

## Влияние сахаров на дегидратацию биополимерных молекул в процессе криоконсервирования

UDC 544.723

### A.A. RUGAL\*, V.N. BARVINCHENKO, N.P. GALAGAN, I.V. SIORA, V.V. TUROV Effect of Sugars on Dehydration of Biopolymer Molecules During Cryopreservation

Методом ЯМР-спектроскопии изучена гидратация белковых молекул в присутствии сахаров – глюкозы, фруктозы и сахарозы. В широком диапазоне концентраций компонент определены параметры гидратации, рассчитаны концентрация связанной воды и межфазная энергия. На примере сывороточного альбумина показано, что внутриглобулярная вода может замещаться низкомолекулярными соединениями – сахарами. Наибольший эффект дегидратации установлен для сахарозы. При этом белковые молекулы изменяют свое свойство – способность к адсорбции на поверхности высокодисперсного кремнезема, которая снижается на 25 % вследствие образования комплексных соединений.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, криопротекторы, ЯМР-спектроскопия, гидратация, связанная вода, межфазная энергия.

Методом ЯМР-спектроскопії вивчена гідратація білкових молекул в присутності цукрів – глюкози, фруктози та цукрози. В широкому діапазоні концентрацій компонент визначені параметри гідратації, розраховані концентрація зв'язаної води та міжфазна енергія. На прикладі сироваткового альбуміну показано, що внутрішньоглобулярна вода може заміщуватись низькомолекулярними сполуками – цукрами. Найбільший ефект дегідратації встановлений для цукрози. При цьому білкові молекули змінюють свою властивість – здатність до адсорбції на поверхні високодисперсного кремнезему, яка знижується на 25 % внаслідок утворення комплексних сполук.

**Ключові слова:** криоконсервування, криопротектори, ЯМР-спектроскопія, гідратація, зв'язана вода, міжфазна енергія.

Protein molecules' hydration in the presence of sugars: glucose, fructose and sucrose were studied by NMR-spectroscopy. The parameters of hydration, concentration of bound water and value of interfacial energy were determined over a wide range of component concentrations. It was shown with exemplifying using the serum albumin, that low-molecular compounds (sugars) could replace an intraglobular water. The maximal effect of dehydration was observed for sucrose. In this case protein molecules change their property and capability to be adsorbed on a surface of fine-grained silica, which is reduced by 25% as a result of the forming complexes.

**Key-words:** cryopreservation, cryoprotectants, NMR-spectroscopy, hydration ability, bound water, interfacial energy.

Практически все способы длительного хранения клеточного материала и тканей основаны на использовании разных методов криоконсервирования [7, 10, 11]. Криоконсервированный биологический материал, хранящийся при температуре жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), используют для научных и практических целей. Однако в настоящее время не существует универсального способа, гарантирующего полное сохранение (восстановление) структуры и функций биологического объекта. Проницаемость клеточных мембран зависит от типа клеток и условий замораживания. При переходе температуры от физиологической к более низкой, чем температура стеклования воды (около  $-90^{\circ}\text{C}$ ), в клетках происходят физические и биологические процессы, которые должны быть обратимыми при последующем размораживании. Основные повреждения в клетках наблюдаются при  $15...-90^{\circ}\text{C}$ . Однако следует отметить, что при температурах  $30...0^{\circ}\text{C}$  большая часть клеток

Practically all methods of the long-term storage of cell material and tissues have been based on the application of different cryopreservation methods [7, 10, 11]. Cryopreserved biological material stored at liquid nitrogen temperature ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) is used for scientific and practical purposes. However, now there is no all-purpose method which may guarantee a complete preservation (recovery) of the structure and functions of biological object. Cell membrane permeability depends on the cell type and freezing conditions. During temperature transition from physiological to lower one than water vitrification temperature (about  $-90^{\circ}\text{C}$ ) the physical and biological processes proceed in cells which must be reversible during following thawing. The main damages of cells are recorded at  $15...-90^{\circ}\text{C}$ . However it should be noted that at  $0...30^{\circ}\text{C}$  the major part of cells preserve the membrane integrity, intracellular composition and ability to self-recovery of damages, stipulated by the presence of free radicals [6, 12]. The risk of cell damage at the temperatures lower than 0

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, г. Киев

Institute of Surface Chemistry named by A.A. Chuyko of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Ген. Наумова, 17, Киев, Украина 03164; тел.: +38 (044) 422-96-68, электронная почта: ankluchko@rambler.ru

\* To whom correspondence should be addressed: 17, General Naumov str., Kiev, Ukraine, 03164; tel.: +380 44 422 9668, e-mail: ankluchko@rambler.ru

сохраняет целостность мембран, внутриклеточный состав и способность к самовосстановлению некоторых повреждений, в частности обусловленных присутствием свободных радикалов [6, 12]. Риск повреждения клеток при температуре ниже 0°C повышается из-за образования внутриклеточных кристаллов льда [13]. Установлено, что при -40°C в каждой клетке суспензии образуются кристаллы льда [12].

При размораживании для предотвращения формирования внутриклеточных кристаллов льда и минимизации количества поврежденных клеток используют специальный протокол криоконсервирования, который обеспечивает определенный уровень дегидратации клеток или тканей. Обычно для этого применяют растворы криопротекторов высоких концентраций. В случае медленного охлаждения эффект обезвоживания достигается при переносе клеток в раствор криопротектора с определенной концентрацией [10]. При образовании кристаллов льда и дальнейшем увеличении объема замерзшей воды повышается концентрация внеклеточного раствора, что способствует дальнейшей дегидратации клеток.

Оптимальным для выживаемости клеток при криоконсервировании является условие, когда объем воды, выходящей из клеток, совпадает с объемом, переходящим в твердую фазу льда. Для обеспечения квазиравновесных условий замораживания охлаждение проводят со скоростью 3–5°C/мин до -30...-40°C с последующим погружением в жидкий азот. В результате в клетках остается небольшое количество жидкой воды, которая при переходе в твердое состояние не повреждает клеточные мембраны.

Для ускорения дегидратации при замораживании в криосреду добавляют сахара [9]. В таких растворах обеспечивается практически полная дегидратация клеток до их замораживания, что позволяет помещать материал непосредственно в жидкий азот или его пары. Одним из механизмов дегидратации клеток в присутствии сахаров может быть уменьшение количества воды, связанной с белковыми молекулами, находящимися в составе клеточных структур.

Цель работы – изучение дегидратации белковых молекул на примере транспортного белка – сывороточного альбумина [1-3, 7] в присутствии сахарозы, фруктозы и глюкозы.

### Материалы и методы

Основным методом исследования была <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопия в условиях послойного вымораживания жидкой фазы [8, 14, 15], с помощью которого измеряли концентрацию связанной воды

increases due to the formation in them of intracellular ice crystals [13]. It has been found that at -40°C in each cell of the suspension the ice crystals are formed [12].

During thawing for preventing the formation of intracellular ice crystals and minimization of damaged cells a special cryopreservation protocol providing the certain level of dehydration of cells and tissue, is used. Usually with this aim the cryoprotectant solutions under high concentrations are applied. So, at slow cooling the dehydration effect is achieved at cell transfer into the solution of cryoprotectant under certain concentration [10]. With the ice crystal formation and following increase in the volume of frozen water there is the augmentation of extracellular solution concentration, that contributes to further cell dehydration.

