

СТРУКТУРНАЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВОДЫ В ЧАСТИЧНО ОБЕЗВОЖЕННЫХ КЛЕТКАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПОД ВЛИЯНИЕМ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

В.В. Туров, В.М. Гунько, П.П. Горбик, С.В. Керусь

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

*Методом ^1H ЯМР спектроскопии с вымораживанием жидкой фазы изучено влияние органических растворителей на структуру ассоциативных агрегатов внутриклеточной воды и свободную энергию ее взаимодействия со стенками, формирующими внутриклеточное пространство дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что вода в частично дегидратированных клетках находится в необычном слабоассоциированном состоянии, в котором среднее число водородных связей, приходящихся на каждую молекулу воды меньше единицы.*

*The Influence of organic solvents on associative structures of intracellular water and free energy interaction of water with intracellular functionalities which form endocellular space of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* has been studied by ^1H NMR spectroscopy with layer-by-layer freezing-out of bulk and bound water. Water in partially dehydrated cells exists in unusual slightly association state in which average part of hydrogen bounds in each molecule of water less than one.*

Введение

Многие микроорганизмы при неблагоприятном изменении условий внешней среды могут переходить в состояние анабиоза, сопровождающееся сильной дегидратацией клеток и практически полным прекращением жизненных процессов [1 – 4]. В этом состоянии они способны находиться неограниченно долго и могут быть подвергнуты холодному стрессу или замораживанию до температуры жидкого азота. Возвращение к активной фазе происходит при таком изменении внешних условий, которые отвечают оптимальным параметрам жизнедеятельности и деления клеток (водная среда, наличие в ней питательных веществ, температурный фон) [5]. Регидратация клеток осуществляется достаточно быстро [6], что свидетельствует о доступности внутреннего пространства клеток для молекул воды и растворенных в ней веществ. Состояние анабиоза широко используется во многих схемах криоконсервирования и длительного хранения клеточных объектов и тканей организма при температуре жидкого азота [7 – 10]. Как и в природных условиях, в процессе криоконсервирования с использованием низкомолекулярных криоконсервантов имеет место сильная дегидратация клеток. Однако это в основном обусловлено вытеснением внутриклеточной воды органическими веществами и формированием в клетках концентрированных растворов криоконсервантов.

Дегидратированная клетка представляет собой сложную систему сообщающихся между собой наноразмерных полостей, сформированную фрагментами органелл, биополимерными молекулами, входящими в состав внутриклеточной среды и клеточными

мембранами. Тогда дегидратированные клетки в состоянии анабиоза могут рассматриваться как некоторая морфологически упорядоченная система, в которой внутренняя структура организована таким образом, что обеспечиваются благоприятные условия для абсорбции внутренним пространством веществ из окружающей среды. Внутренние полости дегидратированной клетки заполнены связанной водой, в которой растворены низкомолекулярные органические и неорганические вещества.

Исследования, выполненные на дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae* методом ЯМР спектроскопии с вымораживанием жидкой фазы, показали, что вода в частично дегидратированных клетках находится в необычном слабоассоциированном состоянии, в котором среднее число водородных связей, приходящихся на каждую молекулу воды меньше единицы [11 – 14]. В отличие от обычной, сильноассоциированной воды, химический сдвиг которой близок к 5 м.д., для слабоассоциированной воды регистрируются химические сдвиги в диапазоне $\delta = 1,3 \dots 2$ м.д., что совпадает с химическим сдвигом газообразной воды или воды, растворенной в слабополярных органических растворителях [15 – 17]. Большое количество слабоассоциированной воды обнаружено также в костной ткани [18, 19] и на межфазной границе гидратированных наноразмерных частиц со слабополярной органической средой [13, 20]. Ее свойства сильно отличаются от свойств объемной воды. Во многих изученных системах она замерзает при температуре ниже 200 К и способна образовывать со слабополярными органическими молекулами концентрированные растворы [13].

Целью настоящей работы было изучение влияния органических растворителей на структуру ассоциативных агрегатов внутриклеточной воды и свободную энергию взаимодействия воды со стенками, формирующими внутриклеточное пространство.

Материалы и методы исследований

Материалы: В качестве исходной клеточной субстанции использовали дегидратированные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, содержащие 7 % масс. воды. В большинстве экспериментов к гранулированной клеточной массе (диаметр 0,25 мм) добавляли 10 % масс. воды и выдерживали ее в течении семи суток при комнатной температуре. Протонсодержащие органические растворители (2 г на г клеточной массы), химической квалификации ЧДА или их дейтерированные аналоги, квалификации «Для ЯМР спектроскопии», фирмы Aldrich добавляли к навескам клеточной массы (300 – 400 мг) непосредственно в ампулы ЯМР спектрометра и уравнивались 10 мин при интенсивном встряхивании и 1 ч без встряхивания, после чего ампулы помещались в датчик ЯМР спектрометра, в котором температура за 15 мин понижалась до 200 – 210 К, а затем повышалась с шагом 5 – 10 К и термостатированием при каждой температуре в течение 5 мин.

ЯМР спектроскопия: Спектры ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400 с рабочей частотой 400 МГц. Температуру регулировали с точностью ± 1 К, используя термоприставку Bruker VT-1000. Интенсивности сигналов определяли с точностью ± 10 %. Для предотвращения переохлаждения образцов 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 [13, 21]. Он базируется на влиянии межфазной границы на температуру фазового перехода вода-лед. Благодаря адсорбционным взаимодействиям температура замерзания межфазной воды понижена. Поскольку свободная энергия льда с уменьшением температуры изменяется по линейному закону [22], изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) и температуры фазового перехода ($273 - T$) связаны соотношением:

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

Площадь, ограниченная графиком зависимости $\Delta G(C_{uw})$ определяет величину межфазной энергии (γ_s), которая равна суммарному понижению свободной энергии воды обусловленному присутствием границы раздела фаз:

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

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

На зависимостях $\Delta G(C_{uw})$ обычно могут быть выделены участки, относящиеся к слабосвязанной и сильносвязанной воде. При этом под слабосвязанной водой понимают ту часть незамерзающей воды, свободная энергия которой лишь немного понижена адсорбционными взаимодействиями с поверхностью адсорбентов или биополимеров. Она замерзает при температуре вблизи 273 К. Сильносвязанная вода может не замерзнуть даже при сильном охлаждении суспензии [13]. 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 графиков к осям абсцисс и ординат. По способности молекул межфазной воды образовывать водородные связи со своими соседями она подразделяется на сильно- и слабоассоциированную. В случае, когда переход воды в слабоассоциированное состояние энергетически выгоден, слабоассоциированная вода является сильносвязанной и замерзает при очень низкой температуре. Если же формирование слоя слабоассоциированной воды определяется энтропийным фактором, то слабоассоциированная вода может быть слабосвязанной.

