

Т. С. Дюбко

## Анализ взаимодействия криопротекторов с сывороточным альбумином человека с помощью флуоресцентного зонда ФМЕ

*(Представлено академиком НАН Украины В. И. Грищенко)*

*With the help of the multiparametric fluorescent probe 3-hydroxy-4'-(N,N-dimethylamino)flavone (FME), the interaction of cryoprotectants (CP's) belonging to several classes of chemicals (glycerol, ethylene glycol, 1,2-propane diol, dimethyl sulfoxide, N,N-dimethyl formamide, and N,N-dimethyl acetamide in concentrations from 0.1 up to 7 M) with human serum albumin (HSA) was investigated. It was established that with increase in the CP's content in medium, the quantum yield of the probe bound to protein decreases, the ratio of intensities and the mutual position of its  $N^*$  and  $T^*$  fluorescence bands are changed. The changes of FME fluorescence parameters are interpreted by taking into account the CP's competitive interaction with two different probe binding sites on the protein molecule. It is marked that the difference in the CP's influence on spectral properties of the probe bound to HSA is determined by the concentration and the individual chemical structure of CP's molecules and, first of all, by their hydrophilic-hydrophobic balance.*

В настоящее время расширяется арсенал применяемых в клинической медицине криоконсервированных биопрепаратов, содержащих белки [1]. Однако сохранение структурно-функциональной полноценности белков при низкотемпературном консервировании иногда невозможно без применения специальных криозащитных добавок — криопротекторов (КП), с чем связано подробное изучение молекулярных механизмов реализации их защитного и токсического действия [2]. Одним из удобных модельных объектов для изучения взаимодействия КП с водорастворимыми белками является сывороточный альбумин человека (САЧ).

В работе с помощью флуоресцентного зонда 3-гидрокси-4'-(N,N-диметиламино)флавона (ФМЕ) исследовано взаимодействие с САЧ отличающихся по своим гидрофильно-гидрофобным свойствам и относящихся к нескольким классам химических соединений КП (табл. 1): глицерина (ГЛ), этиленгликоля (ЭГ), 1,2-пропандиола (ПД), диметилсульфоксида (ДМСО), N,N-диметилформамида (ДМФ) и N,N-диметилацетамида (ДМАЦ) в концентрациях от 0,1 до 7 М.

Наряду с высокоспецифичным зондом К-35, хорошо зарекомендовавшим себя при исследовании структурно-функциональных свойств альбумина [3], в последние годы опубликованы результаты успешного применения для этой цели производных 3-гидроксифлавона [4, 5]. К уникальным спектральным особенностям зондов этого класса относится присутствие в спектрах эмиссии флуоресценции двух полос, чувствительных к изменениям свойств ближайшего окружения [6] и позволяющих выполнять мультипараметрический анализ спектров. Для зонда ФМЕ, как и для ряда других производных 3-гидроксифлавона, характерно протекание реакции переноса протона в возбужденном состоянии (англ. excited state intramolecular proton transfer, ESIPT) [5] (рис. 1), спектрально проявляющейся в наличии полос зелено-голубой (нормальная  $N^*$ -форма) и оранжево-красной (фототаутомерная  $T^*$ -форма) флуоресценции. Перечисленные свойства 3-гидроксифлавонов послужили

