

КЛАСТЕРИЗАЦИЯ ВОДЫ, СВЯЗАННОЙ В ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ГАМЕТАХ БЫКА, СОДЕРЖАЩИХ ДОБАВКИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

В.В. Туров¹, Н.П. Галаган¹, В.М. Гунько¹, С.И. Ковтун²,
С.В. Керусь¹, Н.Ю. Клименко¹, А.В. Туров³

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, 03164 Киев-164

²Институт разведения и генетики животных УААН

ул. Погребняка 1, с. Чубинское, 08321 Бориспольский район, Киевской области

³Национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская 60, Киев.

Установлена кластеризация водно-органических систем в лиофилизированных репродуктивных клетках. Различные формы воды (слабоассоциированной и входящей в состав кластеров разного размера и состава) наблюдаются в ¹H ЯМР спектрах в виде отдельных сигналов, что может быть обусловлено их локализацией в пространственно разделенных компартментах, сформированных гидрофильными и гидрофобными структурными элементами клеток. Рост концентрации внутриклеточной воды сопровождается увеличением количества сильносвязанной воды, что свидетельствует об изменениях топологии внутриклеточного пространства.

Введение

Репродуктивные клетки в течение нескольких дней могут оставаться в жизнеспособном состоянии, что позволяет широко использовать в животноводческой практике метод искусственного оплодотворения. При необходимости длительного хранения репродуктивного материала применяют различные способы криоконсервирования или лиофилизации [1 – 5]. Обычно криоконсервирование осуществляют с использованием специальных буферных растворов и сред, которые не только предотвращают повреждение клеточных мембран растущими кристаллами льда, но и обеспечивают жизнедеятельность клеток после их размораживания [2, 5]. В обоих случаях происходит глубокая дегидратация клеток и изменение химического состава внутриклеточной жидкости вследствие проникновения в клетки молекул низкомолекулярных органических и неорганических веществ из внешней среды. После дегидратации, внутреннее пространство клеток представляет собой совокупность достаточно плотно упакованных структурных элементов, промежутки между которыми заполнены остаточной сильносвязанной водой, строение которой определяется гидрофобно-гидрофильными свойствами стенок полостей (компарментов) и влиянием концентрированных в этой воде различных соединений. В клетках существуют компартменты с разными гидрофобно-гидрофильными свойствами стенок, что обуславливает наличие разных типов связанной воды.

Одним из методов, которые позволяют определять структуру и термодинамические характеристики связанной воды, является метод ¹H ЯМР спектроскопии с вымораживанием жидкой фазы [6 – 10]. Спектральным параметром, характеризующим структуру воды, является химический сдвиг протонов воды (δ_H), а ее энергетические характеристики связаны с температурной зависимостью интенсивности ¹H ЯМР сигнала [7, 8]. Поскольку молекула воды может участвовать в формировании четырех водородных связей, химический сдвиг протонов связан с ее координационным числом (n). Так, химический сдвиг неассоциированной воды составляет 1 – 1,5 м.д. [11], а тетракоордини-

рованной воды во льду – 7 м.д. [12]. Для жидкой воды $\delta_H = 5$ м.д., что дает $n \approx 3$. Время магнитной релаксации ядерных спинов относительно велико (на несколько порядков больше времени межчастичных соударений). Поэтому регистрация нескольких сигналов связанной воды свидетельствует о наличии в компартментах кластеров воды разного строения. Выполненные ранее исследования строения внутриклеточной воды в частично дегидратированных дрожжевых клетках [10] и клетках костного мозга [13] показали, что при концентрации остаточной воды менее 25 %, она находится в слабоассоциированном состоянии, в котором молекулы воды (как протонодоноры) формируют в среднем менее одной Н-связи на молекулу. В дегидратированных клетках костного мозга связанная вода является сильноассоциированной и ее структура близка к структуре жидкой воды. Вероятно, именно определенное структурирование внутриклеточной воды определяет способность клеток к дегидратации и переходу в состояние анабиоза.