Optimal for cell survival during cryopreservation is the condition when water volume releasing out of cells coincides with the one transforming into solid ice phase. For providing quasi-equilibrium conditions of freezing the cooling is performed with the rate of 3...5°C/min down to -30...-40°C with following immersion into liquid nitrogen. In the result, small amount of non-frozen water remains in cells, which does not damage cell membranes during transition into solid state.

For acceleration of dehydration during freezing the sugars are added into cryoprotective medium [9]. In such solutions quite a complete dehydration of cells prior to their freezing is provided, that enables to place the material into liquid nitrogen or its vapors. One of mechanisms of cell dehydration in presence of sugars may be the reduced amount of water bound with protein molecules, being a part of cell structures.

The research aim was to study the dehydration of protein molecules on the example of transport protein: serum albumin [1-3, 7] in presence of sucrose, fructose and glucose.

### Materials and methods

The basic research methods was <sup>1</sup>H NMR spectroscopy under conditions of layer-by-layer freezing-out of liquid phase [8, 14, 15], by means of which the concentration of bound water at T<0°C and thermodynamic characteristics of water layers undergoing an excitation effect from the side of protein molecules were found.

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA), human serum albumin (HSA) (“Biofarma”, Ukraine), fructose (Fr), glucose (Gl) and sucrose (Sucr) (all of “chemically pure” grade) (Merck, Germany) were used in the research. Solutions of proteins and sugars were prepared on the base of physiological solution (0.9 % NaCl).

NMR spectra were obtained with NMR-spectrometer of high resolution WP-10 SY (“Bruker”,

при температурах  $T < 0^{\circ}\text{C}$  и рассчитывали термодинамические характеристики слоев воды, испытывающих возмущающее воздействие со стороны белковых молекул.

В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma, США), сывороточный альбумин человека (САЧ, Биофарма, Украина), фруктозу (Fr), глюкозу (Gl) и сахарозу (Sucr) (все х. ч.) (Merck, Германия). Растворы белков и сахаров готовили на основе физиологического раствора (0,9% NaCl).

Спектры ЯМР получали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения WP-100 SY (Bruker, Германия) с рабочей частотой 100 МГц и максимальной полосой пропускания 50 кГц, а также Varian Mercury (США) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали зондирующий импульс  $90^{\circ}$  длительностью 4 мкс при частоте 100 МГц и 2 мкс при 400 МГц. Температуру в датчиках спектрометров регулировали термоприставкой Bruker VT-1000 (Германия) с точностью  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Интенсивность сигналов определяли электронным интегратором с точностью  $\pm 10\%$ . Для предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах определение интенсивности сигнала незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до температуры  $-63^{\circ}\text{C}$ .

Адсорбцию белка проводили в статических условиях из водного раствора при температуре  $20^{\circ}\text{C}$ . Исходная концентрация белка 1–15 мг/мл. Отношение массы сорбента к массе раствора 1:200 (0,1 г адсорбента на 20 мл раствора белка). Для достижения адсорбционного равновесия систему инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, затем центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин и рассчитывали равновесную концентрацию САЧ спектрофотометрическим методом, исходя из значений молярных коэффициентов поглощения

$$C_p = A_{278-320} / \epsilon \cdot l,$$

где  $A_{278-320}$  – светопоглощение раствора при 278 нм с учетом поправки на мутность при 320 нм;  $\epsilon$  – молярный коэффициент поглощения при 278 нм;  $l$  – толщина стенки кюветы.

Величину адсорбции белка на поверхности высокодисперсного кремнезема (ВДК) определяли по формуле

$$a = (C_0 - C_p)V/m \text{ [мг/г]},$$

где  $C_0$ ,  $C_p$  – исходная и равновесная концентрации белка в растворе соответственно;  $V$  – объем раствора;  $m$  – масса сорбента.

Germany) with operating frequency of 100 MHz and maximum band pass of 50 kHz as well as Varian Mercury (USA) with operating frequency of 400 MHz. The probe impulse ( $90^{\circ}$ ) with the duration of 2 and 4 ms at frequency of 400 MHz and 100 MHz, correspondingly, was used. Temperature in gauges of spectrometers was regulated with temperature controller Bruker VT-1000 (Germany) with an accuracy of  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Intensity of signals was determined by electron integrator with an accuracy of  $\pm 10\%$ . For preventing the overcooling if water in the samples under study the intensity of signal from non-frozen water was determined when heating the samples, pre-cooled down to  $-63^{\circ}\text{C}$ .

Protein adsorption was performed in static conditions from aqueous solution at  $20^{\circ}\text{C}$ . Initial concentration of protein is 1-15 mg/ml. A ratio of adsorbent mass to the solution one is 1:200 (0.1 g adsorbent per 20 ml protein solution). To achieve adsorbent balance the system was incubated at room temperature for 2 hrs, then centrifuged for 10 min at 8,000 rot/min and equilibrium concentration of HSA was calculated spectrophotometrically on the values of molar adsorption coefficient

$$C_p = A_{278-320} / \epsilon \cdot l,$$

where  $A_{278-320}$  – solution light adsorption at 278 nm with taking into account the correction for turbidity at 320 nm;  $\epsilon$  – molar coefficient of adsorption at 278 nm;  $l$  – cuvette wall width.

Adsorption value of protein on the surface of fine-grained silica (FGS) was determined on the formula

$$a = (C_0 - C_p)V/m \text{ [mg/g]},$$

where  $C_0$ ,  $C_p$  – initial and equilibrium protein concentrations in a solution, correspondently;  $V$  – solution volume;  $m$  – adsorbent mass.

Viscosity of solutions of protein and the one in presence of sucrose were measured with VPZh-3 capillary glass viscosimeter (Soyuznauchpribor, Leningrad) at  $25^{\circ}\text{C}$  and were calculated with the formula

$$\eta = k \cdot t \cdot d \text{ [Pa}\cdot\text{s]},$$

where  $k$  – viscosimeter constant, mSt/s;  $t$  – time of solution flow, s;  $d$  – solution density, g/cm<sup>3</sup>.

## Results and discussion

Typical  $^1\text{H}$  NMR spectra of non-frozen water, presented in Fig. 1 permit to define the following regularities: under high resolution the spectrum of non-frozen water represents broadened non-symmetric

Вязкость растворов белка и белка в присутствии сахарозы измеряли с помощью вискозиметра капиллярного стеклянного ВПЖ-3 (Союзнауц-прибор, Россия) при температуре 25°C и рассчитывали по формуле:

$$\eta = k \cdot t \cdot d \text{ [Па}\cdot\text{с]},$$

где  $k$  – константа вискозиметра, мСт/с;  $t$  – время вытекания раствора, с;  $d$  – плотность раствора, г/см<sup>3</sup>.