Процесс замерзания воды в узких внутриклеточных полостях может быть описан уравнением Гиббса-Томпсона [23]:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (3)$$

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 (посредством водородных связей), ΔH_f – объемная энтальпия плавления. Это уравнение может быть использовано для расчета распределений по размерам пор (IPSD) на основе зависимостей $C_{uw}(T)$. С его помощью вычисляли распределения по размерам заполненных водой полостей для гидратированных дрожжевых клеток в присутствии органических растворителей.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены температурные зависимости спектров ^1H ЯМР воды в исходной клеточной субстанции, содержащей 7 % масс. воды. Спектр состоит из одиночного сигнала, химический сдвиг которого не превышает 2 м.д., что позволяет отнести внутриклеточную воду к типу слабоассоциированной. Основная часть этой воды замерзает при температуре выше 240 К, что в соответствии с формулой (1) отвечает понижению свободной энергии Гиббса меньше, чем на 1 кДж/моль. Следовательно, эта вода – слабосвязанная.

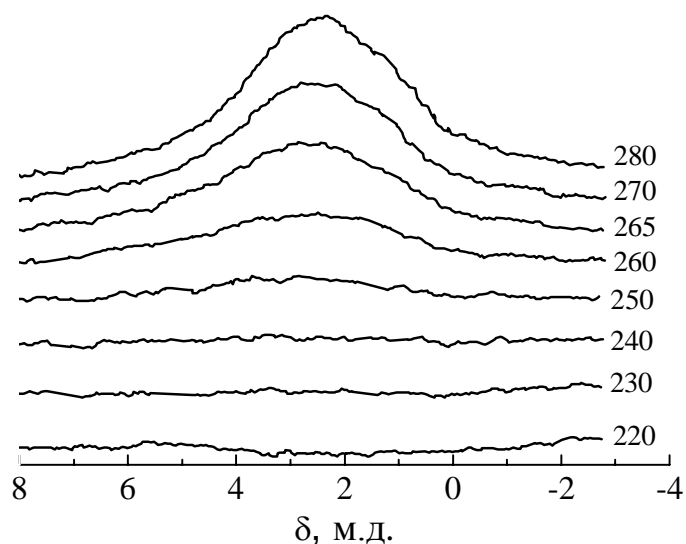


Рис. 1. Температурная зависимость спектров воды в дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих 7 % масс. воды. Температура указана в К.

Аналогичная форма и температурное поведение спектров ЯМР наблюдается для образцов, содержащих 17 % масс. адсорбированной воды. Оказалось, что дрожжевые клетки способны поглощать значительное количество слабополярных органических веществ, в том числе и газообразных. На рис. 2, *a* показаны температурные изменения спектров ^1H ЯМР дрожжевых клеток, содержащих 17 % масс. адсорбированной воды после помещения их на 30 мин в среду метана при скорости тока газа 50 мл/мин. Сигнал метана, с химическим сдвигом $\delta = 0$ м.д., наблюдается в спектрах отдельно от сигнала воды при $T < 250$ К, когда интенсивность значительно более широкого сигнала воды становится пренебрежимо малой. Концентрация поглощенного метана составляет около 0,5 % масс. по отношению к клеточной массе.

Внутри клеток легко проникают и молекулы таких неполярных органических растворителей, как CCl_4 и бензол. На рис. 2, *б, в* показаны спектры ^1H ЯМР воды в дрожжевых клетках, помещенных в среду CCl_4 и бензола- H_6 соответственно. В последнем случае кроме сигналов воды при $\delta = 7,2$ м.д. регистрируется и сигнал бензола.

Как следует из рис. 2, *б, в*, присутствие в клетках органических веществ привело к кардинальным изменениям в спектрах адсорбированной воды. Под влиянием слабополярной среды, значительная часть внутриклеточной воды стала сильноассоциированной и вместо одиночного сигнала слабоассоциированной воды с химическим сдвигом $\delta = 2$ м.д. (рис. 1, 2, *a*) отдельно регистрируются сигналы сильноассоциированной воды (с химическим сдвигом $\delta = 5$ м.д.) и слабоассоциированной воды ($\delta = 1,2$ м.д.). В случае бензола сигнал сильноассоциированной воды наблюдается на правом крыле пика от протонов бензола. Наблюдаемый эффект можно рассматривать как структурную дифференциацию внутриклеточной воды.

На рис. 3 приведены температурные зависимости концентрации слабоассоциированной воды (рис. 3, *a*) и зависимости изменения дифференциальной энергии Гиббса для слабоассоциированной (рис. 3, *б*) и сильноассоциированной (рис. 3, *в*) воды, рассчитанные в соответствии с формулой (1).