В настоящей работе было изучено состояние воды, связанной в дегидратированных репродуктивных клетках быка, и влияние на структуру этой воды полярного (диметилсульфоксид) и слабополярного (хлороформ) растворителей с целью усовершенствования способов длительного хранения репродуктивных материалов.

Результаты и их обсуждение

В качестве клеточного материала использовали нативные гаметы быка (13,5 мл), из которого клеточную массу выделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осадок клеток (объемом 3,5 мл) четырехкратно промывали 2,9 % раствором цитрата натрия, контролируя наличие белка в супернатанте спектрометрически (по полосе поглощения при $\lambda = 280$ нм). Клеточную массу с небольшим остаточным содержанием цитрата натрия замораживали на стенках колбы и подвергали лиофильной сушке. В результате получали сухую клеточную массу с насыпной плотностью $0,12$ г/см³. Остаточное содержание воды, определяемое по интенсивности сигнала в спектрах ¹H ЯМР, составляло менее 2 % масс. Поскольку при регидратации клеток и введении органических веществ часто происходит комкование или коагуляция клеточной массы (что изменяет условия адсорбции воды и органических веществ), был разработан протокол опыта, в котором спектральную информацию снимали с одного образца (62 мг сухой клеточной массы), а общий объем, занимаемый клетками в измерительной ампуле, оставался неизменным в процессе всего эксперимента. На стенку ампулы наносили 6 мг воды, ампулу закрывали и уравнивали в течение нескольких часов. После выполнения ЯМР измерений к этому образцу добавляли последовательно 62, 124 и 124 мг дейтерохлороформа и проводили соответствующие измерения. Для дополнительного введения в клетки воды использовали эффект межфазного растворения: 12 мг воды вносили в ампулу и после интенсивного встряхивания в течение 10 мин вся вода поглощалась клетками, что фиксировали по изменению интенсивности ¹H ЯМР сигнала внутриклеточной воды.

Введение в клетки ДМСО (как криоконсерванта) осуществляли через жидкую фазу дейтерохлороформа. Однако, в отличие от воды, ДМСО неограниченно растворим в хлороформе. Поэтому имело место перераспределение веществ (воды, хлороформа и ДМСО) между внутри- и внеклеточным пространством. Концентрация ДМСО в системе составляла 10, 30 и 60 % масс (по отношению к массе клеточного материала). Затем, для возможно более полного концентрирования ДМСО внутри клеток без их коагуляции, из ампулы медленно (в течение двух недель) через полиэтиленовую крышку испарялся избыточный хлороформ, до тех пор, пока он не переставал визуально регистрироваться в измерительной ампуле в виде отдельной фазы. Это давало возможность насыщать клетки одновременно хлороформом и ДМСО. После проведения ЯМР измерений к

этому образцу добавляли 5 г/г ДМСО-d₆ и после уравнивания в течение 2 ч проводили измерения.

Спектры ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400. Температуру регулировали с точностью ± 1 К, используя термоприставку Bruker VT-1000. Интенсивности сигналов определяли с точностью ± 5 %. Для предотвращения переохлаждения суспензий спектры ¹Н ЯМР незамерзающей воды записывали при нагревании образцов, предварительно охлажденных до 210 К. Способ определения характеристик межфазных слоев воды с помощью ¹Н ЯМР спектроскопии подробно изложен ранее [6 – 10]. Он основан на понижении температуры замерзания связанной воды [13]. По понижению температуры замерзания связанной воды рассчитывали дифференциальную энергию Гиббса (ΔG). Площадь, ограниченная графиком зависимости $\Delta G(C_{uw})$, определяет величину межфазной энергии (γ_s), которая равна модулю суммарного понижению свободной энергии воды, обусловленному наличием границы раздела фаз. На зависимостях $\Delta G(C_{uw})$ могут быть выделены участки, относящиеся к слабо- ($\Delta G > -0,5$ кДж/моль) и сильносвязанной ($\Delta G < -0,5$ кДж/моль) воде [8]. Количественные (C_{uw}^s и C_{uw}^w для сильно- и слабо связанной воды, соответственно) и энергетические (ΔG^s и ΔG^w) характеристики слоев связанной воды могут быть получены экстраполяцией соответствующих участков зависимостей $\Delta G(C_{uw})$. По способности молекул связанной воды образовывать водородные связи со своими соседями она подразделяется на сильно- ($\delta_H = 3...5$ м.д.) и слабоассоциированную ($\delta_H = 1...2$ м.д.). В случае, когда процесс перехода воды в слабоассоциированное состояние энергетически выгоден, эта вода является сильносвязанной и замерзает при очень низкой температуре. Если же формирование слоя слабоассоциированной воды определяется в основном энтропийным фактором, то она может быть слабосвязанной. Распределение по размерам заполненных водой внутриклеточных полостей рассчитывали с использованием уравнения Гиббса-Томпсона [14].

