

ДИЕЛЕКТРИЧНА ПРОНИКНІСТЬ ЗДАТНИХ ДО ВІТРИФІКАЦІЇ КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ

О.О. Горобченко*, Н.О. Шевченко, О.В. Ліпіна, О.Т. Ніколов*, І.Б. Мусатова

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23,
Харків, 61016, Україна*

e-mail: shevchenko_nadyusha@ukr.net

**Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна*

e-mail: gorobchenko@karazin.ua

Надійшла до редакції 9 червня 2016 року

Прийнята 25 серпня 2016 року

Метою роботи було визначення діелектричних характеристик і стану води у здатних до вітрифікації кріозахисних середовищах PVS2, 88%-й PVS3 та PVSN, до складу яких входять такі проникаючі криопротектори як гліцерин, диметилсульфоксид, етиленгліколь та непроникаючий криопротектор сахароза. Ці середовища широко використовуються при кріоконсервуванні меристем, ембріодів, калюсу, що дозволяє зберігати генетичні ресурси рослин в умовах рідкого азоту впродовж тривалого часу. Діелектричні характеристики зразків кріозахисних середовищ, їх дійсну ϵ' і уявну ϵ'' частини, вимірювали при температурі 20°C за допомогою НВЧ-діелектрометра резонаторного типу на частоті 9,2 ГГц. Величини статичної діелектричної проникності ϵ_s середовищ на нижній ділянці області релаксації молекул води та частоти діелектричної релаксації молекул води f_d розраховували з використанням рівнянь Дебая. Встановлено, що найменші значення діелектричних параметрів характерні 88%-му кріозахисному середовищу PVS3, до складу якого входять такі криопротектори як гліцерин та сахароза. Це середовище має найбільшу здатність зв'язувати та впорядковувати воду. За даними визначення цитотоксичності та впливу низькотемпературного зберігання на життєздатність меристем картоплі, винограду та часнику усі досліджені кріозахисні середовища можна використовувати при розробці ефективних режимів кріоконсервування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кріозахисні середовища, меристема, гліцерин, диметилсульфоксид, етиленгліколь, сахароза, НВЧ-діелектрометрія.

ДИЕЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ СПОСОБНЫХ К ВИТРИФИКАЦИИ КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД

О.А. Горобченко*, Н.А. Шевченко, О.В. Липина, О.Т. Николов*, И.Б. Мусатова

*Институт проблем кробиологии и кримицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23,
Харьков, 61016, Украина*

**Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина*

Целью работы было определение диэлектрических характеристик и состояния воды в способных к витрификации криозащитных средах PVS2, 88%-й PVS3 и PVSN, в состав которых входят такие проникающие криопротекторы как глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль и непроникающий криопротектор сахароза. Эти среды широко используются при кріоконсервировании меристем, эмбрионидов, каллуса, что позволяет сохранять генетические ресурсы растений в условиях жидкого азота в течение длительного времени. Диэлектрические характеристики образцов криозащитных сред, их действительную ϵ' и мнимую ϵ'' части, измеряли при температуре 20 °C с помощью СВЧ-диэлектromетра резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц. Величины статической диэлектрической проницаемости ϵ_s сред на нижнем участке области релаксации молекул воды и частоты диэлектрической релаксации молекул воды f_d рассчитывали с использованием уравнений Дебая. Установлено, что наименьшие значения диэлектрических параметров характерны 88%-й криозащитной среде PVS3, в состав которой входят такие криопротекторы как глицерин и сахароза. Эта среда имеет наибольшую способность связывать и упорядочивать воду. По данным определения цитотоксичности и влияния низкотемпературного хранения на жизнеспособность меристем картофеля, винограда и чеснока все исследованные криозащитные среды можно использовать при разработке эффективных режимов кріоконсервирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: криозащитные среды, меристема, глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль, сахароза, СВЧ-диэлектromетрия.