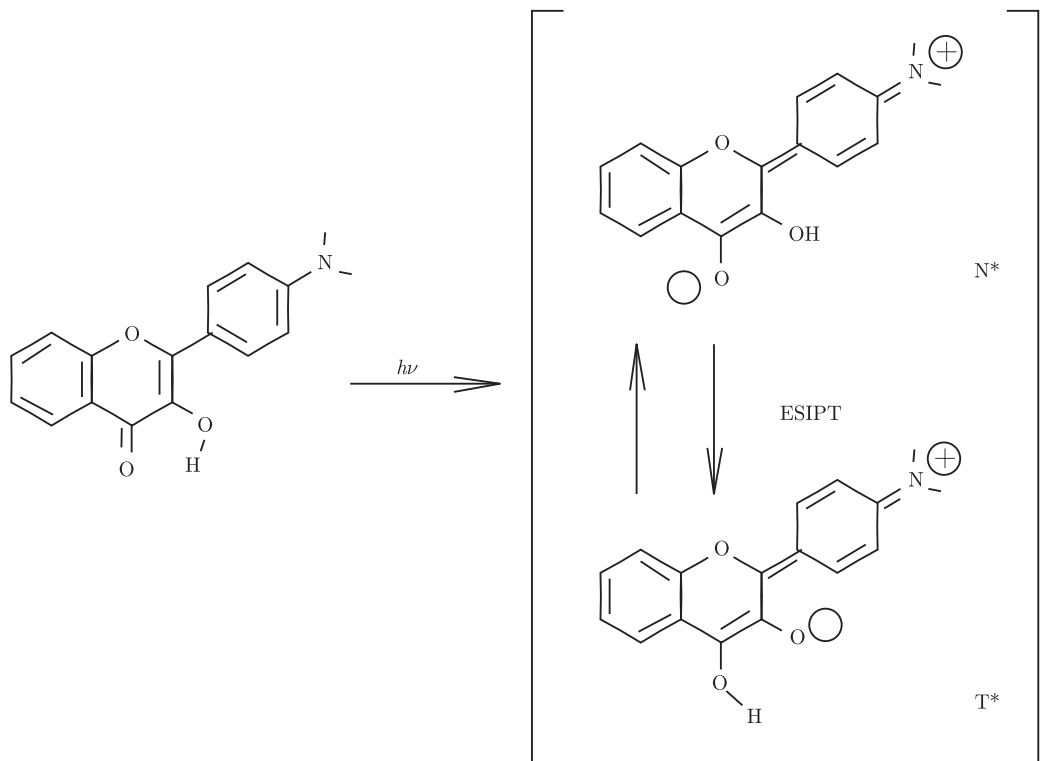


Рис. 1. Химическая структура основного и возбужденного состояний ФМЕ [14]

предпосылкой использования ФМЕ для изучения взаимодействия криозащитных добавок с альбумином.

**Материалы и методы.** САЧ, не содержащий жирных кислот (“Sigma”, США), растворяли на физиологическом растворе с добавлением 5 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,4. Концентрация белка в опытах составляла 1 мг/мл.

Таблица 1. Характеристика исследуемых КП

КП	Класс химических соединений	Структурная формула	$\log K_p$
ГЛ	Триолы	$\begin{array}{c} \text{ОН} \quad \text{ОН} \quad \text{ОН} \\   \quad   \quad   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2 \end{array}$	$-2,41 \pm 0,32$
ЭГ	Диолы	$\text{НО}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{ОН}$	$-1,69 \pm 0,21$
ПД	То же	$\begin{array}{c} \text{НО}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{ОН} \end{array}$	$-1,34 \pm 0,22$
ДМСО	Сульфоксиды	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	$-1,35 \pm 0,28$
ДМФ	Амиды	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\    \quad   \\ \text{H}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_3 \end{array}$	$-1,01 \pm 0,28$
ДМАЦ	То же	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\    \quad   \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_3 \end{array}$	$-0,75 \pm 0,12$

Примечание.  $\log K_p$  — логарифм коэффициента распределения веществ в системе *n*-октанол — вода

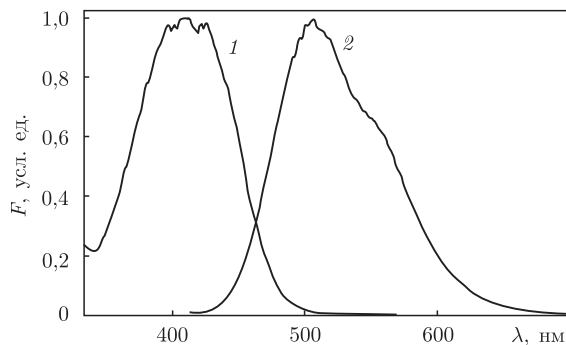


Рис. 2. Нормированные спектры возбуждения (1) и флуоресценции (2) зонда ФМЕ, связанного с САЧ

Зонд ФМЕ, синтезированный по методу [7] и любезно предоставленный В.Г. Пивоваренко (Киевский национальный университет им. Т.Г. Шевченко), растворяли на спирту и использовали в конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-6}$  М.