На рис. 1 приведены записанные при разных температурах спектры ¹Н ЯМР воды в репродуктивных клетках, содержащих 10 (рис. 1, а-в) и 30 (рис. 1, г) % масс воды, исходных (рис. 1, а) и с добавками хлороформа (рис. 1, б-г). В исходном образце регистрируется один широкий сигнал воды, химический сдвиг которого ($\delta_H = 5$ м.д.) совпадает с химическим сдвигом жидкой воды (сильноассоциированная вода). С понижением температуры интенсивность сигнала уменьшается вследствие частичного замерзания внутриклеточной воды. Сигнал сильноассоциированной воды перестает регистрироваться при $T < 230$ К. При добавлении хлороформа (рис. 1, б, в), кроме основного сигнала, появляется сигнал слабоассоциированной воды с химическим сдвигом $\delta_H \approx 2$ м.д. Его интенсивность не превышает 12 % от интенсивности сигнала сильноассоциированной воды и слабо изменяется с уменьшением температуры вплоть до 210 К. Поэтому вся слабоассоциированная вода может быть отнесена к сильносвязанной [8].

С ростом концентрации внутриклеточной воды ширина сигналов уменьшается, что обусловлено ростом подвижности молекул воды [16] и становятся различимы два сигнала слабоассоциированной воды при $\delta_H = 1,3$ и 2 м.д. Кроме того, в спектрах наблюдаются сигналы СНCl₃ ($\delta_H = 7,16$ м.д.) и ТМС ($\delta_H = 0$ м.д.), используемого как стандарт при измерении химического сдвига. Следовательно, хлороформ легко проникает в дегидратированные репродуктивные клетки и влияет на формирование кластеров слабоассоциированной воды.

При введении в систему ДМСО (рис. 2), кроме сигналов сильно- и слабоассоциированной воды, появляется сигнал при $\delta_H = 3,5$ м.д., который может быть отнесен к ассоциатам (CD₃)₂SO...НОН. Интенсивность этого сигнала увеличивается с ростом концентрации ДМСО. Так как ДМСО неограниченно растворим в хлороформе, степень

его проникновение в клетки из среды хлороформа определяется соотношением энергий сродства клетки-ДМСО (хлороформ) и хлороформ-ДМСО. Присутствие в слабополярной среде хлороформа полярных молекул ДМСО повышает растворимость в хлороформе воды, входящей в состав комплексов $(CD_3)_2SO \dots HOH$, и происходит частичный перенос воды из клеток в объем фазы хлороформа, что и обуславливает появление сигнала при $\delta_H = 3,5$ м.д. (рис. 2, а-в).

