

УДК 57.043:611.018.5.013.8

Э.О. НАРДИД, Е.И. НАУМЕНКО, С.Л. РОЗАНОВА, О.А. НАРДИД\*

## Влияние режимов замораживания на агрегацию белков сыворотки кордовой крови человека

UDC 57.043:611.018.5.013.8

E.O. NARDID, E.I. NAUMENKO, S.L. ROZANOVA, O.A. NARDID\*

## Effect of Freezing Regimens on Protein Aggregation of Human Cord Blood Serum

Исследовано влияние различных режимов замораживания на белковый спектр сыворотки кордовой крови. Установлено, что для замораживания сыворотки кордовой крови предпочтительно использовать скорость не менее 100°C/мин, температуру хранения –80°C и ниже. Скорости замораживания и температура хранения, реализуемые при помещении образцов в морозильные камеры бытовых холодильников, не позволяют предотвратить агрегацию белков.

**Ключевые слова:** кордовая кровь, сыворотка, агрегация компонентов крови, режимы замораживания, гель-хроматография.

Досліджено вплив різних режимів заморожування на білковий спектр сироватки кордової крові. Встановлено, що для заморожування сироватки кордової крові слід використовувати швидкість не менш 100°C/хв, температуру зберігання –80°C та нижче. Швидкість заморожування і температура зберігання, які реалізуються при розміщенні зразків у холодильній камері побутового холодильника, не дозволяють запобігти низькотемпературній агрегації білків.

**Ключові слова:** кордова кров, сироватка, агрегація компонентів крові, режими заморожування, гель-хроматографія.

The effect of different freezing regimens on protein spectrum of cord blood serum has been studied. It has been established that the most favorable conditions are freezing of cord blood serum with the rate not less than 100°C/min and storage temperature of –80°C and lower. Cooling rates and storage temperature realized when placing the samples into cooling chambers do not enable the prevention of low temperature aggregation of proteins.

**Key-words:** cord blood, serum, aggregation of blood components, freezing regimens, gel chromatography.

В настоящее время сыворотка кордовой крови (СКК) и препараты, изготовленные на ее основе, применяются в клинической практике для лечения ряда патологических состояний, что обусловлено их общестимулирующим действием, высокой гормональной насыщенностью, простотой заготовки, отсутствием риска для донора при заборе и относительно низкой иммунореактивностью, а также наличием широкого спектра биологически активных веществ. Однако срок хранения таких препаратов в функционально активном состоянии в условиях бытового холодильника (4–8°C) ограничен, поэтому для более длительного хранения применяют низкотемпературное консервирование. Для использования этого подхода необходим подбор определенных режимов замораживания и отогрева, поскольку охлаждение биологических систем сопровождается фазовым переходом растворителя в твердое состояние, что приводит к концентрированию солей, макромолекул и других компонентов раствора, дегидратации макромолекул, изменению межмолекулярных взаимодей-

Nowadays cord blood serum (CBS) and its derivative preparations have been applied in clinics for treatment of some pathological states, that is stipulated by their general stimulating effect, high content of hormones, simple procurement, absence of a risk for a donor during the procurement and relatively low immune reactivity, as well as the presence of a wide spectrum of biologically active substances. The storage term of these preparations in functionally active state in common refrigerator (4–8°C) is limited, therefore for longer storage low temperature preservation is used. To apply this approach it is necessary to select certain freezing and thawing regimens, since cooling of biological systems is accompanied with a phase transition of solvent into a solid state, that results in the concentrating of salts, macromolecules and other components of a solution, dehydration of macromolecules, change in inter-cellular interactions, which may cause a damaging effect on proteins.

The research aim is to study the effect of the rates and final temperatures of freezing on protein spectrum of cord blood serum.

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
olnard@mail.ru

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya  
str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57  
373 3084, e-mail: olnard@mail.ru

вий, которые могут оказывать повреждающее действие на белки.

Цель работы – изучение влияния скоростей и конечных температур замораживания на белковый спектр сыворотки кордовой крови.