В работе использовали ПД марки “х. ч.” (ПО “Химпром”, Кемерово), ДМСО и ГЛ марки “ч. д. а” (“Реахим”, Москва), ЭГ, ДМФ и ДМАЦ марки “ч. д. а” (“Sigma”, США). Все растворы готовили на дважды дистиллированной воде, а КП дополнительно очищали как описано ранее [8].

Спектры регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Ширины щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции составляли 5 и 5 нм соответственно. Флуоресценцию ФМЕ возбуждали светом с длиной волны 405 нм и регистрировали в области 425–700 нм. Спектры возбуждения регистрировали в максимуме спектров флуоресценции ФМЕ. Все измерения производили в термостатируемой кювете при  $(20 \pm 1)$  °С.

Обработку результатов измерений проводили в программе Microcal Origin 6.1. Положение максимумов полос определяли при разложении спектров по программе Spectra Data Lab [5]. Значения логарифма коэффициента распределения КП в системе *n*-октанол — вода ( $\log K_p$ ) рассчитывали при помощи пакета программ ACD Labs. Параметры связывания ФМЕ с белком определяли методом двойного флуориметрического титрования [9].

**Результаты исследования.** Несмотря на то что у зонда ФМЕ в малополярных растворителях достаточно хорошо выражены обе полосы эмиссии [10, 11], в воде и водных растворах КП его флуоресценция сильно тушится водой, а спектр является однополосным. Это позволяет следить за изменениями спектров флуоресценции комплекса ФМЕ–САЧ в водно-криопротекторных средах без удаления несвязанного с белком зонда.

При связывании ФМЕ с САЧ интенсивность его флуоресценции возрастает в 15–20 раз, и в спектре отчетливо проявляются две полосы эмиссии с преобладанием интенсивности коротковолновой  $N^*$ -полосы (рис. 2).

В комплексе ФМЕ — САЧ максимум спектра, совпадающий в данном случае с максимумом наиболее интенсивной  $N^*$ -полосы, находится при  $(506 \pm 1)$  нм, а максимум  $T^*$ -полосы, полученный из данных разложения спектра по программе Spectra Data Lab, расположен около  $(553 \pm 2)$  нм. Повышение интенсивности флуоресценции зонда является следствием роста вязкости окружения в результате связывания с белком. В то же время положение максимума  $N^*$ -формы ( $(506 \pm 1)$  нм) и превышение интенсивности эмиссии  $N^*$ -формы над  $T^*$ -формой (отношение интенсивностей нормальной и таутомерной полос  $F_{N^*}/F_{T^*}$  составляет  $1,5 \pm 0,03$ ) свидетельствует о достаточно высокой полярности окружения зонда в белке и об образовании межмолекулярных водородных связей с окружением. Положение макси-

