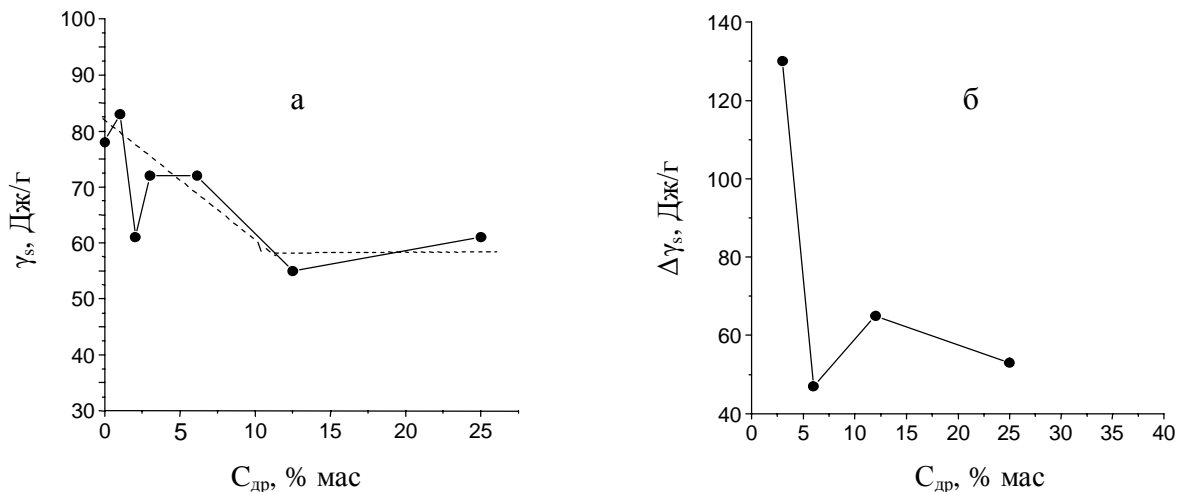


Рис. 3. Вплив концентрації клітинної маси в суспензії на міжфазну енергію в системі, що містить воду, клітинну масу і кремнезем (а); зміна вільної енергії, обумовлена наявністю ВДК (б) для суспензій, що містять 5 % мас. кремнезему.

Розходження у величинах γ_s при фіксованій концентрації клітинної маси в суспензії визначають зміну вільної енергії в результаті взаємодії клітина-поверхня (рис. 3, б). Особливо істотне розходження у величинах γ_s двох- і трикомпонентних суспензій спостерігається при малих концентраціях клітинної маси. Відповідно до даних [2], ділянка залежності $\gamma_s(C_{др})$ ліворуч від зламу (рис. 2, а) відповідає слабкій міжклітинній взаємодії (гелеподібної фази не утворюється). Присутність у суспензії частинок високодисперсного кремнезему призводить до зменшення величини γ_s на 130 Дж/г. Ця величина визначає максимальну енергію взаємодії клітин з поверхнею ВДК.

При більших концентраціях, завдяки сильним міжклітинним взаємодіям, клітинна суспензія утворює гелеподібну фазу. Введення в таку суспензію 5 % мас. ВДК призводить лише до незначної зміни міжфазної енергії. Можливо, у цьому концентраційному інтервалі більша частина клітин бере участь в утворенні зв'язків типу клітина-клітина і не

формує комплекси клітина-поверхня. Найбільш імовірно, що злам на залежності $\gamma_s(C_{др})$ при $C_{др}=2\%$ мас. у трикомпонентних суспензіях (рис. 3, *a*), як і в двохкомпонентних, обумовлений фазовим переходом типу золь-гель, що відбувається у клітинній суспензії при її концентруванні.

Висновки

Метод ^1H ЯМР спектроскопії в поєднанні з методикою виморожування рідкої фази є інформативним для визначення величини міжклітинних взаємодій у водних суспензіях живих клітин. Величина сил адгезії може бути розрахована для відносно малих концентрацій клітинної культури в суспензії, при яких у розчині не утворюються гелеподібні клітинні структури. Наявність ВДК призводить до різкого зменшення міжфазної енергії на межі поділу фаз клітина/вода. Це свідчить про інтенсивне зв'язування клітин з поверхнею кремнезему.

Подяка

Робота виконана у відповідності до проекту 04.07/00035 Фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти та науки України.

Література

1. Туров В.В., Горбик С.П., Чуйко А.А. Применение метода ^1H ЯМР спектроскопии для определения энергии взаимодействия клеток с водной средой// Докл. НАН Украины. – 2002. – №3. – С.142-146.
2. Туров В.В., Горбик С.П. Определение сил адгезии на межфазной границе клетка/вода из данных ^1H ЯМР спектроскопии// Проблемы криобиологии. – 2002. - № 3. – С.16-24.
3. Turov V.V., Leboda R. ^1H NMR Spectroscopy of adsorbed molecules and free surface energy of carbon adsorbents// Physics and Chemistry of Carbons. – 2000. – V.27.– P.67-124.
4. Turov V.V., Leboda R. Application of H-1 NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // Adv. Colloid & Interface Sci. – 1999. – V.79, N2-3. – P.173-211.
5. Turov V.V., Barvinchenko V.N. Structurally ordered surface layers of water at the SiO_2/ice interface and influence of adsorbed molecules of protein hydrolysate on them// Colloids and Surfaces, B. – 1997. – V.8. – P.125-132.
6. Термодинамические свойства индивидуальных веществ: Справочник (Ред. В.П. Глушков). – М.: Наука, 1978. – Т.1.
7. Туров В.В., Погорелый В.К., Сыч Л.А., Барвинченко В.Н., Чуйко А.А. Гидратация коллагена в замороженных водных растворах и влияние на нее дисперсного кремнезема// Докл. АН Украины. – 2000. – №9.– С.152-156.