### Материалы и методы

Кордовую кровь для получения сыворотки заготавливали во время родов. Сыворотку замораживали в полимерных ампулах объемом 0,7 мл. В экспериментах использовали следующие режимы замораживания:

медленное – со скоростью замораживания 1-2°C/мин до –20°C и до –80°C;

быстрое – со скоростью 300-400°C/мин до –196°C;

замораживание со скоростями 35 и 100°C/мин до –80°C.

Замораживание производили на программном замораживателе (ИПКИК, Украина)

Ампулы отогревали на водяной бане при 36°C до появления жидкой фазы. Белки по молекулярным массам разделяли методом гель-хроматографии на колонке 2×21 см с сефадексом G-200 (Pharmacia, Швеция). Концентрацию белка во фракциях определяли спектрофотометрическим методом [3]. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре “Pye Unicam SP 8000” (Великобритания). Для электрофоретического анализа компонентов СКК использовали аппарат для горизонтального электрофореза SE 2120 (Solar, Беларусь) с программным обеспечением и блок электропитания PE 2120. Разделение образцов проводили на пластинах с агаровым покрытием 10×8 см (Corma, Польша). Сыворотку разводили физиологическим раствором 50 мМ NaCl в соотношении 1:5 и наносили на ячейку. Электрофорез образцов СКК проводили в течение 20 мин при силе тока 40 мА и напряжении 200 В. В качестве красителя использовали бромфеноловый синий. Электрофореграммы анализировали на сканирующем денситометре ДМ 2120 (Solar, Беларусь).

Статистическая обработка результатов производилась по методу Стьюдента-Фишера.

### Результаты и обсуждение

При медленном режиме замораживания СКК наблюдается смещение максимума гель-хроматограмм белков в область больших молекулярных масс, что может свидетельствовать об агрегации биомакромолекул сыворотки (рис. 1, а). Основной вклад в максимумы гель-хроматограммы приходится на сывороточный альбумин, содержание которого в сыворотке превышает 50%, и иммуноглобулин G (10±25% от общего белка) [5], поэтому можно предположить, что в частичной агрегации участвуют, в первую очередь, эти белки. При

### Materials and methods

Cord blood for serum obtaining was procured during labor. The serum was frozen in 0.7 ml polymer ampoules. In experiments there were used the following freezing regimens:

slow – with the rate of 1-2°C/min down to –20 and –80°C;

rapid – with the rate of 300-400°C/min down to –196°C;

freezing with the rates of 35 and 100°C/min down to –80°C.

Freezing was performed with programmable freezer (IPC&C, Ukraine)

The ampoules were thawed on water bath at 36°C. The proteins were separated on molecular masses by gel chromatography with the column 2×21 cm with sephadex G-200 (Pharmacia, Sweden). Protein concentration in fractions was found with spectrographic method [3]. Absorption spectra were recorded with spectro-photometer “Pye Unicam SP 8000” (UK). For electrophoretic analysis of CBS components there was used the apparatus for horizontal electrophoresis SE 2120 (Solar, Byelorussia) with the software and electrical power unit PE 2120. Serum was diluted with physiological solution 50 mM NaCl in 1:5 ratio and layered to the well. Electrophoresis of CBS samples was performed on plates with 10×8 cm agar covering (Cormay, Poland) at 40 mA amperage and voltage of 200 V for 20 min. As a dye there was used brome phenol blue. Electrophoregrams were analyzed with scanning densitometer DN 2120 (Solar, Byelorussia).