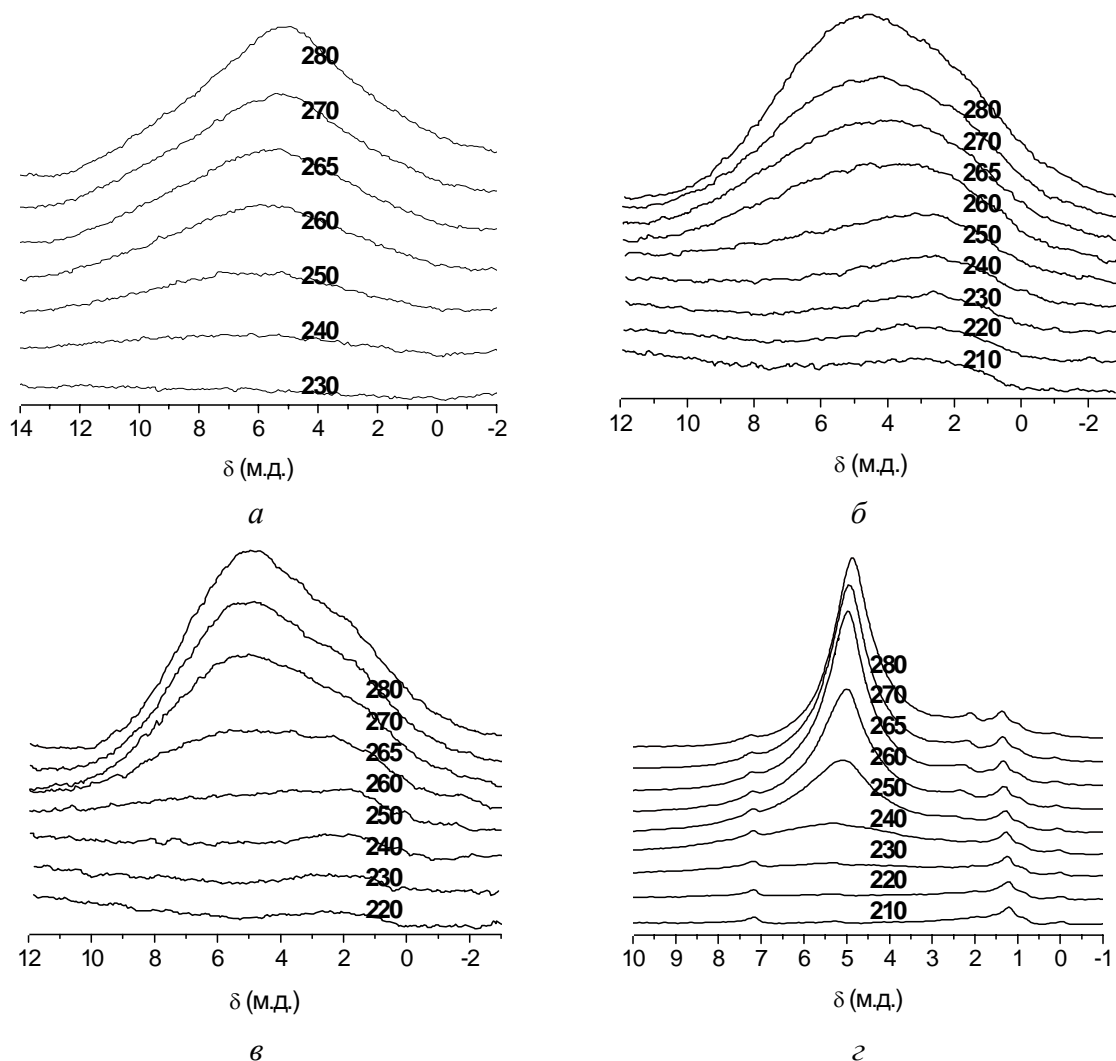


Рис. 1. Записанные при разных температурах спектры 1H ЯМР воды в гаметах быка, содержащих 10 (а-в) и 30 % масс воды (г) и разное количество дейтеро-хлороформа: а – 0, б – 1, в – 3 и г – 5 г/г. Температура указана в Кельвинах.