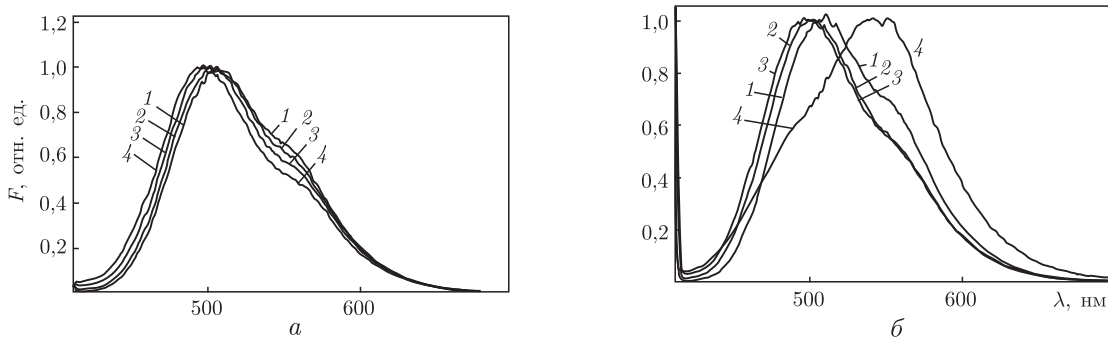


Рис. 3. Влияние ГЛ (а) и ДМСО (б) на форму спектров флуоресценции ФМЕ в САЧ: 1 — контроль; 2 — 1 М; 3 — 2,5 М; 4 — 4,5 М криопротектора. Спектры нормированы на интенсивность максимума

муна N\*-формы в белке идентично с его положением в 1-пентаноле (для которого значение диэлектрической проницаемости  $\epsilon = 13,9$ ), что характеризует полярность окружения зонда в белке. В то же время положение T\*-формы сдвинуто в коротковолновую область по сравнению с ее положением в 1-пентаноле. Такой эффект соответствует повышенной удельной концентрации гидроксильных групп протонодонора в сравнении с 1-пентанолом, что, по-видимому, является результатом присутствия молекул воды в окружении зонда [12]. Рассчитанные значения средней константы ( $K_c = (1,32 \pm 0,19) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) и числа центров ( $N = 1,68 \pm 0,22$ ) связывания ФМЕ с САЧ свидетельствуют о достаточно высоком средстве молекулы зонда к белку и наличии более чем одного центра связывания.

Направленность влияния исследованных КП на спектры флуоресценции ФМЕ, связанного с САЧ, сходна: с увеличением содержания КП в среде, наблюдается снижение относительного квантового выхода флуоресценции, изменение соотношения интенсивностей и взаимного расположения нормальной и таутомерной полос флуоресценции зонда.

Поскольку из присутствующих в системе компонентов только вода может эффективно тушить флуоресценцию ФМЕ [5], снижение относительного квантового выхода флуоресценции зонда под влиянием КП можно объяснить его конкурентным вытеснением из центров связывания на белке молекулами КП. Об этом свидетельствуют резкое падение интенсивности эмиссии зонда (до ее уровня в смесях КП — вода), а также характерное изменение формы спектров, приближающееся, по мере увеличения концентрации КП в растворе, к однополосной. Рис. 3 иллюстрирует характерное влияние на форму спектров флуоресценции ФМЕ, связанного с САЧ, отличающихся по своим физико-химическим свойствам ГЛ и ДМСО.

Известно, что логарифм коэффициента распределения ( $\log K_p$ ) веществ в системе *n*-октанол — вода отражает степень их гидрофобности. Сопоставление расположенных по этому признаку КП в ряд (в порядке возрастания эффекта: ГЛ < ЭГ < ПД < ДМСО < ДМФ < ДМАЦ) (см. табл. 1) с эффективностью вытеснения зонда ФМЕ из центров сорбции на белке обнаруживает хорошую корреляцию ( $r = 0,999$ ). Это означает, что связывание ФМЕ с САЧ происходит преимущественно по гидрофобному механизму и только КП с наиболее выраженными гидрофобными свойствами, такие как дизамещенные амиды ДМФ и ДМАЦ, а также сульфоксид ДМСО, могут эффективно конкурировать с ним за места связывания на молекуле белка по указанному механизму.