DIELECTRIC PERMITTIVITY CAPABLE OF VITRIFICATION CRYOPROTECTIVE MEDIA**O.A. Gorobchenko*, N.O. Shevchenko, O.V. Lipina, O.T. Nikolov*, I.B. Musatova***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya Str., 61016 Kharkiv, Ukraine***V.N. Karazin Kharkiv National University, 4, Svobody Sq., 61022 Kharkiv, Ukraine*

The research aim was to determine dielectric parameters and state of water in capable of vitrification media PVS2, 88% PVS3 and PVSN, the components of those are glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and non-penetrating cryoprotectant sucrose. These media are widely used to cryopreserve meristems, embryoids, callus, allowing the preservation of plant genetic resources under liquid nitrogen conditions for a long time period. Dielectric characteristics of the samples of cryoprotective media, their real ϵ' and imaginary ϵ'' components were measured at 20 °C using resonant type UHF-dielectrometer at 9.2 GHz frequency. The values of static dielectric permittivity ϵ_s of the media on the low-frequency side of the water relaxation and dielectric relaxation frequency of water molecules f_d were counted using the Debye equations. It has been shown that the least values of dielectric parameters are characteristic for 88% cryoprotective medium PVS3, which comprises such cryoprotectants as glycerol and sucrose. This medium has the highest ability of binding and ordering the water. When determining the cytotoxicity and effect of low temperature storage on viability of potato, grape, garlic meristems all the studied cryoprotective media can be used when developing the efficient protocols of cryopreservation.

KEY WORDS: cryoprotective, meristems, glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, sucrose, UHF-dielectrometer.

Глобальне погіршення екологічної ситуації призводить до втрати видового різноманіття та зменшення ємності генофонду місцевих сортів культурних рослин і, таким чином, обумовлює необхідність збереження генетичних ресурсів рослин [1]. Створення банків рослинних об'єктів потребує забезпечення стабільності генома рослин, які зберігаються протягом тривалого часу. Таку можливість дає використання низькотемпературного консервування, зокрема меристем рослин [2]. До переваг зберігання рослинних генетичних ресурсів шляхом кріоконсервування меристем можна віднести те, що рослина безпосередньо розвивається з меристеми без утворення калюсу, тим самим забезпечує генетичну стабільність. Найбільш ефективним методом кріоконсервування біологічних об'єктів на теперішній час вважається метод вітрифікації, який базується на дегідратації клітин перед заморожуванням, а також на здатності кріопротекторів при високих концентраціях та швидкостях охолодження модифікувати процеси кристалізації води [3, 4]. Формування склоподібного стану рідини (вітрифікація) дозволяє на досить високому рівні зберегти життєздатність об'єктів з різним ступенем складності біологічної організації. Найчастіше для кріоконсервування рослин, які розмножуються вегетативним шляхом, використовують здатні до вітрифікації кріозахисні середовища, до складу яких входять як проникаючі (гліцерин, диметилсульфоксид (ДМСО), етиленгліколь (ЕГ)), так і непроникаючі кріопротектори (сахароза) [5]. При кріоконсервуванні меристем винограду та картоплі була показана висока ефективність використання складного кріозахисного середовища PVS2 (plant vitrification solution 2) [6], для кріоконсервування часнику – середовища PVS3 (plant vitrification solution 3) [7], для кріоконсервування меристем картоплі, винограду і часнику – середовища PVSN (plant vitrification solution new) [8, 9].

Звертаючи увагу на те, що майже усі кріопротектори, які застосовують при кріоконсервуванні біологічних об'єктів, є ксенобіотиками, то їхня цитотоксичність являється суттєвою перешкодою для досягнення основної мети – забезпечення високого рівня життєздатності зразку після циклу низькотемпературного консервування. Пошкодження клітин на етапі взаємодії об'єкту, який кріоконсервують, з розчинами кріопротекторів виникають з цілого ряду причин. Кріопротектори, які мають високу осмотичну активність, але низьку здатність до проникнення через плазмолему, у високих молярних концентраціях можуть стати причиною гибелі клітин