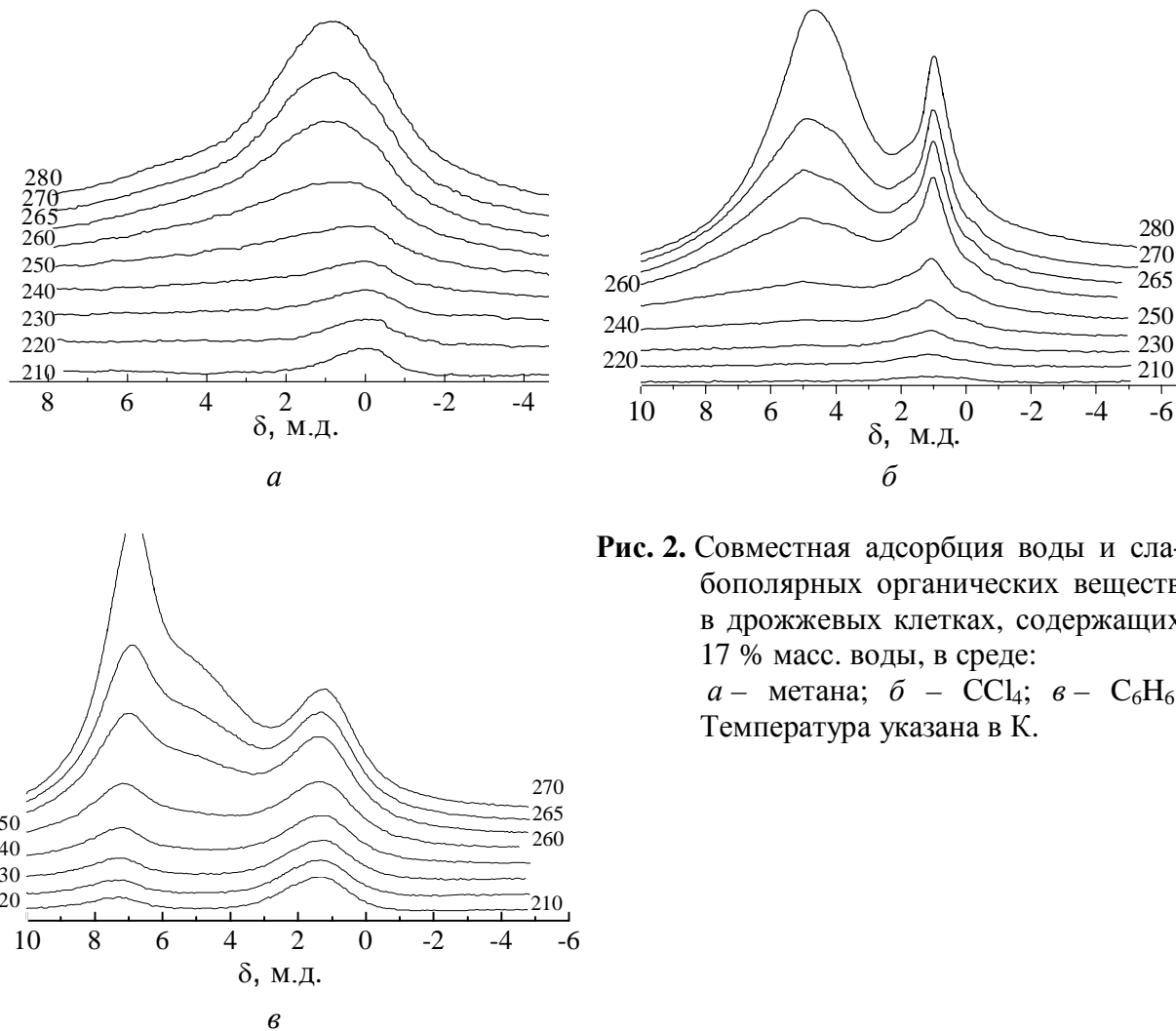


Рис. 2. Совместная адсорбция воды и слабополярных органических веществ в дрожжевых клетках, содержащих 17 % масс. воды, в среде: *a* – метана; *б* – CCl_4 ; *в* – C_6H_6 . Температура указана в К.

Как видно из рис. 3, замена воздушной среды средой слабополярных органических растворителей приводит к существенному уменьшению количества слабоассоциированной воды – в 2 раза для среды бензола и в 5 раз для среды CCl_4 . Оно происходит за счет перехода части слабоассоциированной воды в сильноассоциированную. Одновременно имеет место трансформация части слабоассоциированной воды из слабосвязанной в сильносвязанную, которая и не вымерзает даже при охлаждении образцов до 210 К. Большая часть образовавшейся в образцах сильноассоциированной воды слабосвязанная (для нее величина – $\Delta G < 1$ кДж/моль).

Таким образом, наряду со структурной дифференциацией внутриклеточной воды под влиянием слабополярных органических растворителей происходит и ее энергетическая дифференциация. Наблюдаемое явление аналогично обнаруженному ранее эффекту самоорганизации водно-органических систем в нанопространстве, ограниченном слабогидрофильными стенками, который регистрировался для микропористых углеродных материалов [24, 25], мезопористых оксидов [26] и непористых наноструктурированных кремнеземов [27]. Его суть состоит в том, что при малом расстоянии между стенками, с которыми одновременно взаимодействует вода и слабополярные вещества, а молекулярные взаимодействия могут проходить путем формирования водородносвязанных комплексов или комплексов, образование которых обусловлено дисперсионными взаимодействиями, слабополярные вещества способны вытеснять воду из зоны контакта и перемещать ее в среднюю часть пор или поры большего размера. При этом в наноразмерных порах формируется слоистая структура адсорбата, в которой с поверхностью

граничит слой органического вещества. Если первоначально внутренняя поверхность клетки стабилизировала слабоассоциированную форму воды, то при удалении ее от поверхности для воды становится термодинамически более выгодным формирование упорядоченной полиассоциированной структуры. Слабоассоциированная вода сохраняется в переходной области между водной и органической фазами и стабилизирует эту границу благодаря высокому сродству к обоим слоям. Вероятно, под действием поверхностных сил, вода и слабополярные органические вещества способны образовывать концентрированные растворы, не замерзающие до очень низких температур. Действительно, как видно из рис. 2, в, при низких температурах в спектрах наблюдаются сигналы слабоассоциированной, но сильносвязанной воды, и сильносвязанного бензола. Если предположить, что это сигналы веществ, сосредоточенных в зоне контакта водной и органической фаз, то из соотношения интенсивностей сигналов следует, что на одну молекулу бензола приходится примерно девять молекул слабоассоциированной воды.