### Результаты и обсуждение

Типичные спектры <sup>1</sup>H ЯМР незамерзающей воды (рис. 1) позволяют выделить следующие закономерности: при высоком разрешении спектр незамерзающей воды представляет собой уширенный несимметричный сигнал, ширина которого увеличивается с понижением температуры ввиду уменьшения подвижности молекул воды [4]. Химический сдвиг  $\delta$  сигнала такой воды находится в диапазоне 4-5 м.д. В растворах белка при низких температурах симметричность сигнала увеличивается и он смещается в область слабых магнитных полей (рис. 1, а). В присутствии сахаров вместо одного несимметричного регистрируется два сигнала воды, для которых разница химических сдвигов не превышает 1 м.д. (рис. 1, б, в).

Изменение формы спектра <sup>1</sup>H ЯМР незамерзающей воды свидетельствует о наличии нескольких ее форм, между которыми при разных условиях проведения эксперимента происходит быстрый или медленный (в шкале времени ЯМР) молекулярный обмен. В соответствии с современными представлениями [14] структурная дифференциация воды в белковой глобуле может происходить из-за существования в ней гидрофобных полостей, заполненных водой. Структура воды определяется средним числом водородных связей, в которых участвует каждая молекула воды [15]. Поэтому снижение способности к образованию водородных связей сопровождается смещением сигнала воды в область сильных магнитных полей и наоборот. Установлено, что сигнал с меньшим значением химического сдвига соответствует менее упорядоченной сетке водородных связей межфазной воды.

Общей закономерностью системы альбумин-сахара является наличие концентрационного интервала, при котором добавление в раствор сахаров сопровождается уменьшением интенсивности сигнала незамерзающей воды. Эта зависимость характерна для растворов САЧ, содержащих сахарозу (рис. 1, в). При –23°C введение в раствор 1% сахарозы приводит к уменьшению интенсивности сигнала воды более чем в пять раз. Получен-

signal, the width of which increases with temperature decrease due to lessening motility of water molecules [4]. Chemical shift  $\delta$  of signal for such a water is within the range of 4-5 ppm. In the solutions of protein under low temperatures the signal symmetry increases and it is shifted toward the area of weak magnetic fields (Fig. 1, a). In presence of sugars instead of one non-symmetric signal of water there are recorded two signals, for those the difference of chemical shifts does not exceed 1 ppm (Fig. 1, b, c).

The changed shape of <sup>1</sup>H NMR spectrum of non-frozen water testifies to the presence of its several forms, between which under different conditions of experiment there is either rapid or slow (according to NMR time scale) molecular exchange. According to contemporary notions [14] structural differentiation of water in protein globule may occur due to the existence of water-filled hydrophobic cavities in it. Water structure is determined by an average number of hydrogen bonds, where each water molecule participates [15]. Therefore reduced ability to the formation of hydrogen bonds is accompanied by shifting of water signal into the area of strong magnetic fields and *vice versa*. It has been established that the signal with lower value of chemical shift corresponds to less ordered net of hydrogen bonds of interfacial water.

General regularity of albumin-sugar system is the presence of the concentration interval, wherein the adding of sugars to a solution is accompanied with a reduction in signal intensity for non-frozen water. This dependence is characteristic for HSA solutions, containing sucrose. At –23°C introduction of 1% sucrose into the solution leads to decrease of water signal intensity more than fivefold. The obtained dependence testifies to an effective interaction of sucrose with protein molecules. The same effect is explained by the substituting of a part of the molecules of bound water in hydrate coat of protein molecules with sucrose [6]. In this research the concentration  $C_{uw}$  of non-frozen water was not determined, so the estimation of efficiency of the observed process was impossible.

Detailed description of layer-by-layer freezing-out method of liquid phase has been shown in [8, 14, 15]. For obtaining the characteristics of bound water layers the temperature dependences of integral intensities of signal I of non-frozen water were measured, using which the dependence of Gibbs differential energy  $\Delta G$  on concentration of non-frozen water was calculated. Since a condition of water freezing on bioobject/water interface is the parity of free energies of absorbed water and ice, decreasing of freezing temperature of absorbed water determines the reduction of free energy of water, caused by adsorptional interactions ( $\Delta G = G_0 - G$ , where  $G_0$  – ice free energy at 0°C) [15]. Since ice free energy with a reduction of

ная зависимость свидетельствует об эффективном взаимодействии сахаров с белковыми молекулами. Подобный эффект объясняется замещением части молекул связанной воды в гидратной оболочке молекул белка молекулами сахарозы [6]. В этой работе не определялась концентрация незамерзающей воды  $C_{uw}$ , поэтому невозможно судить об эффективности наблюдаемого процесса.

Подробное описание метода послойного вымораживания жидкой фазы приведено в [8, 14, 15]. Для получения характеристик слоев связанной воды измеряли температурные зависимости интегральных интенсивностей сигнала  $I$  незамерзающей воды, по которым рассчитывалась зависимость дифференциальной энергии Гиббса  $\Delta G$  от концентрации незамерзающей воды. Поскольку условием замораживания воды на межфазной границе биообъект/вода является равенство свободных энергий адсорбированной воды и льда, понижение температуры замораживания адсорбированной воды определяет уменьшение свободной энергии воды, вызванное адсорбционными взаимодействиями ( $\Delta G = G_0 - G$ , где  $G_0$  – свободная энергия льда при  $0^\circ\text{C}$ ) [15]. Поскольку свободная энергия льда с понижением температуры изменяется по приблизительно линейному закону [5], то величину  $\Delta G$  можно рассчитать по формуле

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

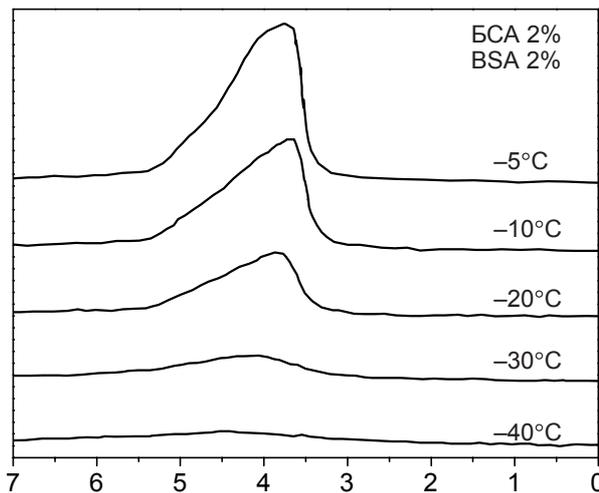
Межфазную энергию биологического объекта  $\gamma_s$  в водной среде определяли по площади под кривой  $\Delta G(C_{uw})$ :

$$\gamma_s = K_1 \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G d(C_{H_2O}),$$

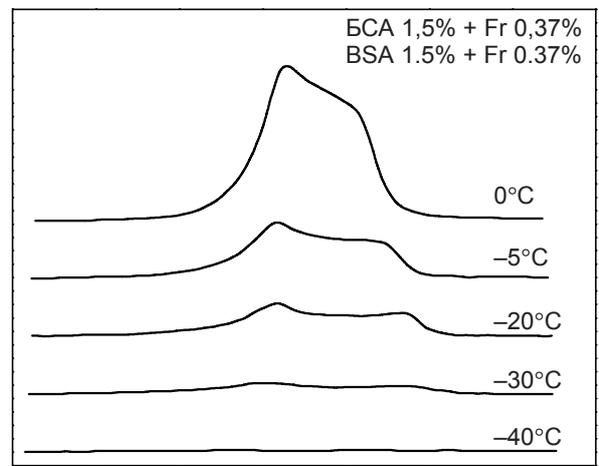
где  $C_{uw}^{\max}$  – толщина слоя незамерзающей воды при  $T \rightarrow 0^\circ\text{C}$ .