у результаті гіпертонічного стресу [4, 10]. Довгий час токсична дія кріопротекторів на клітини пояснювалася тим, що їхнє додавання викликає осмотичний шок. У основі осмотичного пошкодження клітин при введенні і видаленні кріопротекторів лежать наслідки швидкої зміни клітинного об'єму, які продукують деформацію складноорганізованих тривимірних структурно-функціональних систем, що включають комплекс клітинна стінка – плазматична мембрана – цитоскелет [5]. Це у свою чергу призводить до зміни механічної міцності цитоплазматичних мембран, їх проникності для води і іонів, що може спричинити зміну кінетики окремих біохімічних реакцій чи метаболізму вцілому. Однак не виключена і пряма токсична дія кріопротекторів на клітини [4, 11]. Хімічна цитотоксичність віддзеркалює здатність кріопротекторів викликати структурно-функціональні порушення у результаті взаємодії з макромолекулами живої біологічної системи. Кріопротектори можуть впливати на фізико-хімічні властивості мембран, на структурну підпорядкованість ліпідного бішару, на фізичну структуру цитоплазми (агрегатний і структурний стан білків цитоскелета). При цьому реалізується здатність хімічних сполук до утворення водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій, внаслідок чого кріопротектори впливають, у першу чергу, на властивість внутрішньоклітинної осмотично активної води. Не виключена можливість впливу на зв'язану гідратну воду. Біохімічний аспект цитотоксичної дії речовин – це результат їхнього впливу на хід біохімічних реакцій, які призводять до порушення процесів життєдіяльності клітин [10]. Отже, незважаючи на ефективність PVS2 та PVS3, пошук нових кріозахисних середовищ продовжується з метою зменшення їх токсичної дії. Для цього використовують як варіювання складу середовищ PVS2 та PVS3 [12], так і менш концентровані розчини, наприклад 88%-й PVS3 [13].

Вважається, що захисна дія складних середовищ, що вітрифікуються, базується на здатності кріопротекторів створювати водневі зв'язки з водою як всередині, так і ззовні клітини, запобігаючи кристалізації. Але залишається нез'ясованим вплив складу і співвідношення проникаючих і непроникаючих кріопротекторів у досліджених кріозахисних середовищах на здатність кріопротекторів зв'язувати воду, на стан води і, відповідно, на здатність кріозахисних середовищ до вітрифікації і зменшення процесів кристалоутворення.

Метою цієї роботи є з'ясування діелектричних характеристик і стану води у здатних до вітрифікації середовищах PVS2, 88%-му PVS3 та PVSN, які використовуються при кріоконсервуванні меристем рослин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для приготування зразків використовували препарати виробництва фірми Merck (Германія).

Для досліджень використовували здатні до вітрифікації розчини кріопротекторів у наступних співвідношеннях:

- PVS2: 30 % гліцерину (w/v), 15 % ДМСО (w/v), 15 ЕГ (w/v), 13,7 % сахарози (w/v);
- PVS3 88%: 44 % гліцерину (w/v), 44 % сахарози (w/v);
- PVSN: 18,5 % гліцерину (w/v), 15 % ЕГ (w/v), 34 % сахарози (w/v) (експериментальна модифікація середовища).

Розчини готували об'ємно-ваговим методом на живильному середовищі MS (Murashige-Scoog) без фітогормонів і сахарози [15].

Діелектричну проникність зразків кріозахисних середовищ, їхню дійсну ϵ' і уявну ϵ'' частини, вимірювали при температурі 20°C за допомогою НВЧ-діелектрометра резонаторного типу на частоті 9,2 ГГц [16].