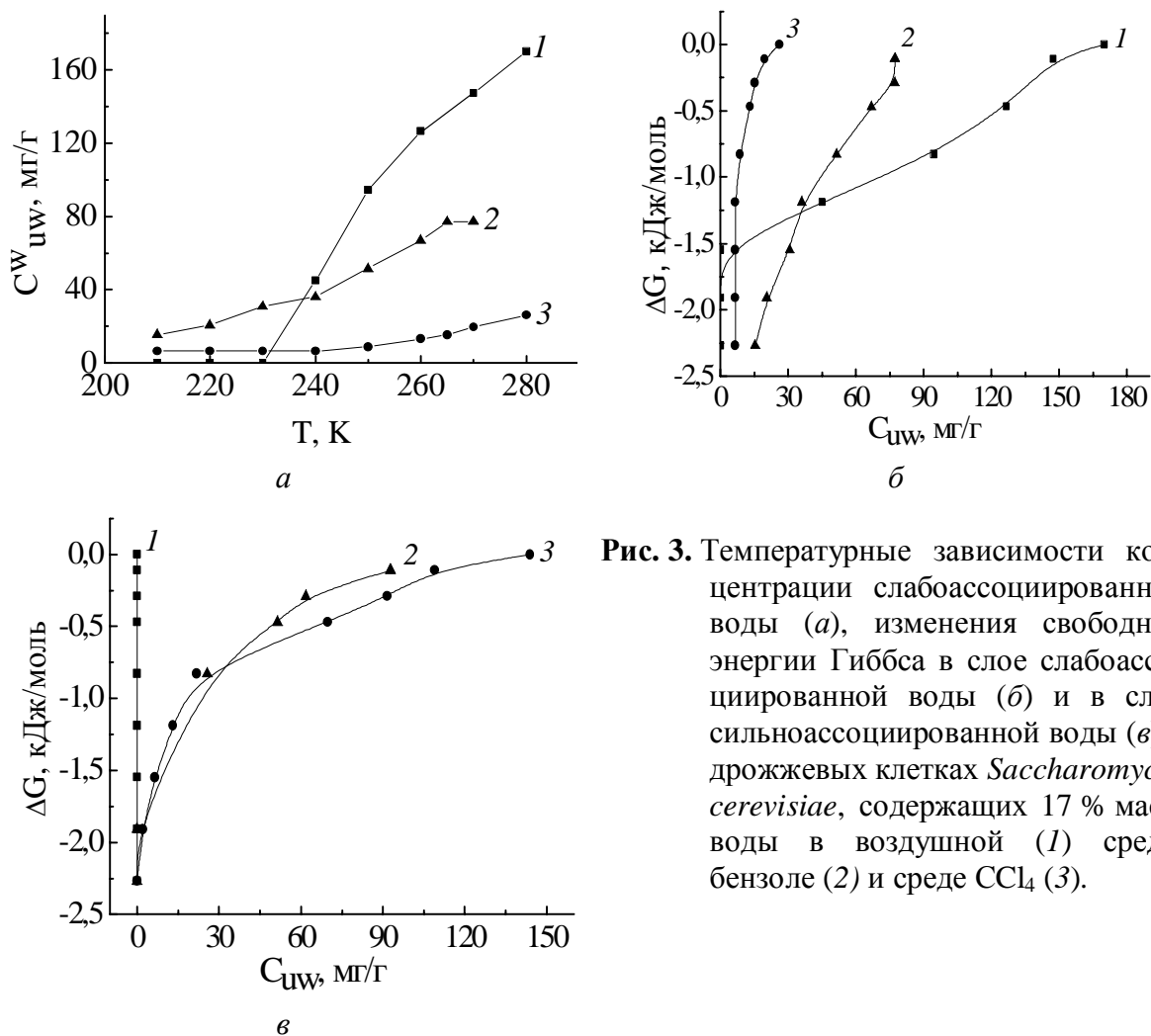


Рис. 3. Температурные зависимости концентрации слабоассоциированной воды (а), изменения свободной энергии Гиббса в слое слабоассоциированной воды (б) и в слое сильноассоциированной воды (в) в дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих 17 % масс. воды в воздушной (1) среде, бензоле (2) и среде CCl_4 (3).

На рис. 4, 5 приведены температурные зависимости спектров 1H ЯМР протонов воды и метильных групп ацетонитрила, ацетона и диметилсульфоксида для протонсодержащих растворителей (ацетон, ДМСО) и их дейтерированных аналогов (ацетонитрил, ацетон, ДМСО). В отличие от слабополярных органических веществ, использованные растворители обладают высокой электронодонорной способностью, благодаря чему образуют растворы с водой при любой стехиометрии компонент. При избытке

органической составляющей для воды растворенной в ацетонитриле, ацетоне и ДМСО характерны химические сдвиги в диапазоне 2,5 – 3 м.д.