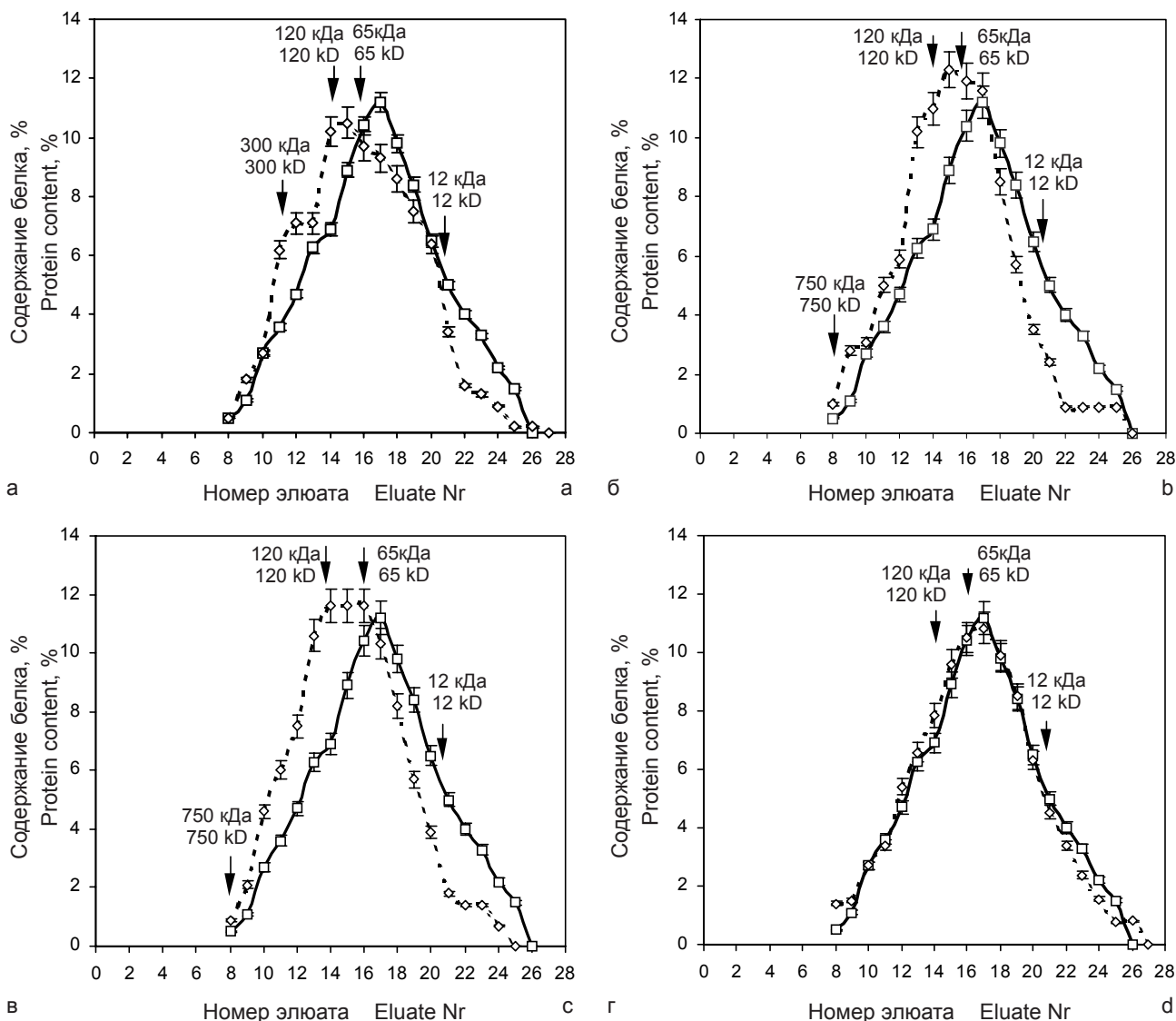
Results were statistically processed with Student-Fisher’s method.

### Results and discussion

Under slow freezing regimen of CBS there is observed a shift of the maximum of gel chromatograms for proteins towards the area of large molecular masses, testifying to the aggregation of serum biomacromolecules (Fig. 1, a). The main contribution into maxima of gel chromatograms are made by serum albumin, the content of which in serum exceeds 50%, as well as immune globulin G (10±25% of total protein), therefore one may suppose that particular these proteins primarily participate in partial aggregation. During freezing in a solution serum albumin [4] and immune globulin G [5] may form aggregates. However a reduction in protein content in low molecular fractions testifies to a partial participation in aggregation.

When using the regimen of slow freezing for CBS (with the rate of 1-2°C/min) down to –80°C there is observed even greater changes in protein distribution on molecular masses (Fig. 1, b), which are accompanied by the appearance of bigger aggregates (proteins with molecular mass of 700 kD and higher).