Из-за сложного характера взаимодействия ФМЕ с альбумином отношение интенсивностей флуоресценции его нормальной и таутомерной форм  $F_{N^*}/F_{T^*}$ , обычно используемое

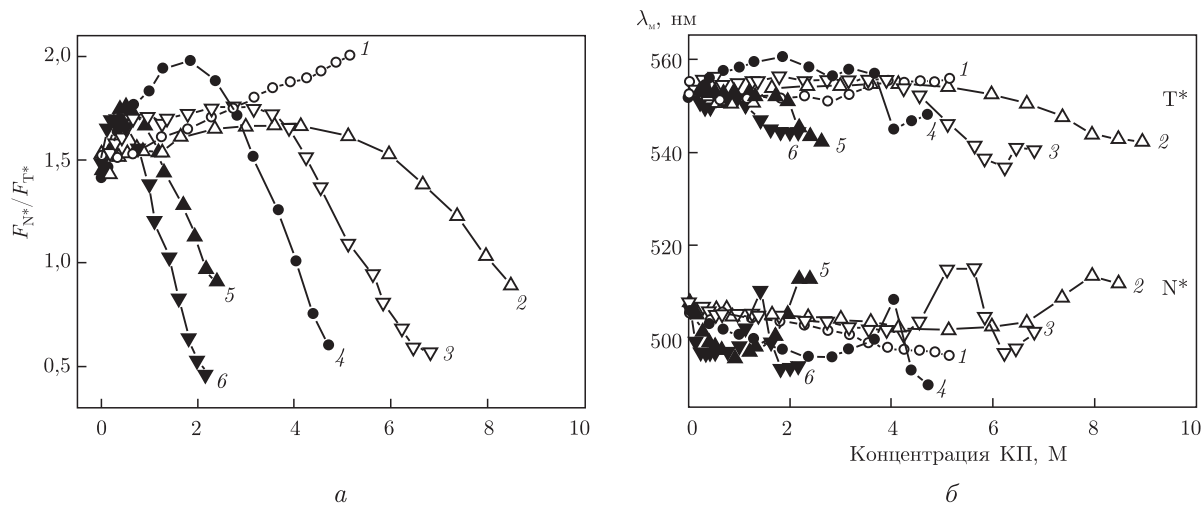


Рис. 4. Влияние КП на отношение интенсивностей (а) и положение максимумов (б)  $N^*$ - и  $T^*$ -полос флуоресценции зонда ФМЕ, связанного с САЧ: 1 – ГЛ; 2 – ЭГ; 3 – ПД; 4 – ДМСО; 5 – ДМФ; 6 – ДМАЦ

для характеристики полярности окружения зонда в липидном бислое, не позволяет однозначно судить о полярности окружения зонда. Тем не менее, в совокупности с анализом формы спектра зонда и положения его  $N^*$ - и  $T^*$ -полос, оно оказывается полезным при расшифровке механизмов взаимодействия КП с САЧ.

Анализ формы спектров показывает, что нелинейность зависимости отношения  $F_{N^*}/F_{T^*}$  от содержания КП в среде обусловлена наличием двух сайтов связывания зонда на белке, различающихся по своим физико-химическим характеристикам. Причем, как видно из рис. 3, при одинаковой концентрации более липофильный соразтворитель оказывает большее влияние на форму спектра зонда.