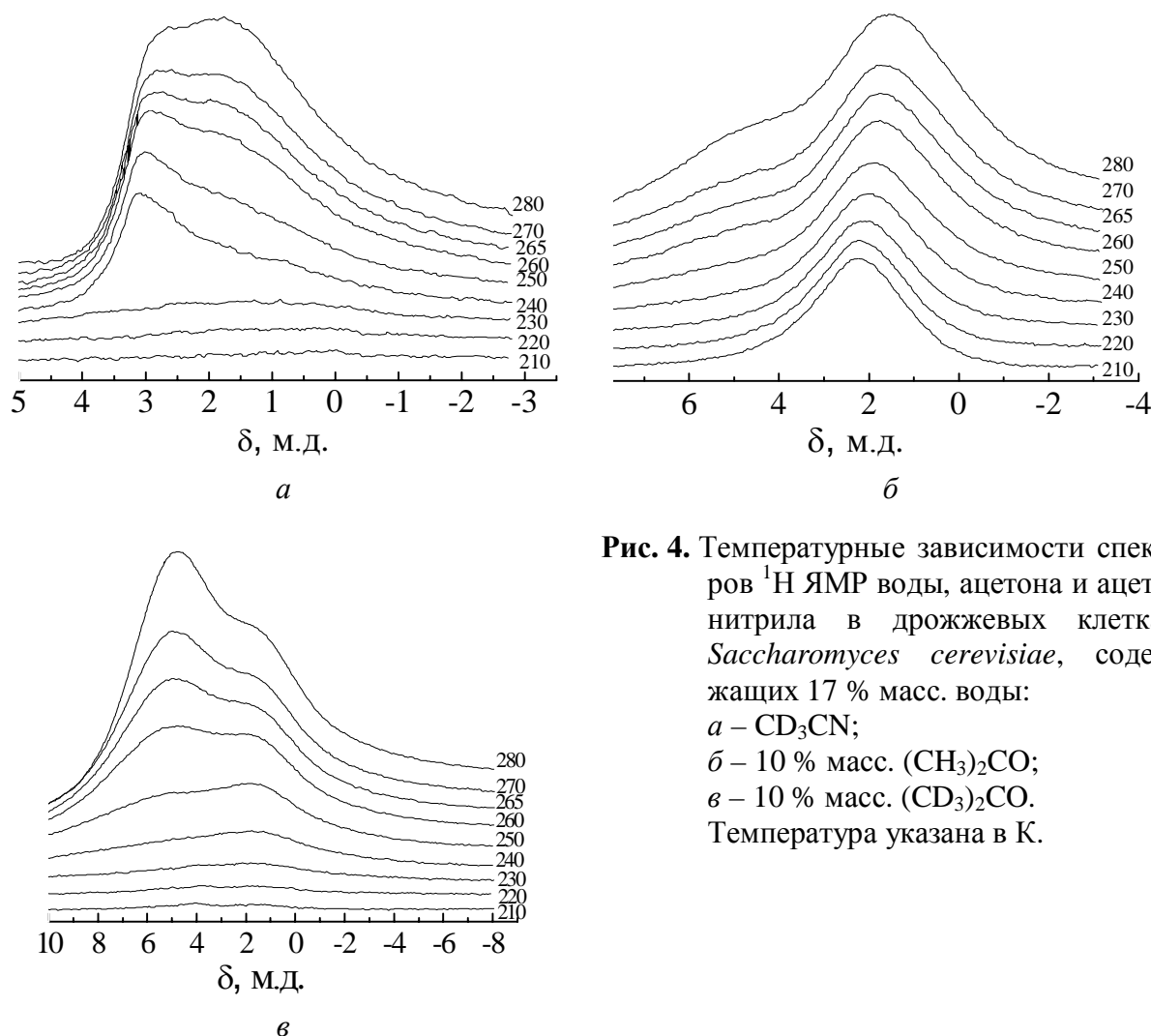


Рис. 4. Температурные зависимости спектров ^1H ЯМР воды, ацетона и ацетонитрила в дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих 17 % масс. воды:
a – CD_3CN ;
б – 10 % масс. $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$;
в – 10 % масс. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.
 Температура указана в К.

Как видно из рис. 4, *a*, вода в дрожжевых клетках в среде ацетонитрила дает два сигнала с химическими сдвигами в области 1 и 3 м.д., которые могут быть отнесены к слабоассоциированной воде и воде, растворенной в ацетонитриле. С понижением температуры в диапазоне $280 > T \geq 250$ К интенсивность сигнала растворенной воды изменяется слабо, а при более низкой температуре он исчезает, вероятно, из-за выпадения эвтектической смеси вода-ацетонитрил. Поскольку сигнал слабоассоциированной воды и воды растворенной в ацетонитриле наблюдаются отдельно, молекулярный обмен между ними проходит медленно в шкале времени ЯМР [15], т.е. области, содержащие разные типы воды, пространственно разделены. Так как содержание ацетонитрила в образце на порядок превышало концентрацию воды, а наблюдаемый сигнал воды, растворенной в ацетонитриле, имеет большую ширину, можно заключить, что вода не переходит в объемную фазу ацетонитрила, а остается во внутриклеточном пространстве. Как и в случае слабополярных органических веществ, часть слабоассоциированной воды из слабосвязанной превращается в сильносвязанную и не замерзает вплоть до 210 К. Присутствия в дрожжевых клетках, погруженных в жидкий ацетонитрил, сильноассоциированной воды не обнаружено.