Chromatogram of the serum frozen down to –80°C with the rate of 35°C/min does practically differ from



**Рис. 1.** Гель-хроматограммы нативной и замороженной-оттаянной СКК: контроль – сплошная линия; после замораживания – пунктирная линия; а – замораживание до  $-20^{\circ}\text{C}$ ; б – замораживание до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ; в – замораживание до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $35^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ; г – замораживание до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

**Fig. 1.** Gel chromatograms for native and frozen-thawed CBS: control – solid line; after freezing – dashed line; а – freezing down to  $-20^{\circ}\text{C}$ ; б – freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$  with rate of  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; в – freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$  with rate of  $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; д – freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$  with rate of  $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

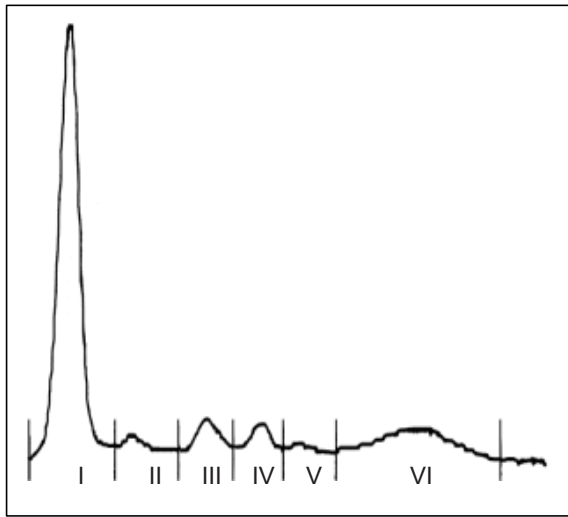
замораживании в растворе сывороточный альбумин [6] и иммуноглобулин G [7] могут формировать агрегаты. Однако снижение содержания белка в низкомолекулярных фракциях свидетельствует об их частичном участии в агрегации.

При использовании режима медленного замораживания СКК (со скоростью  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) до  $-80^{\circ}\text{C}$  наблюдаются еще большие изменения в распределении белков по молекулярным массам (рис. 1, б), которые сопровождаются появлением более крупных агрегатов (белки с молекулярной массой порядка 700 кДа и выше).

Хроматограмма сыворотки, замороженной до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $35^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , практически не отличается от хроматограммы сыворотки, замороженной со скоростью  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до указанной

the one of the serum frozen with rate of  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  down to the temperature mentioned (Fig. 1, c). Gel chromatogram after CBS freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$  approaches to native one (Fig. 1, d) and observed differences testify to the participation of low molecular proteins in aggregation. So, the aggregation is supposed to be practically absent. Main proteins of plasma (albumin and immune globulins) do not likely participate in aggregation. Gel chromatogram of the serum frozen down to  $-196^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $300-400^{\circ}\text{C}/\text{min}$  differs from the control one in less extent.

Obtained data about the freezing regimens on aggregation of CBS proteins are well coordinated with the results obtained with the method of gel electrophoresis. As a result of CBS electrophoresis there was



**Рис. 2.** Общий вид электрофореграммы нативной СКК.  
**Fig. 2.** General view of native CBS electrophoregram.

температуры (рис. 1, в). Гель-хроматограмма после замораживания СКК до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  сходна с нативной (рис. 1, г), а наблюдаемые отличия свидетельствуют об участии в агрегации низкомолекулярных белков. Основные белки плазмы (альбумин и иммуноглобулины), вероятно, практически не участвуют в агрегации. Гель-хроматограмма сыворотки, замороженной до  $-196^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $300\text{-}400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , практически не отличается от контрольной.

Полученные данные о влиянии режимов замораживания на агрегацию белков СКК хорошо согласуются с результатами, полученными методом гель-электрофореза. В результате электрофореза СКК было получено четкое разделение белков на 6 пиков, соответствующих основным белковым фракциям сыворотки (рис. 2) [4]. Анализ площадей белковых пиков показал, что после медленного замораживания сыворотки до  $-20$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  увеличивается белковая фракция VI и частично V с высокой молекулярной массой (рис. 3). Этот режим замораживания приводит к уменьшению фракции I и частично II с молекулярной массой 60-80 кДа. Замораживание СКК до  $-196^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $300\text{-}400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  не приводит к изменению вида электрофореграмм по сравнению с электрофореграммой нативной сыворотки.