Токсичну дію кріозахисних середовищ визначали на меристемах картоплі, часнику та винограду за кількістю життєздатних апексів (меристем), які після відмивання від кріопротекторів мали позитивну динаміку росту та розвитку в культурі *in vitro* протягом місяця. Обробку меристем розчинами, здатними до вітрифікації, та відмивання від них проводили згідно розроблених протоколів для кріоконсервування [2, 6-9] без етапу занурення у рідкий азот. За цим самим методом визначали кількість життєздатних меристем після низькотемпературного зберігання у рідкому азоті.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлені значення дійсної (ϵ') та уявної (ϵ'') частин комплексної діелектричної проникності досліджуваних зразків. Показано, що значення діелектричних параметрів живильного середовища MS (зразок 5) не відрізняються від таких для води (зразок 1), але для розчинів, здатних до вітрифікації (зразки 2-4), вони суттєво знижуються. Таке зниження діелектричних параметрів є наслідком зменшення у зразках кількості вільних молекул води за рахунок присутності кріопротекторів у розчинах, які мають низькі значення діелектричних параметрів (для гліцерину при 25°C $\epsilon_s=40,1$ [17]) та за рахунок їхньої гідратації.

Величиною, пропорційною кількості вільних молекул води у розчині, є статична діелектрична проникність ϵ_s (діелектрична проникність на нижній ділянці релаксації молекул води), яку розраховують за рівнянням Дебая в припущенні дебаївського характеру релаксації молекул води в розчинах кріопротекторів. Чим менше її значення, тим менше у зразку вільних молекул води, що беруть участь в процесі діелектричної релаксації. При порівнянні між собою середовищ, здатних до вітрифікації (2-4), за параметром статичної діелектричної проникності ϵ_s (рис. 2) можна зробити висновок, що найбільше вільної води міститься в середовищі PVSN (2), а найменше – в середовищі 88% PVS3 (4). Використовуючи значення ϵ_s водного розчину певного кріопротектору за умови його низької концентрації можна розрахувати кількість молекул зв'язаної води на молекулу кріопротектора (ступінь гідратації). Хоч для багатокомпонентних кріозахисних середовищ з високою концентрацією складових компонентів такі розрахунки зробити важко. Але можна оцінити здатність кріопротекторів зв'язувати воду за допомогою декременту статичної діелектричної проникності:

$$\Delta\epsilon_s = \frac{\epsilon_s^0 - \epsilon_s}{C},$$

де ϵ_s^0 – статична діелектрична проникність розчинника, ϵ_s – статична діелектрична проникність розчину, C – концентрація розчинених речовин. За декрементом статичної діелектричної проникності найбільшу здатність зв'язувати воду має зразок 88%-й PVS3 ($\Delta\epsilon_s=0,7 \cdot 100 \text{ см}^3/\text{г}$), меншу – PVSN ($\Delta\epsilon_s=0,6 \cdot 100 \text{ см}^3/\text{г}$), ще меншу – PVS2 ($\Delta\epsilon_s=0,5 \cdot 100 \text{ см}^3/\text{г}$).

Величина частоти діелектричної релаксації молекул води f_d , яка розраховується з рівнянь Дебая, характеризує ступінь упорядкованості структури вільної води у зразках. Істотне зниження величини f_d в середовищах, здатних до вітрифікації (2-4), порівняно з водою і живильним середовищем MS (5) свідчить про збільшення середньої кількості водневих зв'язків між молекулами води в цих середовищах, в результаті чого структура вільної води в них стає більш упорядкованою.

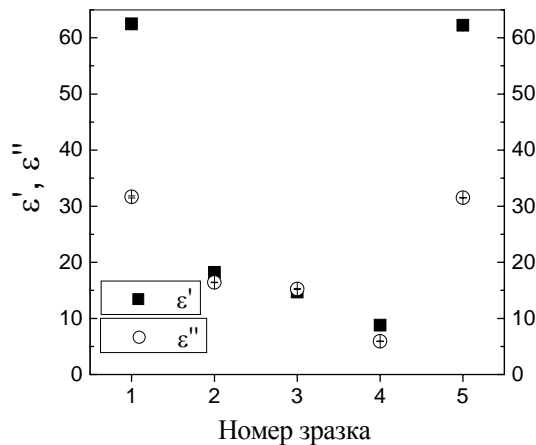


Рис. 1. Дійсна (ϵ') та уявна (ϵ'') частини комплексної діелектричної проникності зразків: 1 – H_2O ; 2 – PVSN; 3 – PVS2; 4 – 88%-й PVS3; 5 – живильне середовище MS.