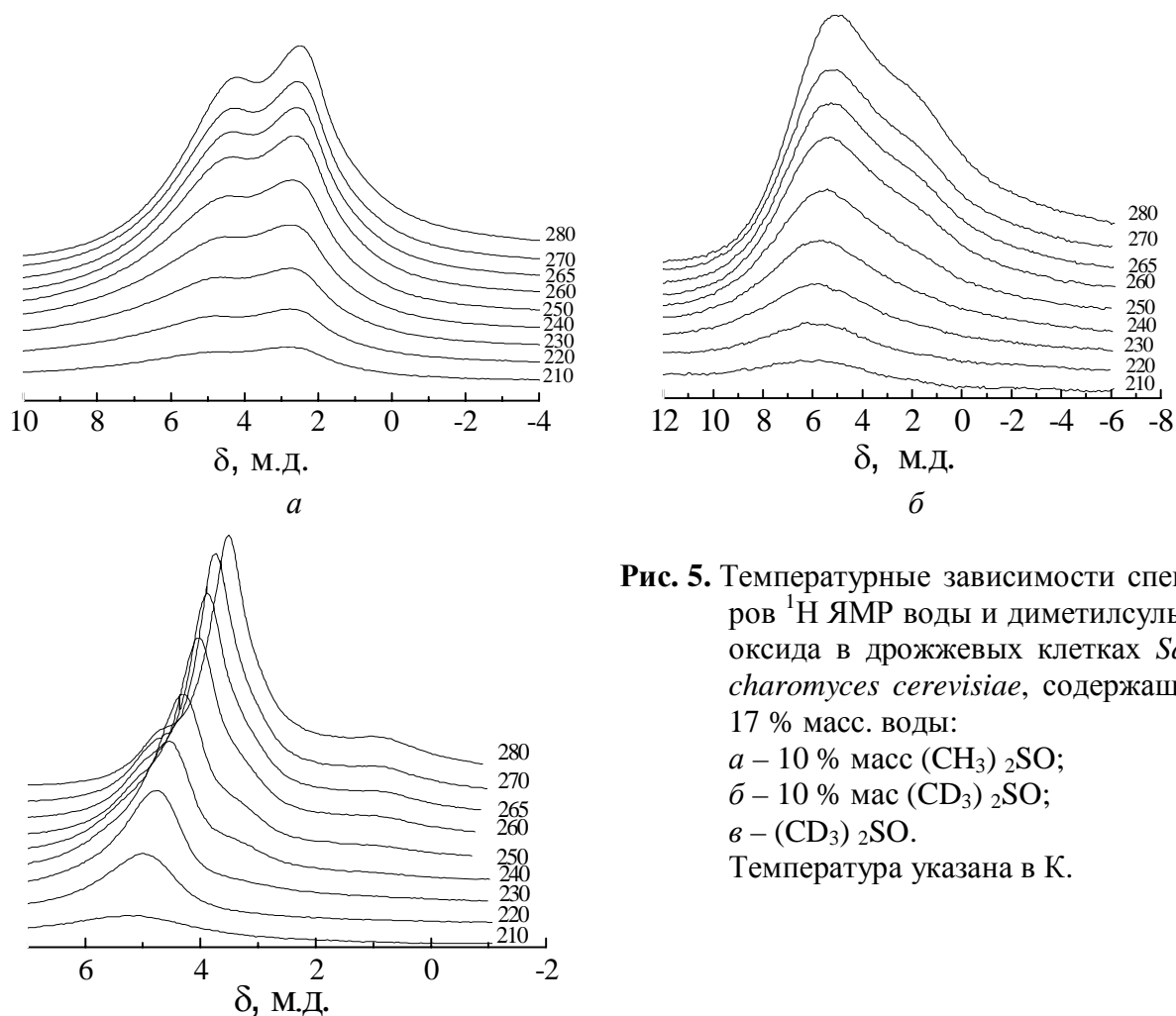


Рис. 5. Температурные зависимости спектров ^1H ЯМР воды и диметилсульфоксида в дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих 17 % масс. воды:
 а – 10 % масс $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$;
 б – 10 % мас $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$;
 в – $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.
 Температура указана в К.

При введении в клетки фиксированных количеств ацетона и ДМСО, молекулы которых характеризуются более сильными электронодонорными свойствами, чем молекулы ацетонитрила (рис. 4, б, в и рис. 5, а, б) в спектрах регистрируются сигналы сильно- и слабоассоциированной воды (в случае ДМСО- D_6 и ацетона- D_6 , рис. 5, б и 4, в соответственно) или сильноассоциированной воды и метильных групп (ацетон- H_6 и ДМСО- H_6 , рис. 4, б и 5, а, соответственно). При использовании дейтеропрепаратов, температурные зависимости спектров ^1H ЯМР в области высоких температур для обоих образцов очень близки (рис. 4, в и 5, б). Различия наблюдаются при $T < 260$ К. При низких температурах в клетках, содержащих ацетон, стабилизируется слабоассоциированная, а в случае ДМСО – сильноассоциированная формы воды. Для гидратированных клеток в присутствии ацетонитрила- D_3 вид температурных зависимостей спектров незамерзающей воды полностью идентичен соответствующим спектрам в присутствии ацетона- D_6 .

Вода, растворенная в ДМСО, дает ЯМР-сигнал только в случае большого избытка органической составляющей (рис. 5, в, среда ДМСО). При температуре 280 К, более низкой, чем температура замерзания жидкого ДМСО (291 К), в спектрах наблюдаются три сигнала воды с химическими сдвигами 1, 3 и 5 м.д., отвечающие слабоассоциированной, растворенной в ДМСО и сильноассоциированной воде, соответственно. По мере понижения температуры растворенная в ДМСО вода превращается в сильноассоциированную (вероятно, в процессе кристаллизации ДМСО). При этом ее химический сдвиг плавно увеличивается от 3 до 5 м.д., что свидетельствует о существовании быстрого

молекулярного обмена между обеими формами воды. Однако, как видно из рис. 5, в температурном интервале $280 > T > 260$ К в спектрах одновременно с сигналом растворенной воды присутствует и небольшой сигнал сильноассоциированной воды, интенсивность которого в этом диапазоне температур изменяется слабо. Такое поведение спектров можно объяснить тем, что сильноассоциированная вода внутри клеток находится в полостях разного размера или с различными свойствами биополимерных стенок. Поскольку эти полости пространственно разделены, молекулярного обмена воды между ними не происходит.

На рис. 6 приведены зависимости $\Delta G(C_{uw})$ слабоассоциированной (а) и сильноассоциированной воды (б) для дрожжевых клеток, содержащих 17 % масс. H_2O и 10 % масс. органической добавки. В присутствии ацетонитрила и ацетона почти вся регистрируемая в спектрах слабоассоциированная вода слабосвязанная. В присутствии ДМСО- D_6 слабосвязанной является примерно 60 % слабоассоциированной воды. Зависимости $\Delta G(C_{uw}^w)$ для ацетона и ацетонитрила полностью совпадают, в то время как для ДМСО- D_6 соответствующая зависимость смещена на 0,7 кДж/моль в область меньших значений ΔG . Напротив, примерно половина всей регистрируемой в клетках сильноассоциированной воды в присутствии ацетона и ДМСО- D_6 сильносвязанная, а в случае ацетонитрила 90 % сильноассоциированной воды – слабосвязанная.