Если в растворе, кроме молекул белка, содержатся низкомолекулярные соединения, то на величину  $C_{uw}$  может влиять вода сконцентрированного в микрополостях ледяной матрицы бинарного раствора. Если такой раствор образуется, то на зависимостях  $I(C_{uw})$  присутствует участок линейного роста интенсивности сигнала с увеличением  $C_{uw}$  [6]. Однако при небольшой концентрации, все вещество органической добавки в процессе замораживания может быть сконцентрировано в гидратных оболочках белковых молекул [8].

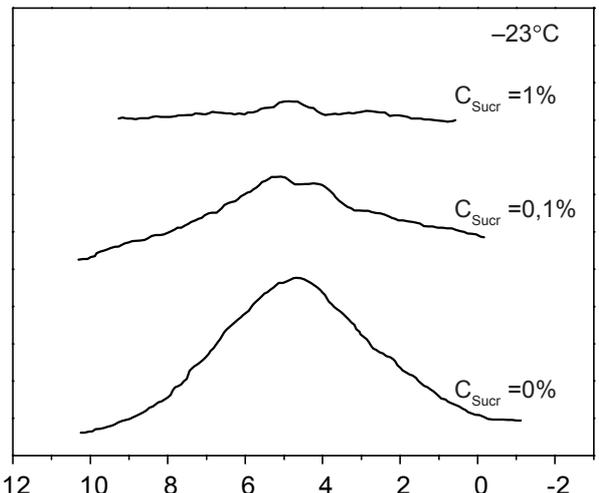
На рис. 2 приведены зависимости  $C_{uw}$  от концентрации сахаров при разных температурах. Величину  $C_{uw}$  определяли сравнением интенсивностей сигнала  $^1\text{H}$  ЯМР воды до и после замораживания. Во всех изученных системах при добавлении небольших количеств сахаров регистрируется



а Химический сдвиг  $\delta$ , м.д. Chemical shift  $\delta$ , ppm а



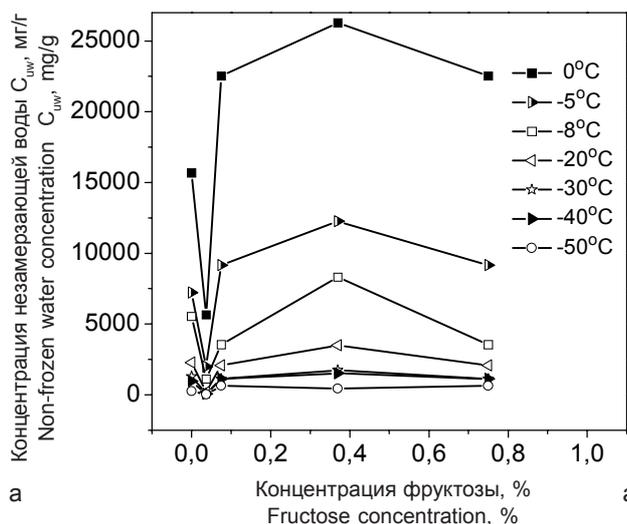
б Химический сдвиг  $\delta$ , м.д. Chemical shift  $\delta$ , ppm б



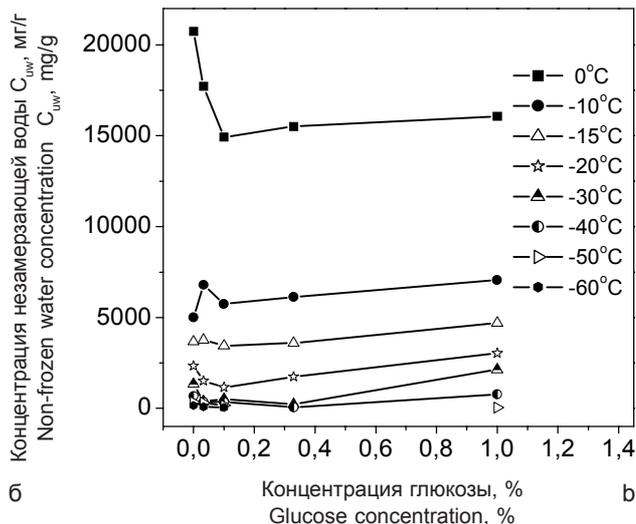
в Химический сдвиг  $\delta$ , м.д. Chemical shift  $\delta$ , ppm в

**Рис. 1.** Зависимость формы спектров  $^1\text{H}$  ЯМР незамерзающей воды в растворах БСА-вода (а) и БСА-вода-фруктоза (б) от температуры (при 400 МГц) и от  $C_{\text{Sucr}}$  в 1%-м растворе САЧ (в) при  $-23^\circ\text{C}$  (при 100 МГц).

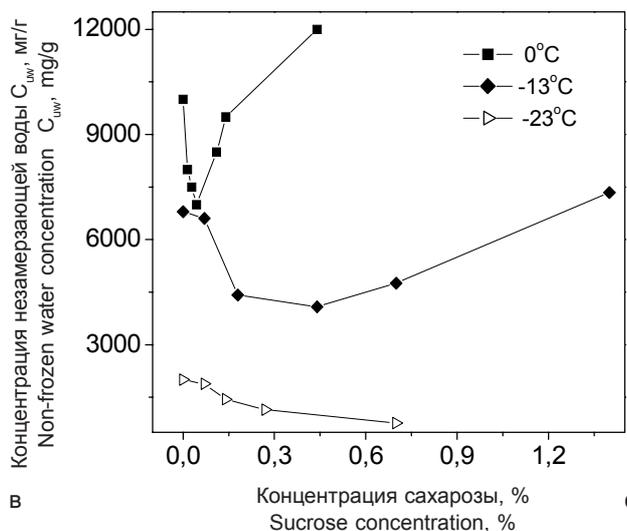
**Fig. 1.** Dependence of  $^1\text{H}$  NMR spectra shapes of non-frozen water in BSA-water solutions (a) and BSA-water-fructose (b) on temperature (at 400 MHz) and on  $C_{\text{sucr}}$  in 1% HSA solution (c) at  $-23^\circ\text{C}$  (at 100 MHz).



а



б



в

а

б

с

**Рис.2.** Зависимость концентрации незамерзшей воды  $C_{uw}$  от концентрации сахаров при разных температурах: а – фруктоза; б – глюкоза; в – сахароза.

**Fig. 2.** Dependence of non-frozen water concentration  $C_{uw}$  on concentration of sugars at different temperatures: а – fructose; б – glucose; в – sucrose.