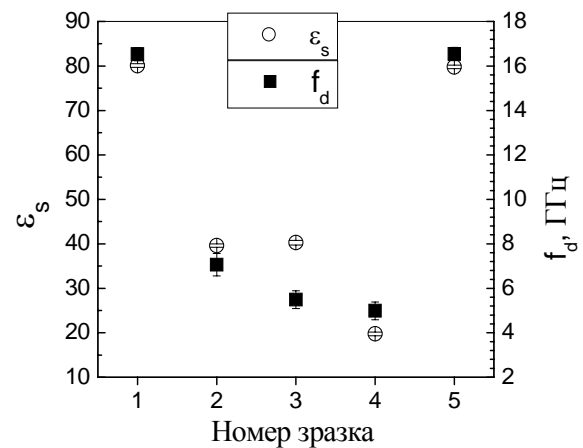


Рис. 2. Статична діелектрична проникність (ϵ_s) і частота діелектричної релаксації молекул води (f_d) зразків: 1 – H_2O ; 2 – PVSN; 3 – PVS2; 4 – 88%-й PVS3; 5 – живильне середовище MS.

Оскільки найменші значення діелектричних параметрів характерні 88%-му кріозахисному середовищу PVS3, можна зробити висновок, що кріопротектори, які входять до складу цього середовища, мають найбільшу здатність зв'язувати та впорядковувати воду. Цей результат цілком узгоджується з калориметричними дослідженнями [14]. Було показано, що на термограмах усіх кріозахисних середовищ спостерігається стрибок теплопоглинання, що відповідає процесу переходу склоподібної частини зразка з твердоаморфного стану в стан переохолодженої рідини. Аналіз термограм показав, що максимальна кількість речовини в аморфному стані присутня у зразку 88%-й PVS3, кількість аморфної фази у зразках PVS2 і PVSN менша. В усіх кріозахисних середовищах відсутні термічні ефекти, які відповідають процесам докristалізації льоду та плавлення евтектики, а у середовищі 88%-й PVS3 відсутній процес кристалізації з аморфної фази; при цьому термічний процес, що відповідає процесу повного плавлення усіх досліджених зразків, має незначну інтенсивність [14].

Для визначення ефективності кріозахисного середовища проводили визначення збереженості та життєздатності біооб'єктів за результатами токсичної дії середовища та впливу кріоконсервування. Нами було показано, що використання PVS 2 дозволяє отримати життєздатність меристем картоплі на рівні 75%, винограду – 80%. При кріоконсервуванні цей показник складає 70% та 75% відповідно. Після взаємодії 88%-го розчину PVS 3 з меристемами часнику ми отримали 60 % життєздатних апексів, після кріоконсервування – 53%. Застосування модифікованого нами розчину, здатного до вітрифікації (PVSN), дозволяє одержати біля 95% життєздатних меристем картоплі, винограду та часнику. Після кріоконсервування цей показник знижується до 80% для меристем картоплі і винограду та до 73% для часника.

Отже, незважаючи на те, що найменші значення діелектричних параметрів характерні 88%-му PVS3, за даними визначення життєздатності меристем усі досліджені кріозахисні середовища можна використовувати при розробці ефективних режимів кріоконсервування.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що найменші значення діелектричних параметрів характерні кріозахисному середовищу PVS3, до складу якого входять такі кріопротектори як гліцерин та сахароза у 44,4%-х концентраціях. Це середовище має найбільшу здатність зв'язувати та впорядковувати воду.