При исчезновении объемной фазы хлороформа (в результате его медленного испарения (рис. 2, з) как хлороформ, так и ДМСО концентрируются во внутриклеточном пространстве, что приводит к изменению спектральных характеристик внутриклеточной воды: наблюдается перераспределение интенсивностей сигналов всех типов воды. Одновременно понижается температура замерзания сильноассоциированной воды. Это свидетельствует об изменении строения кластеров, ответственных за сигнал сильноассоциированной воды. Такие изменения могут происходить вследствие включения в кластеры молекул ДМСО. Поскольку химический сдвиг сильноассоциированной воды с понижением температуры несколько возрастает, следует предположить, что молекулы ДМСО располагаются по периферии кластера воды (граничат с гидрофобными стенками компарментов), увеличивая число n . Учитывая большую интенсивность сигнала комп-

лексов $(CD_3)_2SO...HOH$, можно считать, что количество хлороформа во внутриклеточном пространстве превосходит количество сильноассоциированной воды. Интенсивность сигнала слабоассоциированной воды после испарения хлороформа возрастает примерно вдвое. Вероятно, эта вода локализована в наиболее узких компартментах или на границе раздела фаз хлороформ-сильноассоциированная вода [17].

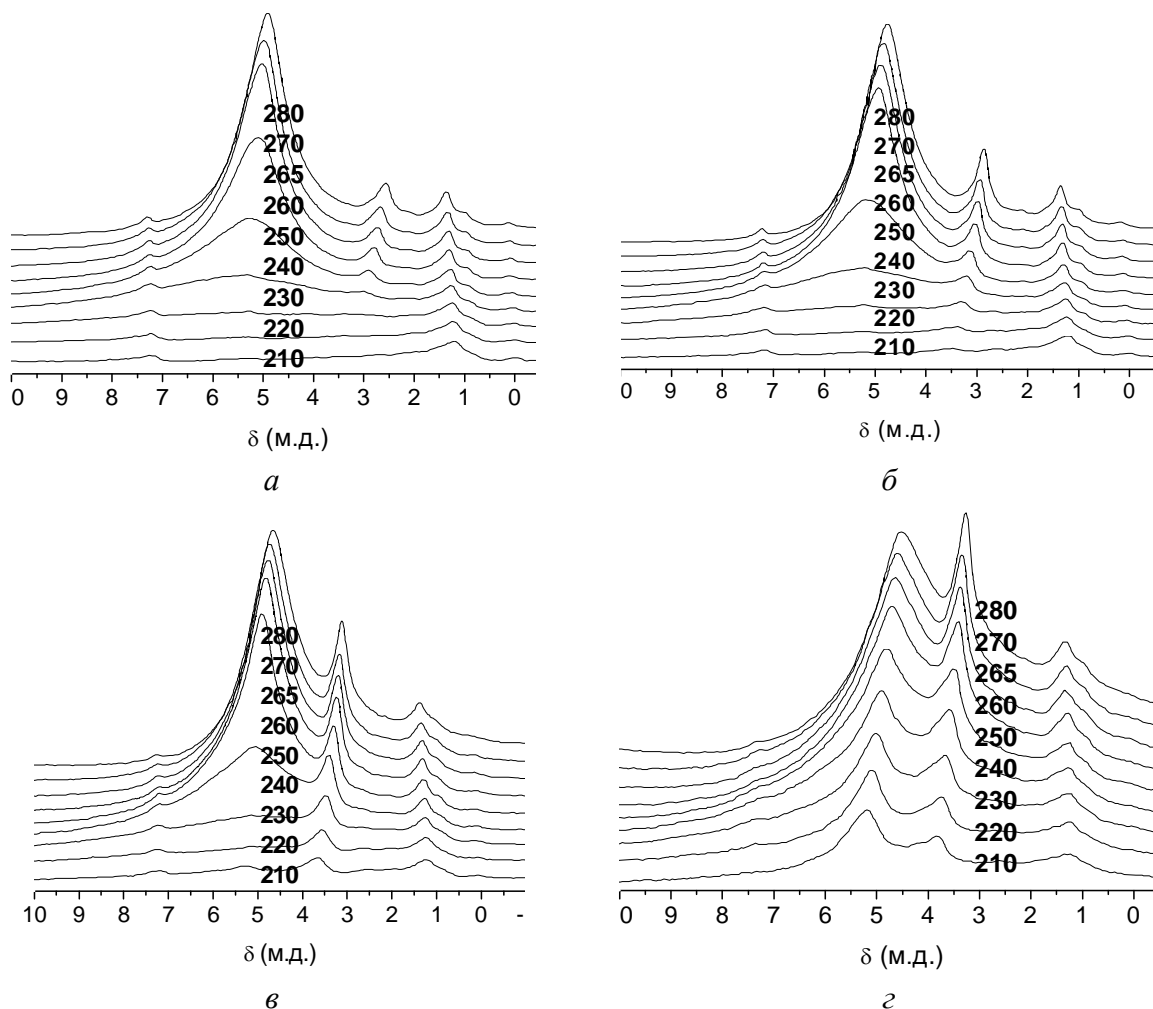


Рис. 2. Записанные при различных температурах спектры 1H ЯМР воды в системе репродуктивные клетки-вода-хлороформ с добавками $(CD_3)_2SO$: *a* – 10, *b* – 30, *v* – 60 % масс ДМСО; и *z* – 60 % масс ДМСО после медленного испарения хлороформа. Температура указана в Кельвинах.

Характеристики слоев связанной воды для всех изученных систем, рассчитанные в соответствии с методикой, описанной ранее [8 – 10], суммированы в табл. 1. Рост концентрации внутриклеточной воды в присутствии хлороформа сопровождается некоторым понижением температуры замерзания внутриклеточной воды (рис. 1). Это может быть связано со значительной перестройкой внутриклеточного пространства вследствие роста числа компартментов, заполненных сильноассоциированной водой или кластерами вода-хлороформ.