В случае ГЛ наблюдается рост параметра  $F_{N^*}/F_{T^*}$  во всей исследованной области концентраций (рис. 4, а). Этот рост сопровождается разнонаправленными сдвигами положения максимумов  $N^*$ - и  $T^*$ -полос флуоресценции ФМЕ:  $N^*$ -полоса сдвигается в коротковолновую сторону на  $(10 \pm 2)$  нм — от 506 до 496 нм, а  $T^*$ -полоса — в длинноволновую сторону на  $(3 \pm 1)$  нм — от 553 до 556 нм (см. рис. 4, б). Поскольку  $N^*$ -полоса проявляет высокую чувствительность к полярности микроокружения зонда и присутствию в его окружении доноров водородной связи [12], ее коротковолновое смещение может быть интерпретировано как уменьшение концентрации донора Н-связей в месте локализации ФМЕ на белке в присутствии ГЛ. С другой стороны, положение  $T^*$ -полосы не изменяется при относительно высоких концентрациях воды (до  $\sim 3$  М), а при уменьшении концентрации воды  $< 3$  М может наблюдаться ее длинноволновый сдвиг [12]. В совокупности полученные данные позволяют сделать вывод, что в присутствии исследованных концентраций ГЛ происходят повышение вязкости и дегидратация поверхностной области молекулы альбумина, что может быть связано с сорбцией этого КП на поверхности белка и частичным замещением гидратной воды [13]. Слабое влияние ГЛ на форму спектров флуоресценции ФМЕ, связанного с САЧ (см. рис. 3), по мнению автора, свидетельствует о том, что в исследованной области концентраций (0,1–2,5 М) ГЛ не проникает глубоко в архитектуру белковой молекулы и не конкурирует с флуоресцентным зондом за более липофильный сайт связывания.

Для остальных исследованных КП наблюдается нелинейная зависимость отношения  $F_{N^*}/F_{T^*}$  от концентрации (см. рис. 4, а): вначале значение параметра  $F_{N^*}/F_{T^*}$  возрастает,

а затем, с увеличением концентрации ЭГ > 4 М; ПД > 2,7 М; ДМСО > 1,8 М; ДМФ > 0,46 М; ДМАЦ > 0,3 М, — снижается. Можно предположить, что при концентрациях КП выше указанных значений энергия сольватации зонда криопротектором превышает энергию его удерживания сайтом белка минус энергия сольватации криопротектором сайта связывания:  $E_{\text{Cryprot-Probe}} > E_{\text{Protein-Probe}} - E_{\text{Cryprot-Protein}}$ . ГЛ в воде, очевидно, образует сольватную оболочку вокруг зонда несколько иного типа [14], поэтому, возможно, отсутствует “скачок” на рис. 4, а. В то же время сохранение плеча Т\*-формы при его максимальных концентрациях может также свидетельствовать о том, что он не замещает молекулу зонда в более липофильном сайте. При содержании ПД > 6 М, ДМФ > 3,4 М и ДМАЦ > 2,2 М происходит повторное небольшое увеличение отношения  $F_{\text{N}^*}/F_{\text{T}^*}$  с его последующим снижением до уровня флуоресцентного сигнала ФМЕ, находящегося в соответствующем водно-криопротекторном растворе.

Сдвиг N\*-полосы в коротковолновую сторону, подобный наблюдаемому в присутствии ГЛ, отмечается для остальных КП в области концентраций, соответствующих возрастанию отношения  $F_{\text{N}^*}/F_{\text{T}^*}$ . Однако не во всех случаях этот сдвиг сопровождается длинноволновым смещением Т\*-полосы. Так, длинноволновое смещение таутомерной формы наблюдается в присутствии ДМСО (на  $(4 \pm 1)$  нм), ПД (на  $(3 \pm 1)$  нм) и ЭГ (на  $(2 \pm 1)$  нм), но слабо выражено в присутствии ДМАЦ (< 2 нм) и ДМФ (< 1 нм). Иначе говоря, ДМСО, ПД и ЭГ достаточно эффективно взаимодействуют с поверхностью молекулы альбумина, вызывая в большей или меньшей степени ее дегидратацию, тогда как ДМФ и ДМАЦ, связываясь с белком, по-видимому, оказывают меньшее влияние на его гидратную оболочку. При достижении точки перегиба, соответствующей определенной для каждого КП концентрации, происходит снижение отношения  $F_{\text{N}^*}/F_{\text{T}^*}$ , сопровождающееся сближением положения нормальной и таутомерной форм (см. рис. 4). Заметно возрастающий при этом относительный вклад в спектры зонда N\*-формы, наряду с ее длинноволновым сдвигом, свидетельствует об увеличении концентрации донора водородной связи (по-видимому, молекул воды) в окружении ФМЕ. С увеличением содержания КП в растворе спектр флуоресценции ФМЕ постепенно утрачивает двухполосность и приближается по форме к наблюдаемому в водно-криопротекторных растворах. Поскольку эти изменения происходят на фоне общего падения относительного квантового выхода флуоресценции комплекса ФМЕ — САЧ, можно сделать вывод, что имеет место конкуренция между молекулами КП и ФМЕ за сайты связывания на белке.