участок уменьшения концентрации незамерзающей воды. Для фруктозы этот участок явно выражен на узком диапазоне изменения  $C_{Fr}$ , а участок прямо пропорционального роста зависимости  $C_{uw}(C_{Fr})$  не наблюдается (рис. 2, а). Для глюкозы при  $C_{Gl} < 0,38\%$  установлено значительное уменьшение  $C_{uw}$  лишь при температурах близких к  $0^\circ\text{C}$  (рис. 2, б). Участок пропорционального роста зависимости  $C_{uw}(C_{Gl})$  находится в широком диапазоне концентраций и температур. Наибольшие изменения концентрации незамерзающей воды наблюдаются при добавлении сахарозы (рис. 2, в). В этом случае эффект тем больше, чем ниже температура. Так, при  $-23^\circ\text{C}$  и  $C_{Sucr} > 1\%$  сигнал незамерзающей воды не регистрируется в спектрах ЯМР. Установлено, что добавление небольшого количества сахаров при определенных температурах может приводить к уменьшению  $C_{uw}$  в несколько раз.

На рис. 3 приведены зависимости межфазной энергии от концентрации белка в бинарном растворе БСА-вода и растворах, содержащих добавки фруктозы и глюкозы. Межфазная энергия

temperature varies according to approximately linear law [5], then the value  $\Delta G$  may be calculated on the formula:

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

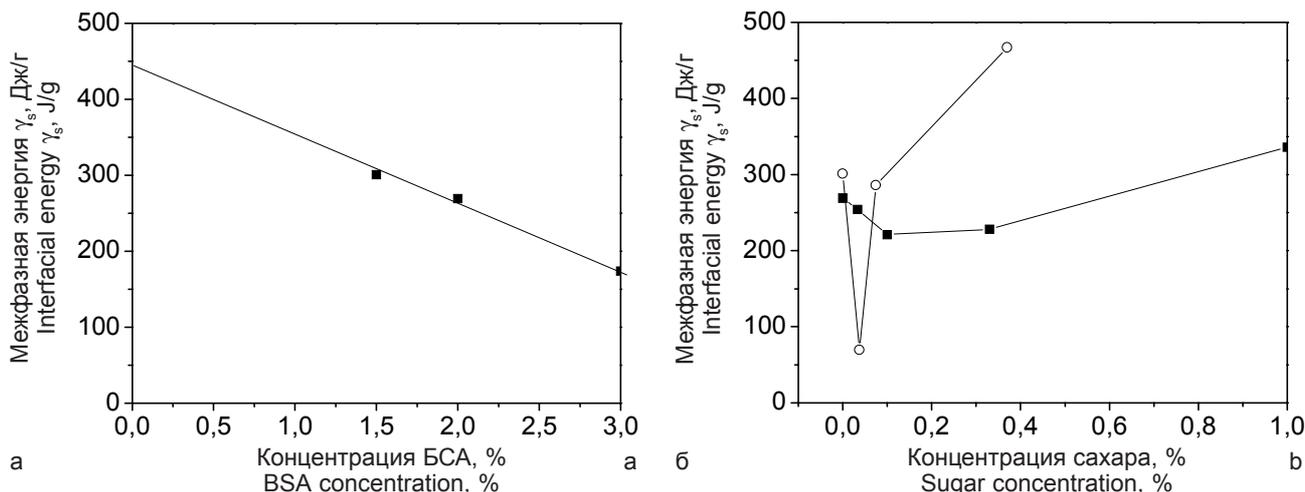
Interfacial energy of biological object  $\gamma_s$  in aqueous medium was found on the area under the curve  $\Delta G(C_{uw})$ :

$$\gamma_s = K_1 \int_0^{C_{uw}^{max}} \Delta G d(C_{H_2O}),$$

where  $C_{uw}^{max}$  is non-frozen water layer width at  $T \rightarrow 0^\circ\text{C}$

If in the solution, except protein molecules, low-molecular compounds appear, then the  $C_{uw}$  value may be affected by water of binary solution concentrated in microcavities, containing as the inclusions into ice matrix. If this solution is formed then the site of linear growth of signal intensity is present on dependences  $I(C_{uw})$  with a rise in  $C_{uw}$  [6]. However at a low concentration all the substance of organic additive during freezing may be concentrated in hydrate coats of protein molecules [8].

Fig. 2. shows the  $C_{uw}$  dependences on sucrose concentration recorded at different temperatures.  $C_{uw}$  value was found by comparison of the intensities of  $^1\text{H}$  NMR signal of water prior to and after freezing. In all the studied systems when adding small amounts of sugars the site of reduced concentration of non-frozen water is observed. For fructose this site is vividly manifested within narrow range of changes of  $C_{Fr}$ , and the site of directly-proportional growth for  $C_{uw}(C_{Fr})$  dependence is not observed (Fig.2, а). At  $C_{Gl} < 0.38\%$  significant decrease of  $C_{uw}$  has been found only



**Рис.3.** Зависимость межфазной энергии от концентрации БСА в бинарном растворе (а) и концентрации сахаров в тройных системах БСА-сахар-вода (б): 1 – 1,5% БСА + фруктоза; 2 – 2% БСА + глюкоза.

**Fig. 3.** Dependence of interfacial energy on BSA concentration in binary solution (a) and on sugar concentration in BSA-sugar-water complex (b): 1 – 1.5% BSA + fructose; 2 – 2% BSA + glucose.

является интегральной величиной, позволяющей определить суммарное понижение свободной энергии гетерофазной системы (в нашем случае присутствуют фазы белка и воды), обусловленное наличием границы раздела фаз. В многокомпонентных растворах, содержащих вещества, которые не связаны с границей раздела, величина  $\gamma_s$  будет содержать также вклад от изменения свободной энергии, обусловленного разницей свободной энергии воды и бинарного раствора вещества.

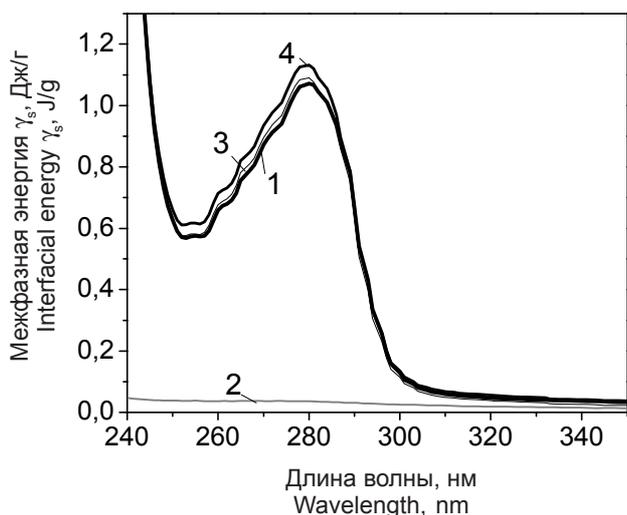
Из рис. 3, а следует, что межфазная энергия увеличивается обратно пропорционально концентрации белка. Аналогичные зависимости характерны и для других белковых систем [8, 15]. Изменение  $\gamma_s$  обусловлено самоассоциацией белковых молекул: молекулы белка сильно гидратированы, поэтому для их контакта в водной среде из межмолекулярного зазора должно быть удалено определенное количество молекул связанной воды. Затраты энергии на взаимодействие белок-белок должны компенсироваться переходом части воды из связанного состояния в свободное. Тогда разница величины  $\gamma_s$  при разбавлении или концентрировании раствора белка определяет свободную энергию ассоциативных процессов. Экстраполируя зависимость  $\gamma_s(C_{BSA})$  к нулевой концентрации белка, получим межфазную энергию неассоциированных молекул альбумина.