Вся вода, входящая в состав ассоциатов $(CD_3)_2SO...HOH$, также является сильно-связанной (за исключением образца с частично испарившимся хлороформом). Слабоассоциированная вода во всех изученных системах является сильносвязанной. Ее количество и способность к замерзанию сложным образом зависят от концентраций компонентов, что отражает способность клеток к изменению топологии внутреннего

пространства в зависимости от параметров внешней среды и состава внутриклеточной жидкости.

Таблица 1. Характеристики слоев внутриклеточной воды в частично дегидратированных репродуктивных клетках

Тип воды	$C_{\text{орг}}$, г/г		$C_{\text{H}_2\text{O}}$, г/г	C_{uw}^s мг/г	C_{uw}^w мг/г	ΔG^{max} кДж/моль	γ^s Дж/г
	CDCl_3	DMCO					
Сильноассоциированная вода	0	0	0,1	55	45	-1,6	3,2
	1	0	0,1	40	60	-1,2	1,9
	3	0	0,1	15	85	-1,2	1,8
	5	0	0,3	280	20	-2	17
	5	0,1	0,3	300	0	-2,3	17,4
	5	0,3	0,3	300	0	-2,3	18,3
	5	0,6	0,3	300	0	-2,6	20,1
	$\approx 0,6$	0,6	0,3	300	0	-3,5	22,7
Ассоциаты вода-DMCO	5	0,1	0,3	18	7	-1,3	1
	5	0,3	0,3	23	14	-2,6	2,1
	5	0,6	0,3	30	0	-2,6	2,5
	$\approx 0,6$	0,6	0,3	38	22	-3	4

Как следует из данных (табл. 1), с ростом количества вводимого в систему хлороформа доля сильносвязанной воды в кластерах сильноассоциированной воды уменьшается, что проявляется в уменьшении величины межфазной энергии. Подобное явление наблюдали ранее для ряда наноструктурированных систем как минерального, так и органического происхождения [18]. При увеличении концентрации внутриклеточной воды от 0,01 до 0,03 г/г, величина γ_s возрастает более чем в пять раз. Следовательно, в результате поглощения клетками дополнительных порций воды, их внутренняя структура изменяется таким образом, что проявляются дополнительные центры связывания воды. Более того, часть воды, которую идентифицировали как слабосвязанную, становится сильносвязанной. Появление в системе DMCO слабо отражается на величине межфазной энергии, хотя прослеживается общая тенденция к ее увеличению. Вероятно, это обусловлено тем, что кластеры сильноассоциированной воды растворяют некоторое количество DMCO, который может распределяться изотропно либо образовывать водородосвязанные комплексы с молекулами воды, расположенными на внешней границе кластера, ограничивая его взаимодействие с гидрофобными клеточными структурами.