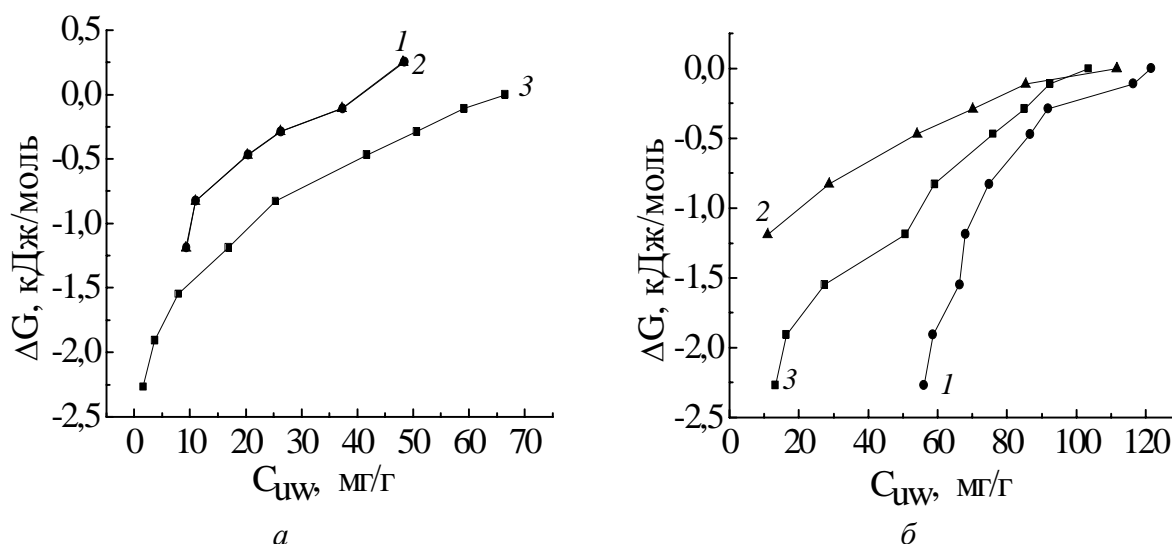


Рис. 6. Зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих 17 % масс. воды и 10 % масс. органической добавки: (а) слабоассоциированной воды; (б) сильноассоциированной воды; 1 – $(CD_3)_2CO$; 2 – CD_3CN ; 3 – $DMSO-D_6$.

На рис. 7 приведены рассчитанные на основании данных рис. 3 и 6 в соответствии с формулой (3) распределения по размерам заполненных водой пустот, находящихся внутри клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Как видно из приведенного рисунка, в клетках, содержащих только воду, она сосредоточена в полостях, средний радиус которых составляет 0,7, 1,2 и 10 нм, причем в случае добавки слабополярных (неполярных) веществ, основная масса воды находится в порах с радиусом менее 1 нм. Присутствие бензола несколько уменьшает средний радиус заполненных водой полостей, вероятно, вследствие смещения воды от поверхности в среднюю часть пор или в поры большего радиуса, формирование которых внутри клеток может происходить в результате проникновения в них органической составляющей. При этом на распределениях появляются максимумы, соответствующие радиусам пор 1,2 и

1,7 нм. Этот эффект еще сильнее выражен в присутствии CCl_4 . В порах с радиусами 1,1 и 1,6 нм сосредотачивается почти половина всей присутствующей в клетках воды. Одновременно появляется новый максимум при радиусе пор 0,3 нм. В соответствии с данными рис. 2, большая часть воды в клетках *Saccharomyces cerevisiae* в присутствии слабополярных органических веществ становится сильноассоциированной (рис. 2). Возможно, под влиянием органической компоненты, вода, оставаясь в узких порах, перемещается к участкам поверхности с несколько отличными гидрофобно-гидрофильными свойствами, на которых становится термодинамически более выгодным формирование водородно-связанных полиассоциатов.

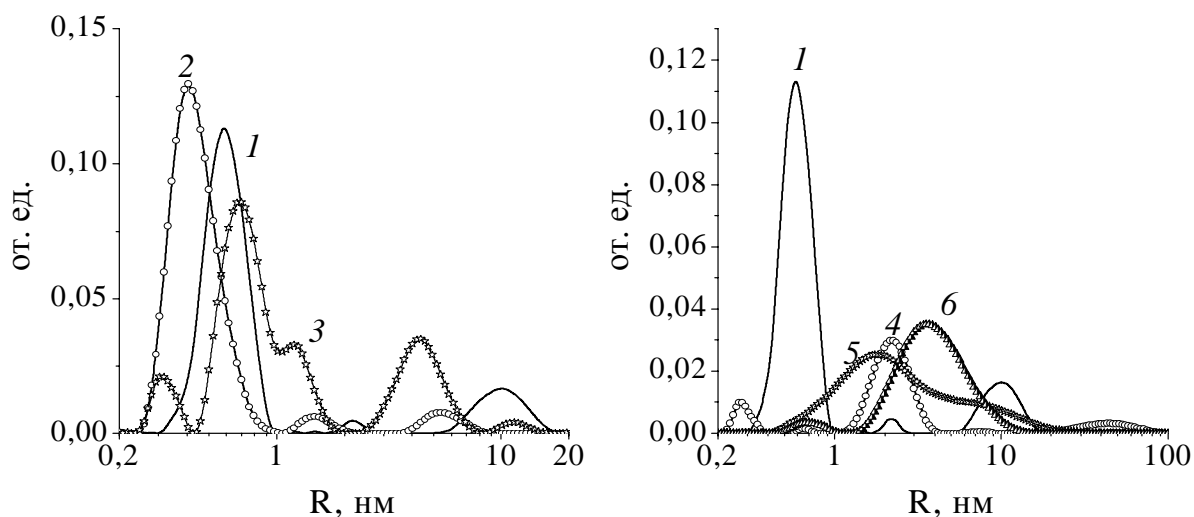


Рис. 7. Распределения пор по размерам (полостей заполненных водой) в дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих 17 % масс. воды и 10 % масс. органической добавки: 1 – на воздухе; 2 – C_6H_6 ; 3 – CCl_4 ; 4 – $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 5 – CD_3CN ; 6 – DMSO-D_6 .

При введении в клетки добавок полярных органических растворителей интенсивность пика на распределении пор по размерам, расположенного в области малых радиусов пор, резко уменьшается, и значительная часть воды сосредотачивается в порах с радиусами 1,1 – 9 нм. Вероятно, именно рост размера внутренних полостей в присутствии полярных органических молекул обеспечивает возможность перехода значительной части слабоассоциированной воды в сильноассоциированную форму, поскольку в полостях большего размера облегчается возможность формирования упорядоченной сетки водородных связей.

Заключение

Вода в слабо гидратированных клетках *Saccharomyces cerevisiae* находится в необычном, слабоассоциированном состоянии, в котором среднее число водородных связей, приходящихся на каждую молекулу воды, меньше единицы и характеризуется химическим сдвигом протонов в области 1 – 2 м.д. Эта вода слабосвязанная и замерзает при температурах ниже 250 К. Оказалось, что при введении в клетки органических растворителей, поведение водно-органических систем во внутриклеточном пространстве во многом схоже с их поведением в нанопространстве, ограниченном слабогидрофильными стенками углеродных или кремнеземных адсорбентов. Под влиянием органических растворителей происходит структурная и энергетическая дифференциация внутриклеточной воды. В присутствии слабополярных веществ – CCl_4 или бензола – значительная часть слабоассоциированной воды превращается в сильноассоциированную, а оставшаяся ее

часть становится сильносвязанной. Предположительно это происходит ввиду формирования в наноразмерных полостях внутри клеток слоистой структуры, в которой с поверхностью граничит органическая составляющая, а вода перемещается в среднюю часть наноразмерных полостей, формируя в них упорядоченную сетку водородных связей, сходную по строению с сеткой водородных связей в жидкой воде.