Вместе с тем при промежуточных концентрациях ДМСО, ДМФ и ДМАЦ в коротковолновой области спектров флуоресценции ФМЕ наблюдается вторая коротковолновая полоса, которая может быть отнесена к негидратированной N\*-форме зонда, локализующейся, по-видимому, глубоко в полости неполярного связывающего сайта альбумина и скрытой от контакта с водой (и, возможно, с молекулами КП). Данный эффект иллюстрируют плечо в спектре (кривая 4) на рис. 3, б, а также изменения взаимного положения N\*- и Т\*-полос на рис. 4, б. Наблюдаемое после слияния полос при содержании ПД > 6 М, ДМФ > 3,4 М и ДМАЦ > 2,2 М небольшое увеличение интенсивности спектров отражает, по-видимому, момент максимального заполнения всех возможных мест связывания на белке молекулами КП. При этом молекулы ФМЕ, будучи вытесненными из более липофильного сайта, еще некоторое время остаются связанными с поверхностью белка. Вследствие незначительного роста вязкости окружения интенсивность эмиссии ФМЕ повышается, а затем зонд в оболочке из молекул КП вытесняется в окружающую водную среду, где его эмиссия в значительной степени тушится.

В целом, поведение ФМЕ в присутствии КП подтверждает данные флуориметрического титрования и свидетельствует о том, что зонд имеет на молекуле САЧ два типа связывающих сайтов, которые характеризуются соответственно высоким и низким сродством к нему. При этом из поверхностного сайта, к которому зонд имеет низкое сродство, он “вымывается” криопротектором постепенно, а из более глубоко расположенного сайта, к которому ФМЕ имеет высокое сродство, зонд выталкивается в растворитель скачкообразно, после “наполнения” данного сайта молекулами более липофильных КП.

Из полученных результатов следует, что связывание гидрофильного триола ГЛ с молекулой САЧ ограничивается специфическим взаимодействием с поверхностью белка путем образования Н-связей. Указанный механизм, по-видимому, преобладает и в связывании с белком гидрофильных диолов ЭГ и ПД. В то же время в связывании с молекулой альбумина молекул сульфоксида ДМСО, а также амидов ДМФ и ДМАЦ, обладающих выраженными дифильными свойствами, играют роль как специфические (Н-связь), так и неспецифические (гидрофобные) взаимодействия, соотношение которых, очевидно, складывается в пользу того или другого механизма в зависимости от гидрофильно-гидрофобного баланса молекулы. Кроме того, данный эффект имеет концентрационно-зависимый характер. То есть при увеличении содержания дифильных КП в среде, по мере заполнения ими неполярных участков молекулы САЧ, по-видимому, усиливается вклад во взаимодействие с белком их “гидрофильной” части. Подобные изменения могут вызывать дополнительную перестройку водно-криопротекторной сольватной оболочки белка и оказывать негативное влияние на его конформационную устойчивость и функциональные свойства.

Таким образом, полученные результаты показывают, что взаимодействие КП с САЧ, определяемое с помощью флуоресцентного зонда ФМЕ, зависит от индивидуального химического строения молекул КП и в первую очередь их гидрофильно-гидрофобного баланса. К тому же, наряду с уникальными спектральными свойствами зонда ФМЕ, обнаруженная его способность к двухсайтовому связыванию с САЧ расширяет, по мнению автора, возможности исследования белковой молекулы и свидетельствует о том, что этот зонд имеет хорошие перспективы для изучения взаимодействия органических криозащитных веществ с альбумином в водных средах. Предложенный подход позволяет оценивать сравнительную эффективность взаимодействия различных КП с альбумином. При проведении дальнейших исследований представляет интерес выяснение особенностей взаимодействия КП с альбуминами, полученными из различных источников (плацентарный альбумин, альбумины животных и т. п.).