При избытке DMCO спектры воды в системе репродуктивные клетки/вода/хлороформ/DMCO сильно усложняются (рис. 3): наблюдаются четыре-пять сигналов. Можно было бы ожидать, что при избытке DMCO значительная часть воды будет перемещаться из клеток в объем жидкого DMCO. При избытке последнего, такая вода должна была бы наблюдаться в виде сигнала при $\delta_H = 3,5$ м.д. Вероятно, такой процесс термодинамически невыгоден и он реализуется только при повышении температуры ($T \rightarrow 280$ К). Как видно из рис. 3, химический сдвиг сигнала 4 приближается к указанному значению. Остальные сигналы следует отнести к внутриклеточной воде. Сигналы 1-3 отвечают сильноассоциированной воде с различной средней величиной координационного числа молекул, а сигнал 5 – к слабоассоциированной воде. С понижением температуры происходит перераспределение интенсивностей между сигналами 1 – 2 и 3 – 4. Однако вследствие их частичного перекрытия провести подробный анализ этого процесса затруднительно.

Регистрация нескольких сигналов внутриклеточной воды свидетельствует о существовании, по крайней мере, четырех типов компартментов с различными поверхностными характеристиками стенок, которые стабилизируют формирование в них кластеров вода/ДМСО/хлороформ с разной стехиометрией.

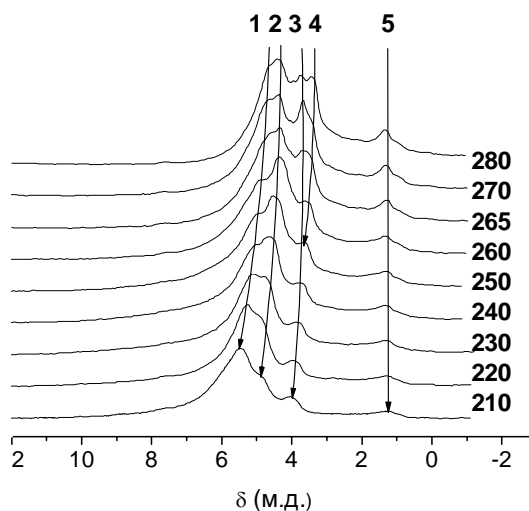


Рис. 3. Записанные при различных температурах спектры ^1H ЯМР воды в лиофилизированных репродуктивных клетках быка, содержащих 30 % масс воды и CDCl_3 , суспендированные в ДМСО- d_6 (5 г/г). Температура указана в Кельвинах.

Заключение

На основании полученных результатов можно заключить, что для выбранного типа репродуктивных клеток глубокая дегидратация клеточного материала не является обязательным условием перехода всей внутриклеточной воды в сильносвязанное состояние. Напротив, доля сильносвязанной воды в клетках, содержащих 30 % масс остаточной воды выше, чем для клеток, которые содержат только 10 % масс воды. Вероятно, это вызвано тем, что основное количество сильносвязанной воды может находиться только в компартментах с определенной геометрией и свойствами поверхности, которые изменяются при повышении дегидратации. Именно в таких полостях вода образует с органическими молекулами кластерные структуры разной стехиометрии. В их формировании могут участвовать как полярные, так и неполярные органические молекулы, что определяет изменение вкладов сильно- и слабоассоциированной воды. Низкотемпературный метод ^1H ЯМР спектроскопии позволил зарегистрировать несколько структурных типов связанной воды, строение которых отражает как строение внутриклеточных полостей, так стабилизированных водно-органические (ДМСО, хлороформ) структур различного состава.