Зависимость  $\gamma_s(C_{Gl(Fr)})$  в целом отражает основные тенденции зависимостей  $C_{uw}(C_{Gl(Fr)})$ . Расчеты показывают, что в 2%-м растворе альбумина на каждую молекулу белка приходится  $8,8 \times 10^5$  молекул воды, из которых  $10^4$  молекул являются связанными (см. рис. 2). В концентрационной области, отвечающей быстрому изменению величины  $\gamma_s$ , каждая молекула добавки приводит к уменьшению количества связанной воды на тыся-

at the temperatures close to 0°C (Fig. 2, b). Site of proportional growth for  $C_{uw}(C_{Fr})$  dependence is within wide range of concentrations and temperatures. The highest changes of concentration for non-frozen water are observed when adding sucrose (Fig. 2, c). In this case the higher the effect, the lower the temperature. So, at -23°C and  $C_{Sucr} > 1\%$  the signal of non-frozen water is not registered in NMR-spectra. It has been found that adding of small amount of sugars under certain temperatures may result in several-times' reduction of  $C_{uw}$ .

Fig. 3 demonstrates the dependences of interfacial energy on protein concentration in binary solution of BSA-water and the solutions containing fructose and glucose additives. The interfacial energy is integral value enabling to determine total decreasing of free energy of heterofacial system (in our case the phases of protein and water are present) due to interface boundary. In multicomponent solutions, containing components, not bound with interface, the  $\gamma_s$  value will depend on change of free energy due to the difference of water free energy and binary solution of an additive.

From Fig. 3 one can see that interfacial energy increases in an inverse proportion to protein concentration. The same dependences are characteristic also for other protein systems [8, 15]. Change of  $\gamma_s$  is stipulated by self-association of protein molecules. Protein molecules are strongly dehydrated, therefore for their contact in aqueous medium from intermolecular interspace a certain number of molecules of bound water should be removed. The energy expenditures for protein-protein interaction should be compensated by the transition of a part of water from bound state into a free one. Then the difference of the value  $\gamma_s$  during dilution or concentrating of protein solution determines a free energy of associative processes. By extrapolation of  $\gamma_s$  dependence ( $C_{BSA}$ )



**Рис. 4.** Спектры поглощения раствора САЧ 1% (1), раствора сахарозы 10% (2), а также растворов их бинарных смесей (3, 4).

**Fig. 4.** Adsorption spectra of 1% HSA solution (1), 10% sucrose solution (2), as well as their binary mixtures (3,4).

чу и более молекул. Столь высокую дегидратацию нельзя объяснить простым замещением межфазной воды молекулами сахаров. Возможно, при связывании сахаров с белковыми молекулами происходит такое изменение их конформации, которое соответствует значительно меньшему количеству связанной воды. Вероятно, молекулы белка становятся более компактными или менее гидрофильными, а взаимодействие между близко расположенными белковыми фрагментами – более эффективным, причем молекулы сахаров могут его интермедиатами. Возможно, эти изменения в белковых глобулах под влиянием связанных с ними низкомолекулярных веществ необходимы для распознавания свободных и нагруженных метаболитами (или токсинами) молекул альбумина.

Как было показано на рис. 1-3, молекулы сахаров могут замещать молекулы воды в системах, содержащих такие компоненты, как сахар и белок. Этот процесс может сопровождаться образованием комплексов в растворах и изменениями вязкости данных систем. Поскольку максимальный эффект дегидратации молекул САЧ был установлен в растворах сахарозы, мы исследовали водные растворы с разным количеством сахарозы и постоянным значением концентрации белка при температуре 25°C. Величина вязкости белка в зависимости от концентрации сахарозы изменялась незначительно по сравнению с величинами вязкости раствора САЧ и раствора сахарозы, что свидетельствовало о невозможности регистрации изменений в указанных системах методом вискозиметрии.

Анализ спектров поглощения (рис. 4) растворов САЧ (кривая 1), сахарозы (кривая 2), а также

to zero concentration of the protein one obtains the interfacial energy of non-associated molecules of albumin.

Dependence of  $\gamma_s(C_{Gl(Fr)})$  in a whole reflects main tendencies of  $C_{uw}(C_{Gl(Fr)})$  dependences. Calculations show that in 2% albumin solution per each protein molecule is  $8.8 \times 10^5$  water molecules, among those  $10^4$  molecules are bound ones (see Fig. 2). In concentration range correspondent to rapid change of  $\gamma_s$  value, each additive molecule results in a decrease of bound water amount by thousand or more molecules. Such quite a high dehydration can not be explained by simple substitution of interphase water by sugar molecules. It is possible that during binding of sugars with protein molecules there is the change of their conformation, corresponding to significantly less amount of bound water. Protein molecules are getting likely more compact or less hydrophilic and the interaction between closely located protein fragments becomes more effective, moreover sugar molecules may intermediate it. Perhaps these changes in protein globules under the effect bound with them low molecular substances are those factors essential for recognizing of free and loaded with metabolites (or toxins) albumin molecules.

As the figures 1-3 show, sugar molecules may substitute the water ones in the systems containing such components as sugar and protein. This process may be accompanied with the formation of complexes in the solutions and changes of viscosity of these systems. Since the maximum effect of dehydration of HSA molecules was established in sucrose solutions, we had studied aqueous solutions with different sucrose amounts and constant concentration of protein at 25°C. Protein viscosity value depending on concentration of  $C_{sucr}$  slightly changed if compared with the values of viscosity of HSA solution and the one of sucrose, that testified to the failure of registration of changes in the mentioned systems by viscosimetry method.

Adsorption spectra of HSA solutions (curve 1), sucrose (curve 2) as well as those of their binary mixture (curves 3, 4) are presented in Fig. 4. In the solutions of sugar-water-protein the formation of complexes is observed, that is confirmed with the deviation of optical density value for the sucrose-containing solution from additivity rule:

$$A_{HSA + Sucr} \neq A_{HSA} + A_{Sucr};$$

$$A_{HSA + Sucr} - (A_{HSA} + A_{Sucr}) = \Delta A_{HSA \times Sucr},$$

where  $A_{HSA}$ ,  $A_{sucr}$ ,  $A_{HSA+Sucr}$  – optical densities of HSA solution, sucrose, HSA-sucrose complex, correspondingly;  $\Delta A_{HSA \times Sucr}$  – deviation of optical density from additivity rule, characterizing the properties of HSA-sucrose complex.