*Автор выражает искреннюю благодарность канд. хим. наук В. Г. Пивоваренко (Киевский национальный университет им. Т. Г. Шевченко) и д-ру биол. наук Т. П. Линник (Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков) за ценные замечания, высказанные при обсуждении работы.*

1. *Клеточные и тканевые криоконсервированные биопрепараты.* – Харьков: ИПКиК НАН Украины, 2004. – 67 с.
2. *Линник Т. П.* Фізико-хімічні фактори кріопшкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Харків, 2003. – 36 с.
3. *Альбумин* сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю. А. Грызунова, Г. Е. Добрецова. Кн. 2. – Москва: ГЭОТАР, 1998. – 440 с.
4. *Guharay J., Sengupta B., Sengupta P. K.* Protein-flavonol interaction: fluorescence spectroscopic study // *Proteins.* – 2001. – **43**, No 2. – P. 75–81.
5. *Ercelen S., Klymchenko A. S., Mely Y., Demchenko A. P.* The binding of novel two-color fluorescence probe FA to serum albumins of different species // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2005. – **35**, No 5. – P. 231–242.

6. *Demchenko A. P., Klymchenko A. S., Pivovarenko V. G., Ercelen S.* Ratiometric probes: design and applications // *Fluorescence Spectroscopy Imaging and Probes – New Tools in Chemical, Physical and Life Sciences* / Ed. by R. Kraayenhof, A. J. W. G. Visser, H. C. Gerritsen. – Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. – Vol. 2. – P. 101–110. – (Springer Series on Fluorescence Methods and Applications).
7. *Smith M. A., Neumann R. M., Webb R. A.* A modification of the Algar-Flynn-Oyamada preparation of flavonols // *J. Heterocycl. Chem.* – 1968. – No 5. – P. 425–426.
8. *Єгорєв М. І., Дюбко Т. С., Лінник Т. П. та ін.* Нові флуоресцентні барвники як зонди для дослідження сперматозоїдів в криозахисних середовищах // *Пробл. криобіології.* – 2006. – № 1. – С. 13–23.
9. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – Москва: Наука, 1980. – 320 с.
10. *Ercelen S., Klymchenko A. S., Demchenko A. P.* Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities // *Anal. chim. acta.* – 2002. – **464**. – P. 273–287.
11. *Demchenko A. P., Ercelen S., Rochal A. D., Klymchenko A. S.* Excited state proton transfer reaction in a new benzofuryl 3-hydroxychromone derivative: the influence of low-polar solvents // *Polish. J. Chem.* – 2002. – **76**. – P. 1287–1299.
12. *Pivovarenko V. G., Wróblewska A., Błażejowski J.* 2-[4-(Dimethylamino)phenyl]-3-hydroxy-4H-chromene-4-one: a H-bond-sensitive fluorescent probe for investigating binary mixtures of organic solvents // *Anal. chim. acta.* – 2005. – **545**. – P. 74–78.
13. *Моисеев В. А.* Молекулярные механизмы криповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1984. – 48 с.
14. *Рошаль А. Д., Дюбко Т. С., Лінник Т. П.* 4'-диметиламинофлавонол – новый флуоресцентный зонд для оценки криопротекторных свойств органических веществ в водных растворах // *Вісн. Харків. ун-ту ім. В. Н. Каразіна.* – 2005. – № 716. – Біоф. вісн. – Вип. 2(16). – С. 106–111.

ГНУ Научно-технологический комплекс  
 “Институт монокристаллов” НАН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 07.05.2007