Полярные органические вещества (ацетонитрил, ацетон, ДМСО), способные растворяться в объемной фазе воды в любых пропорциях, при ограниченном содержании органической компоненты плохо растворяются во внутриклеточной воде. Также, как и в случае неполярных веществ, в полостях происходит структурная и энергетическая дифференциация внутриклеточной воды, в результате которой большая часть воды переходит в сильноассоциированное состояние, в котором вода существует независимо от органической фазы. Следовательно, условия формирования растворов органических веществ во внутриклеточной воде сильно отличаются от объемных и в широком диапазоне концентраций водная и органическая фазы существуют отдельно. Образование растворов происходит только при большом избытке органической компоненты, но и в этом случае раствор существует отдельно от сохранившейся внутри клеток слабоассоциированной воды.

Литература

1. Crowe J.H., Hoekstra F.A., Crowe L.M. Anhydrobiosis // *Annu. Rev. Physiol.* – 1992. – V. 54. – P. 579 – 599.
2. Dilks T.J.K., Proctor M.C.F. The pattern of recovery of bryophytes after desiccation // *J. Bryol.* – 1974. – P. 97 – 115.
3. Crowe J.H., Crowe L.M. Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms in: *Membrane, Metabolism and Dry Organisms*, Leopold C.A. (Ed.), Comstock Publishing. – 1986. – P. 188 – 209.
4. Tunnacliffe A., de Castro A.G., Manzanera M. Anhydrobiotic engineering of bacterial and mammalian cells: Is intracellular trehalose sufficient? // *Cryobiology.* – 2001. – V. 43. – P. 124 – 132.
5. Armitage W.J., Juss B.K. The influence of cooling rate on survival of frozen cells differs in monolayers and in suspensions // *Cryo-Letters.* – 1996. V. 17. – P. 213 – 218.
6. Karlsson J.O.M. A Theoretical model of intracellular devitrification // *Cryobiology.* – 2001. – V. 42. – P. 154 – 169.
7. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology.* – 2003. – V. 46. – P. 205 – 229.
8. Ashwood-Smith M.J. Preservation of microorganisms by freezing, freeze-drying and desiccation, in: M.J. Ashwood-Smith, J. Farrant (Eds.), *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology* // Pitman Medical, Tunbridge Wells. – 1980. – P. 219 – 252.
9. Wang J.H. A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation // *Cryobiology.* – 2000. – V. 41. – P. 1 – 9.
10. Tao D., Li P.H. Classification of plant cell cryoprotectants // *J. Theor. Biol.* – 1986. – V. 123. – P. 305 – 310.
11. 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. Inter. Sci.* – 2005. – V. 283, № 2. – P. 329 – 343.
12. Асоціати води у частково зневоднених дріжджах і на поверхні гідрофобного кремнезему / С.П. Туранська, В.В. Туров, В.М. Гунько, В.М. Богатирьов // *Хімія, фізика та технологія поверхні.* – 2004. – Вип. 10. – С. 207 – 212.

13. 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. Inter. Sci.* – 2005. – V. 118. – P. 125 – 172.
14. 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.
15. Pople J.A., Schneider W.G., Bernstein H.J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance // McGraw-Hill Book Company, New York. – 1959.
16. Hindman J.C. Proton rasonanse shift of water in the gas and liquid states // *J. Chem. Phys.* – 1996. – V. 44. – P. 4582 – 4592.
17. Study of Constitutive Superficial Water of Precipitated Amorphous Silicas using ^1H NMR: Broad-Line at 4K and HR MAS at 300 K / C. Doremieux-Morin, L. Heeribout, C. Dumousseaux, J. Fraissard, H. Hommel, A.P. Legrand // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1996. – V. 118. – P. 13040 – 13045.
18. Relationships between characteristics of interfacial water and human bone tissues / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, A.P. Shpilko, R. Leboda, M. Jablonski, M. Gorzelak, E. Jagiello-Wojtowicz // *Coll. and Surf.* – 2006. – V. 53. – P. 29 – 36.
19. 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 // *Colloids and Surfaces.* – 2006. – V. 48. – P. 167 – 175.
20. Structural and Adsorptive Characteristics of Fumed Silicas in Different Media / V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, V.V. Turov, E.F. Voronin, I.F. Mironyuk, A.A. Chuiko in: *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*, Bergna H.E. (Ed.), Taylor & Francis LLC, Salisbury. – 2005. – P. 499 – 530.
21. Turov VV., 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. Coll. Inter. Sci.* – 1999. – V. 79, № 2 – 3. – P. 173 – 211.
22. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В.П. Глушкова.– М.: Наука, 1978.– Т. 1. – 514 с.
23. Proceedings of the 15th European Experimental NMR Conference (EENC 2000), 12-17 June 2000, University of Leipzig, Germany.
24. Influence of Organics on Stucture of Water Adsorbed on Activated Carbons / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, R. Leboda, J. Skubiszewska-Zięba, M.D. Tsapko, D. Palijczuk // *Adsorption.* – 2005. – V. 11. – P. 163 – 168.
25. Influence of Organics on Structure of Water Adsorbed on Activated Carbons / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, R. Leboda, T.J. Badosz, J. Skubiszewska-Zięba, D. Palijczuk, W. Tomaszewski, S. Ziętek // *J. Colloid Interface Sci.* – 2002. – V. 253, № 1. – P. 23 – 34.
26. 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 European Journal of Chemistry.* – 2007. – V. 5, № 2. – P. 420 – 454.
27. Процессы самоорганизации водно-органических систем в наноразмерном пространстве твердых тел и биологических объектов / В.В. Туров, В.М. Гунько, П.П. Горбик, М.Д.Цапко, Р. Лебода, А.П. Головань в кн. *Физико-химия наноматериалов и супрамолекулярных структур.* Ред.Шпак А.П., Горбик П.П. – Киев: Наукова думка. – 2007. – С. 91 – 157.