растворов их бинарной смеси (кривые 3, 4) показал, что в растворах сахар-вода-белок наблюдается образование комплексов, о чем свидетельствует отклонение значения оптической плотности раствора, содержащего сахарозу от правила аддитивности:

$$A_{\text{CAЧ} + \text{Sucr}} \neq A_{\text{CAЧ}} + A_{\text{Sucr}};$$

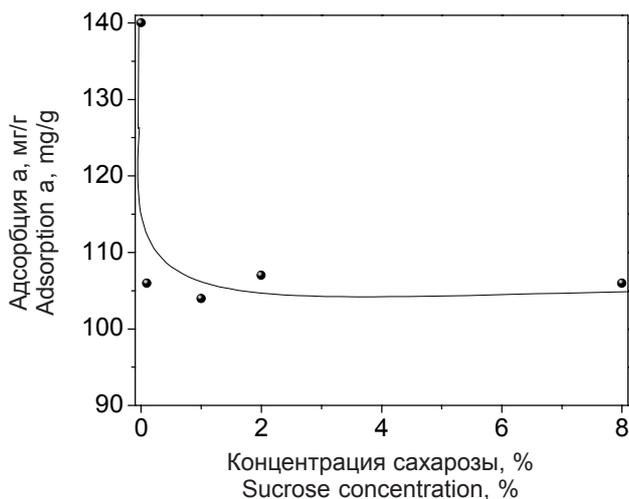
$$A_{\text{CAЧ} + \text{Sucr}} - (A_{\text{CAЧ}} + A_{\text{Sucr}}) = \Delta A_{\text{CAЧ} \times \text{Sucr}},$$

где  $A_{\text{CAЧ}}$ ,  $A_{\text{Sucr}}$ ,  $A_{\text{CAЧ} + \text{Sucr}}$  – оптическая плотность растворов САЧ, сахарозы, комплекса САЧ-сахароза соответственно;  $\Delta A_{\text{CAЧ} \times \text{Sucr}}$  – отклонение оптической плотности от правила аддитивности, которое характеризует свойства комплекса САЧ-сахароза.

Для установления влияния сахарозы на адсорбцию белка мы изучили их адсорбцию из водных растворов и проанализировали электронные спектры отражения образцов после адсорбции.

На рис. 5 приведена зависимость величины адсорбции САЧ (1%) из раствора, содержащего разное количество сахарозы.

При адсорбции белка на поверхности ВДК из бинарных растворов, содержащих САЧ и сахарозу, наблюдается уменьшение величины адсорбции белка уже при  $C_{\text{Sucr}} = 0,1\%$ . Дальнейшее повышение концентрации сахарозы практически не влияет на величину адсорбции белка. Дополнительным аргументом уменьшения адсорбции САЧ в присутствии сахарозы являются спектры отражения (рис. 6, кривая 1). Присутствие сахарозы уменьшает величину адсорбции белка, причем величина оптической плотности белка при 278 нм ( $A_{278}$ ) практически не зависит от концентрации сахарозы,



**Рис. 5.** Зависимость величины адсорбции САЧ (1%) на поверхности ВДК от концентрации сахарозы в растворе.  
**Fig. 5.** Dependence of adsorption value of HSA (1%) on sucrose concentration in solution on FGS surface.

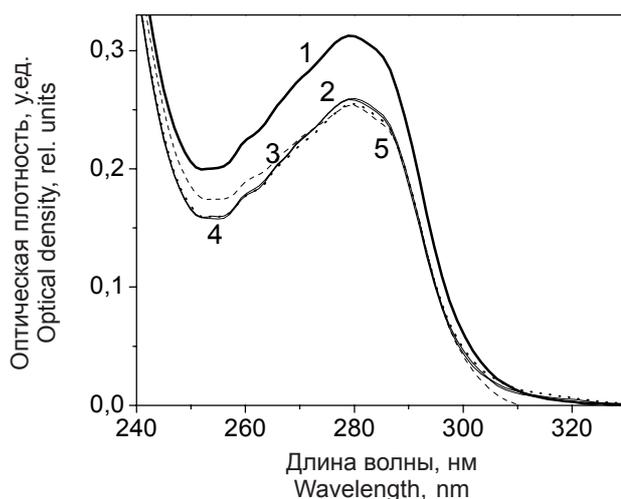
For examining the effect of sucrose on protein adsorption we have studied their adsorption from aqueous solutions and analyzed electron reflection spectra of the samples after adsorption.

Fig. 5 shows the dependence of HSA (1%) adsorption value from the solution, containing different amounts of sucrose.

During protein adsorption on the surface of FGS from binary solutions containing HSA and sucrose, there is observed a decreased value of protein adsorption even at  $C_{\text{sucr}} = 0.1\%$ . Further increase of sucrose concentration does not practically affect the protein adsorption value. Additional arguments of reduced HSA adsorption in sucrose presence are reflection spectra (Fig. 6, curve 1). The presence of sucrose diminishes the protein adsorption value, moreover the value of protein optical density at 278 nm does not practically depend on sucrose concentration, that is confirmed by the data on adsorption from aqueous solutions (Fig. 6, curves 2-5).

Thus, the complex of HSA and sucrose leads to the reduction of protein sorbing ability.

BSA adsorption isotherms on FGS surface with no sugars (curve 1) and with them (curves 2-4) are presented in Fig. 7. The measurements were performed in the area of protein concentrations, under which the saturation of dependence  $a = f(C_p)$  (area of monolayer covering) was observed. As the data mentioned show the maximum adsorption  $a_{\text{max}}$  is found for the system BSA/FGS. The value  $a_{\text{max}}$  reduces during introduction of glucose and fructose into the solution by 5 and 10%, correspondingly. Minimal value of adsorption (20% less than with no sugars) is recorded for sucrose-containing solutions. According to the data of Fig. 1-3 the obtained effect may be stipulated by the change



**Рис. 6.** Электронные спектры отражения образцов адсорбированного САЧ из раствора без (1) и в присутствии (2-5) сахарозы.

**Fig. 6.** Electron reflection spectra of the adsorbed from the solution HSA with no (1) and in presence of sucrose (2-5).

что подтверждают данные по адсорбции из водных растворов (рис. 6, кривые 2-5).

Таким образом, комплексообразование САЧ с сахарозой приводит к уменьшению сорбируемости белка.

Для получения изотерм адсорбции БСА на поверхности ВДК (без сахаров (рис. 7, кривая 1)) и в присутствии сахаров (рис. 7, кривые 2-4)) измерения проводили в области концентрации белка, при которой наблюдается насыщение зависимости  $a = f(C_p)$  (область монослойного покрытия). Как видно из приведенных данных, максимальная адсорбция  $a_{max}$  наблюдается для системы БСА-ВДК. Значение  $a_{max}$  уменьшается при введении в раствор глюкозы и фруктозы на 5 и 10% соответственно. Минимальная величина адсорбции (на 20% меньше, чем без сахаров) регистрируется для растворов, содержащих сахарозу. В соответствии с данными рис. 1-3 полученный эффект может быть обусловлен изменением конформационной лабильности белковых молекул при замещении сахарами молекул связанной воды. Вероятно, при адсорбции частично дегидратированной молекулы белка может осуществляться более полный контакт полипептидных цепей с поверхностью кремне-зема, что приводит к увеличению "посадочной площадки" белковых молекул и, как следствие, снижение величины  $a_{max}$ .