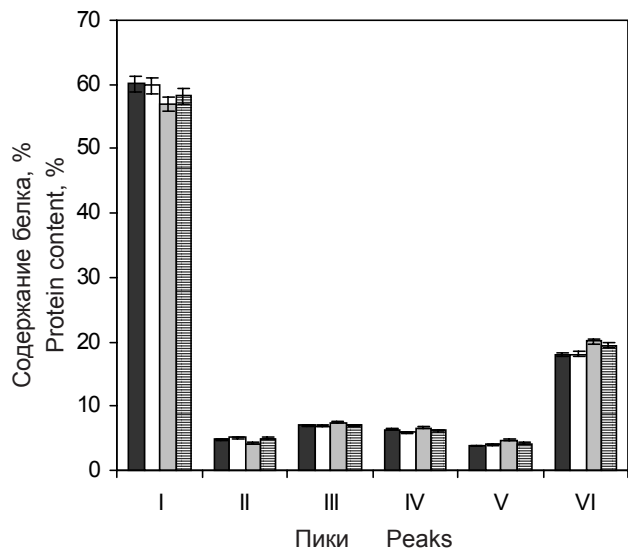
Агрегация белков в процессе замораживания-оттаивания относится к поверхностно-индуцированным процессам и происходит в результате “разворачивания” белков на поверхностях разделов “лед-вода” и “вода-воздух” [2, 6]. Показано, что при замораживании СКК с медленными скоростями охлаждения происходит “разрыхление” поверхностных полипептидных цепей белковых молекул плазмы [1]. Это может способствовать “разворачиванию” белков на поверх-

found a distinct separation of proteins into VI peaks (fractions), corresponding to main protein fractions of the serum (Fig. 2). Analysis of areas of protein peaks has shown that after slow freezing of the serum down to  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  protein fraction VI and partially fraction V with high molecular mass increase (Fig. 3). The same cooling regimen results in a decrease in fraction I and partially in fraction II with molecular mass of 60-80 kD. CBS freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $300\text{-}400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  does not lead to the change in the type of electrophoregrams if compared to the one for native serum.

Protein aggregation during freeze-thawing is referred to surface-induced processes and occurs as a result of protein “unfolding” on the surfaces of “ice-water” and “water-air” interfaces [2, 6]. It has been shown that during CBS freezing with slow cooling rates the “loosening” of polypeptide chains of plasma protein molecules surface takes place [1]. This may contribute to “unfolding” of proteins on the surfaces of phase interfaces and stimulate their aggregation. When using high cooling rates aggregation may be reduced as a result of the decrease in the time when the system is under the conditions favorable for aggregation process and diminishing diffusion into boundary sites.

### Conclusions

Slow freezing of CBS with the rate of  $1\text{-}2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  down to  $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  resulted in a significant change of fraction composition of proteins and is accompanied



**Рис. 3.** Диаграмма изменения фракций СКК при различных режимах замораживания: ■ – контроль; □ – медленное замораживание до  $-80^{\circ}\text{C}$ ; ▨ – быстрое замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$ ; ▤ – медленное замораживание до  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Fig. 3.** Diagram of the changes of CBS fractions under various freezing regimens: ■ – control; □ – slow freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$ ; ▨ – rapid freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$ ; ▤ – slow freezing down to  $-20^{\circ}\text{C}$ .

ностях раздела фаз и стимулировать их агрегацию [8]. При использовании высоких скоростей охлаждения степень агрегации может снижаться в результате сокращения времени нахождения системы в условиях, благоприятных для осуществления процесса агрегации и уменьшения диффузии в граничные области.

### Выводы

Медленное замораживание сыворотки кордовой крови со скоростью 1-2°C/мин до -20 и -80°C приводит к значительному изменению фракционного состава белков и сопровождается сдвигом в сторону больших молекулярных масс, что можно объяснить агрегацией компонентов сыворотки. Увеличение скорости замораживания до 35°C/мин не предотвращает агрегацию белков сыворотки. При увеличении скорости замораживания СКК до 100°C/мин изменения происходят только в низкомолекулярной (ниже 12 кДа) части белкового спектра.

С целью сохранения нативных свойств белков сыворотки кордовой крови можно рекомендовать режимы охлаждения со скоростью не менее 100°C/мин и температуру хранения -80°C и ниже.