Литература

1. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*. – 2003. – V. 46. – P. 205 – 229.
2. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization / Y. Han, G.B. Quan, X.Z. Liu, E.P. Ma, A. Liu, W. Jin, P. Cao // *Cryobiology*. – 2005. – V. 51. – P. 152 – 164.
3. Karlson J.O.M., Toner M. Long-term storage by cryopreservation: critical issues // *Biomaterials*. – 1996. – V. 17. – P. 243 – 256.
4. Yoon Y., Pope J., Wolfe J. Freezing stresses and hydration of isolated cell walls // *Cryobiology*. – 2003. – V. 46. – P. 271 – 276.
5. Feofilova E.P. Deceleration of vital activity as a universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors: A review // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2003. – V. 39. – P. 5 – 24.
6. Gun'ko V. M., Turov V. V. Structure of hydrogen bonds and ^1H NMR spectra of water at the interface of oxides // *Langmuir*. – 1999. – V. 15. – P. 6405 – 6415.

7. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic Interfaces / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko et. al, R. Lebeda, E.V. Goncharuk, A.A. Novza, A.V. Turov, A.A. Chuiko // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2005 – V. 118. – P. 125 – 172.
8. Turov V.V., Lebeda R. Application of ^1H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1999. – V. 79. – P. 173 – 211.
9. Weakly and strongly associated nonfreezable water bound in bones / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.I. Zarko et al. // *Colloids and Surfaces B.* – 2006.– V. 48. – P. 167 – 175.
10. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, et. al // *J. Coll. Interface Sci.* – 2005. – V. 283, № 2. – P. 329 – 343.
11. Pople J.A., Schneider W.G., Bernstein H.J., High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance, McGraw-Hill Book Company, New York, 1959.
12. Kinney, D.R., Chung I-S., Maciel G.E. Water and the silica surface as studied by variable temperature high resolution ^1H NMR. // *J. Am. Chem Soc.* – 1993. – V. 115. – P. 6786 – 6794.
13. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В.П. Глушкова. – Москва: Наука, 1978.
14. Atkins B.D., Davis B.H. Experimental Data for a network effect in nitrogen desorption // *Langmuir.* – 1987. – V. 3. – P. 722 – 725.
15. Emsley J.W., Feeney J., Sutcliffe L.H. High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy // Oxford: Pergamon Press. – 1965.
16. Behaviour of pure water and water mixture with benzene or chloroform adsorbed onto ordered mesoporous silicas / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, A.V. Turov, V.I. Zarko, et. al // *Central European Journal of Chemistry.* – 2007. – V. 5, № 2. – P. 420 – 454.
17. Процессы самоорганизации водно-органических систем в наноразмерном пространстве твердых тел и биологических объектов / В.В. Туров, В.М. Гунько, П.П. Горбик и др. // В кн. Физико-химия наноматериалов и супрамолекулярных структур / Ред. Шпак А.П., Горбик П.П. – Киев: Наук. думка. – 2007. – С. 91 – 157.

CLUSTERIZATION OF WATER BOUND IN FROZEN-DRIED BOVINE GAMETES CONTAINING ORGANIC ADDITIVES

**V.V. Turov¹, N.P. Galagan¹, V.M. Gun'ko¹, S.I. Kovtun²,
S.V. Kerus¹, N.Y. Klymenko¹, A.V. Turov³**

¹*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv-164*

²*Institute of Animal Genetic of AAS of Ukraine
Pogrebniaka Str., Chubynske, 08321 Boryspil area, Kyiv region*

³*Taras Shevchenko University, Volodymyrska Str., 60, 01017 Kyiv*

Clustering has been found of water-organic systems in frozen-dried bovine reproductive cells (BRCs). Various forms of water (weakly associated one and that forming clusters of different size and composition) are observed in the ^1H NMR spectra as separated signals which can be caused by their localization in spatially separated compartments formed by hydrophilic and hydrophobic structural elements of BRCs. An increase in concentration of intracellular water leads to an increase in the quantity of strongly bound water that suggest about changes in the topology of intracellular space.