## Выводы

Частичная дегидратация белковых молекул в присутствии сахаров, особенно при низких температурах, может быть одним из основных факторов улучшения криопротекторных свойств сред. Относительно небольшие молекулы сахаров способны проникать через клеточные мембраны, они могут облегчать дегидратацию внутриклеточных элементов белковой природы, вследствие чего уменьшается вероятность формирования внутриклеточного льда. Кроме того, сахара не оказывают на клетки патологического воздействия и могут легко утилизироваться при клеточном метаболизме.

## Литература

1. Кениг С. Динамика взаимодействия в системе вода-белок. Результаты, полученные из измерений ядерной магнитной релаксации // Вода в полимерах / Под ред. С.М. Роуланда. – М.: Мир, 1984. – С. 159-182.
2. Ландау М.А. Молекулярная природа отдельных физиологических процессов. – М.: Наука, 1985. – 260 с.
3. Ленинджер А. Биохимия. – М.: Мир, 1976. – 957 с.
4. Манк В.В., Лебовка Н.И. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в гетерогенных системах. – Киев: Наук. думка, 1988. – 202 с.
5. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В.П. Глушкова. – М.: Наука, 1978. – 140 с.

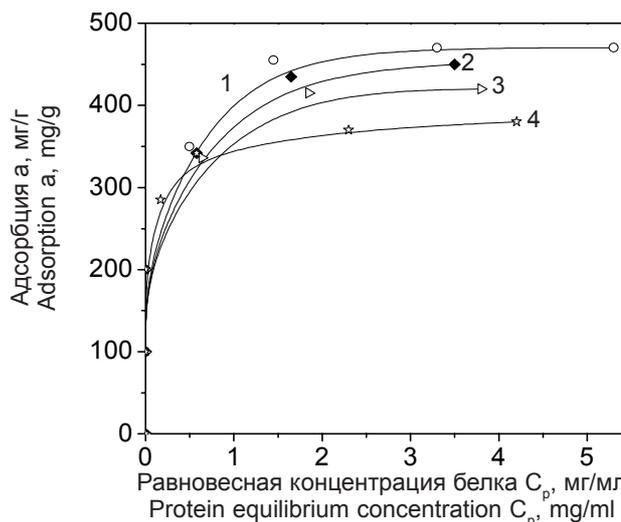


Рис. 7. Изотермы адсорбции БСА на поверхности ВДК без сахаров (1) и в присутствии глюкозы (2), фруктозы (3) и сахарозы (4).

Fig. 7. Isotherms of BSA adsorption on FGS surface with no (1) and in presence of glucose (2), fructose (3) and sucrose (4).

in conformation lability of protein molecules during substitution of bound water molecules with sugars. During adsorption of a partially dehydrated water molecule more complete contact of polypeptide chains with the surface of silica may be accomplished, that results in an increase of "landing place" of protein molecules and as a consequence to the reduction of  $a_{max}$  value.

## Conclusions

Partial dehydration of protein molecules in presence of sugars, especially under low temperatures may be one of main factors of improving cryoprotective properties of the media. Relatively small molecules are capable of penetrating via cell membranes, therefore they are able to facilitate dehydration of intracellular elements of protein origin and thereby the probability of intracellular ice formation is reduced. In addition, sugars do not render pathological effect on cells and may be easily utilized at cell metabolism.

## References

1. Koenig S. Dynamics of water-protein interaction. Results from measurements of nuclear magnetic relaxation dispersion // Water in polymers / Ed. by S. Rowland. – Moscow: Mir, 1984. – P. 159-182.
2. Landau M.A. Molecular origin of certain physiological processes. – Moscow: Nauka, 1985. – 260 p.
3. Lehninger A. Biochemistry. – Moscow: Mir, 1976. – 957 p.
4. Mank V.V., Lebovka N.I. Spectroscopy of nuclear magnetic resonance in heterogenic systems. – Kiev: Naukova dumka, 1988. – 202 p.
5. Thermodynamic properties of individual substances / Ed. by V.P. Glushkova. – Moscow: Nauka, 1978. – 140 p.

6. Туров В.В., Бакай Э.А. Туров А.В. и др. Изучение взаимодействия сахарозы с молекулами сывороточного альбумина методом ЯМР спектроскопии замороженных водных растворов // *Биофизика*. –1990.– Т. 35, №5.– С. 824-829.
7. Чегер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. – Бухарест: Изд-во Акад. наук СРР, 1975.– 184 с.
8. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M. et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // *Adv. Colloid Interface Sci.*– 2005.– Vol.118, N1-3.– P. 125-172.
9. *Handbook of in vitro fertilization. Cryopreservation of oocytes and embryos* / Ed. by J.M. Shaw, A. Oranratnachai, A.O. Trounson, D. Gardner.– Boca Raton: CRC press, 1999.– P. 1-400.
10. Karlsson J.O.M., Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues // *Biomaterials.*– 1996.– Vol. 17, N3.– P. 243-256.
11. *Reproductive tissue banking: Scientific principles* / Ed. by A.M. Karrow, J.K. Crister.– San-Diego: Academic Press, 1997.– 472 p.
12. Ruffing N.A., Steponkus P.L., Pitt. R.E., Parks J.A. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages // *Cryobiology*. – 1993. – Vol. 30, N6.– P. 562-580.
13. Shaw J.M., Oranratnachai A., Trounson A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue // *Theriogenology.*– 2000.– Vol. 53, N1.– P. 59-72.
14. Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M. et al. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface // *J. Colloid Interface Sci.*– 2005.– Vol. 283, N2.– P. 329-343.
15. Turov V.V., Leboda R. Application of <sup>1</sup>H 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.– Vol. 79, N2-3.– P. 173-211.
6. Turov V.V., Bakay E.A., Turov A.V. et al. Investigation of sucrose interaction with molecules of serum albumin with NMR-spectroscopy method of frozen aqueous solutions // *Biofizika.*– 1990.– Vol. 35, N5.– P. 824-829.
7. Cheger S.I. Transport function of serum albumin. – Bucharest, 1975.– 184 p.
8. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M. et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // *Adv. Colloid Interface Sci.*– 2005.– Vol.118, N1-3.– P. 125-172.
9. *Handbook of in vitro fertilization. Cryopreservation of oocytes and embryos* / Ed. by J.M. Shaw, A. Oranratnachai, A.O. Trounson, D. Gardner.– Boca Raton: CRC press, 1999.– P. 1-400.
10. Karlsson J.O.M., Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues // *Biomaterials.*– 1996.– Vol. 17, N3.– P. 243-256.
11. *Reproductive tissue banking: Scientific principles* / Ed. by A.M. Karrow, J.K. Crister.– San-Diego: Academic Press, 1997.– 472 p.
12. Ruffing N.A., Steponkus P.L., Pitt. R.E., Parks J.A. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages // *Cryobiology*. – 1993. – Vol. 30, N6.– P. 562-580.
13. Shaw J.M., Oranratnachai A., Trounson A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue // *Theriogenology.*– 2000.– Vol. 53, N1.– P. 59-72.
14. Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M. et al. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface // *J. Colloid Interface Sci.*– 2005.– Vol. 283, N2.– P. 329-343.
15. Turov V.V., Leboda R. Application of <sup>1</sup>H 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.– Vol. 79, N2-3.– P. 173-211.

*Поступила 31.05.2007*

*Accepted in 31.05.2007*