### Литература

1. *Нардид Э.О., Цымбал Л.В., Нардид О.А.* Влияние режимов замораживания на динамику водно-белковой системы сыворотки кордовой крови человека // Пробл. криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С. 544-545.
2. *Cao E., Chen Y., Cui Z., Foster P.R.* Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins // J. Biotechnol. Bioenerg. – 2003. – Vol.82, N6. – P. 684-690.
3. *Harris D.A.* Spectrophotometric assays / In: Spectrophotometry and spectrofluorimetry. – Washington: IRL Press, 1987. – P. 49-90.
4. *Hardman D.A., Kane J.P.* Improved separation of high-molecular-weight proteins by preparative sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis: application to apolipoprotein B // Anal. Biochem. – 1980. – Vol. 105, N1. – P. 174-180.
5. *Hayakawa K., Masuko M., Mineta M. et al.* Serum protein determination by high-performance gel-permeation chromatography // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. – 1997. – Vol. 696, N1. – P. 19-23.
6. *Jordan G.M., Yoshioka S., Terao T.* The aggregation of bovine serum albumin in solution and in the solid state // J. Pharm. Pharmacol. – 1994. – Vol. 46, N3. – P. 182-185.
7. *Sarciaux J.M., Mansour S., Hageman M.J., Nail S.L.* Effect of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine Ig G during freeze-drying // J. Pharm.Sci. – 1999. – Vol. 88, N12. – P. 1354-1361.
8. *Tang X.C., Pikal M.J.* Measurement of the kinetics of protein unfolding in viscous systems and implications for protein stability in freeze-drying // Pharm. Res. – 2005. – Vol. 22, N7. – P. 1176-1185.
9. *Yu Z., Garcia A.S., Johnston K.P., Williams R.O.* Spray freezing into liquid nitrogen for highly stable protein nanostructured microparticles // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2004. – Vol. 58, N3. – P. 529-537.

with a shift towards large molecular masses that may be explained by aggregation of serum components. Increase in freezing rate up to 35°C/min does not prevent aggregation of serum proteins. During a rise in freezing rate of CBS up to 100°C/min the changes occur only in low molecular (under 12 kD) part of protein spectrum.

With the aim of preserving of native properties of serum proteins the regimens with the rates not less than 100°C/min and storage temperatures of 80°C and lower may be recommended.

### References

1. *Nardid E.O., Tsybmal L.V., Nardid O.A.* Effect of freezing regimens on dynamics of aqueous-protein system of human cord blood serum // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol. 15, N3. – P. 544-545.
2. *Cao E., Chen Y., Cui Z., Foster P.R.* Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins // J. Biotechnol. Bioenerg. – 2003. – Vol.82, N6. – P. 684-690.
3. *Harris D.A.* Spectrophotometric assays / In: Spectrophotometry and spectrofluorimetry. – Washington: IRL Press, 1987. – P. 49-90.
4. *Hardman D.A., Kane J.P.* Improved separation of high-molecular-weight proteins by preparative sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis: application to apolipoprotein B // Anal. Biochem. – 1980. – Vol. 105, N1. – P. 174-180.
5. *Hayakawa K., Masuko M., Mineta M. et al.* Serum protein determination by high-performance gel-permeation chromatography // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. – 1997. – Vol. 696, N1. – P. 19-23.
6. *Jordan G.M., Yoshioka S., Terao T.* The aggregation of bovine serum albumin in solution and in the solid state // J. Pharm. Pharmacol. – 1994. – Vol. 46, N3. – P. 182-185.
7. *Sarciaux J.M., Mansour S., Hageman M.J., Nail S.L.* Effect of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine Ig G during freeze-drying // J. Pharm.Sci. – 1999. – Vol. 88, N12. – P. 1354-1361.
8. *Tang X.C., Pikal M.J.* Measurement of the kinetics of protein unfolding in viscous systems and implications for protein stability in freeze-drying // Pharm. Res. – 2005. – Vol. 22, N7. – P. 1176-1185.
9. *Yu Z., Garcia A.S., Johnston K.P., Williams R.O.* Spray freezing into liquid nitrogen for highly stable protein nanostructured microparticles // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2004. – Vol. 58, N3. – P. 529-537.

*Accepted in 04.04.2006*

*Поступила 04.04.2006*