За даними визначення цитотоксичності та впливу низькотемпературного зберігання на життєздатність меристем картоплі, винограду та часнику усі досліджені кріозахисні середовища можна використовувати при розробці ефективних режимів кріоконсервування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Екологічна безпека держави: матеріали Всеукр. наук. конф. студ. і асп., 21-24 квітня 2009 р., Київ / Нац. авіац. ун-т. - К., 2009. - 232 с. / *Ekologichna bezpeka derzhavi: materiali Vseukr. nauk. konf. stud. i asp., 21-24 kvitnja 2009 r., Kiiiv / Nac. aviac. un-t. - K., 2009. - 232 s. /*
2. Кріозберігання зразків генофонду часнику / Т.І. Віценя, Т.В. Івченко, Т.Ф. Стрибуль, Н.О. Шевченко // Генетичні ресурси рослин. – 2010. – № 8. – С. 200-208. / *Kriozberigannja zrazkiv genofondu chasniku / T.I. Vichenja, T.V. Ivchenko, T.F. Stribul', N.O. Shevchenko // Genetichni resursi roslin. – 2010. – № 8. – S. 200-208. /*
3. Baudot A. Glass-forming tendency in the system water – dimethyl sulfoxide / A. Baudot, L. Algel, P. Boutron // *Cryobiology.* – 2000. – V. 41, N 1. – P. 151-158.
4. Fahy G.M. Principles of cryopreservation by vitrification / G.M. Fahy, B. Wowk // *Methods Mol Biol.* – 2015. – Vol. 1257. – P. 21-82.
5. Volk G.M., Walters C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection / G.M. Volk, C. Walters // *Cryobiology.* – 2006. – V. 52. – P. 48-61.
6. Sakai A. Development of cryopreservation techniques / A. Sakai // *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba & IPGRI. – Rome, 2000. – P. 1–7.*
7. Keller E.R.J. Cryopreservation of *Allium sativum* L (Garlic) / E.R.J. Keller // *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* – 2002. – V. 50. – P. 37–47.
8. Stribul T.F. Optimizing method for potato meristem vitrification / T.F. Stribul, N.A. Shevchenko, L.F. Rozanov // *Problems of Cryobiology.* – 2005. – Vol. 15, N4. – P. 657–654.
9. Shevchenko N.A. Integrity of grape and potato meristems using rapid freezing regimens / N.A. Shevchenko // *Problems of Cryobiology.* – 2004. – №4. – P. 30–33.
10. Best B.P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions / B.P. Best // *Rejuvenation Research.* – 2015. – V. 18 (5). – P. 422-436.
11. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity / G.M. Fahy, B. Wowk, J. Wu, S. Paynter // *Cryobiology.* – 2004. – Vol. 48, 1. – P. 22-35.
12. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures / H.H. Kim, Y.G. Lee, D.J. Shin [et al.] // *Cryo Letters.* – 2009. – V. 30 (5). – P. 320-334.
13. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification / S. Nishizawa, A. Sakai, Y. Amano, T. Matsuzawa // *Plant Science.* – 1993. – V. 91, Iss. 1. – P. 67-73.
14. Мусатова И.Б. Фазовые переходы и стеклование в защитных средах для криоконсервирования меристем растений / И.Б. Мусатова, Н.А. Шевченко // *Биофизика живой клетки.* – 2014. – Т. 10. – С. 129-130. / *Musatova I.B. Phase transitions and vitrification in protective media for cryopreservation of plant meristems / I.B. Musatova, N.O. Shevchenko // Biofizika zhivoj kletki – 2014. – T. 10. – P. 129-130. /*
15. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473–497.
16. СВЧ-діелектрометрия біотехнологічних жидкостей / Т. А. Жилякова, О. А. Горобченко, О. Т. Николов, Г. В. Голубничая. — Киев: Наукова думка, 2015. — 112 с. / *SVCh-dijelektrometrija biotehnologicheskikh zhidkостей / T. A. Zhiljakova, O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, G. V. Golubnichaja. — Kiev: Naukova dumka, 2015. — 112 s. /*
17. Sadek H. Conductance of KIO_3 in glycerol-water mixtures / H. Sadek, A.M. Haber, F.X. Khalil // *Electrochim. Acta.* – 1969. – V. 14 (11). – P. 1089-1096.