

ОСОБЕННОСТИ ЗАМЕРЗАНИЯ ВОДЫ В КРИОЗАЩИТНОЙ СРЕДЕ СО СПЕРМИЯМИ БЫКА, ИНКОРПОРИРОВАННОЙ В МАТРИЦУ ГИДРОФОБНОГО КРЕМНЕЗЕМА

В. В. Туров
Т. В. Крупская
Н. П. Галаган

Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко
НАН Украины, Киев

E-mail: v_turov@ukr.net

Получено 22.11.2013

Целью работы было исследование процесса таяния воды в лактозо-глицероло-желточной криосреде с гаметами быка, инкорпорированной в порошок гидрофобного кремнезема, на поверхности которого адсорбированы фиксированные количества неполярного углеводорода — *n*-декана. Изучали возможность структурирования твердой поверхностью межфазной воды водных полиассоциатов и растворимость в ней трифторуксусной кислоты. При этом выживаемость репродуктивных клеток после контакта с поверхностью не анализировали.

Методом низкотемпературной ^1H -ЯМР-спектроскопии изучено состояние воды в исходной криозащитной лактозо-глицероло-желточной среде и инкорпорированного в матрицу гидрофобного нанокремнезема TS-100, содержащего добавку адсорбированного на его поверхности *n*-декана. Показано, что твердая матрица индуцирует формирование на межфазной границе 6–7 молекул воды на каждую молекулу декана, не принимающих участия в образовании водородных связей, и резкое уменьшение (от 100 до 20 нм) радиуса кристаллов льда, формирующихся в клеточной суспензии при ее замораживании. Полученные результаты могут послужить основой для улучшения условий сохранности клеток при их криоконсервировании и низкотемпературном хранении путем инкорпорирования в порошкообразную композитную среду.

Ключевые слова: ^1H -ЯМР-спектроскопия, гаметы быка, сильно- и слабоассоциированная вода, кластеры воды.

Метод криоконсервирования репродуктивных клеток лежит в основе стандартных схем промышленного размножения сельскохозяйственных животных [1, 2]. В процессе замораживания клеток, находящихся внутри специальным образом подобранной среды, происходит их дегидратация, что предотвращает нарушение целостности клеточных мембран растущими кристаллами льда. За последние десятилетия разработаны эффективные технологические схемы длительного хранения клеточного материала при температуре кипения жидкого азота (77,2 К) и последующего их деконсервирования, которые обеспечивают выживаемость до 90% клеток [3, 4]. Тем не менее высокие энергетические затраты на поддержание низких температур в больших объемах криохранилищ создают предпосылки для разработки менее затратных способов хранения клеточного материала в стандартных морозильных камерах при температурах 230–240 К.

Перспективным направлением может стать инкорпорирование криосреды с репродуктивными клетками в порошкообразную матрицу гидрофобного минерального носителя. При этом поверхность твердых частиц, хотя и не адсорбирует воду, но частично разрушает упорядоченную сетку водородных связей воды и переводит ее в кластерное состояние, в котором при замерзании могут формироваться либо очень мелкие кристаллы (нанометрового размера), либо стеклообразные модификации воды и растворенных в ней веществ [5]. Методами низкотемпературной ^1H -ЯМР-спектроскопии было установлено, что на межфазной границе наноструктурированных твердых тел вода может существовать в виде кластеров ($R < 2$ нм) или доменов ($R > 2$ нм) сильно- или слабоассоциированной воды (SAW и WAW, соответственно). В сильноассоциированном состоянии структура сетки водородных связей в кластерах (доменах) близка к струк-

туре жидкой воды. Однако кластеры SAW плохо растворяют как полярные (включая минеральные кислоты), так и неполярные вещества [6, 7]. Слабоассоциированные формы воды образуются вблизи гидрофобных групп поверхности и могут существовать в виде концентрированного раствора с неполярными (слабополярными) органическими веществами.

Целью настоящей работы было исследование процесса таяния воды в лактозо-глицероло-желточной криосреде (ЛГЖ) [3], содержащей гаметы быка, инкорпорированной в порошок гидрофобного кремнезема, на поверхности которого адсорбированы фиксированные количества неполярного углеводорода — *n*-декана.

Изучали возможность структурирования твердой поверхностью межфазной воды водных полиассоциатов и растворимость в ней трифторуксусной кислоты (ТФУК). При этом выживаемость репродуктивных клеток после контакта с поверхностью не анализировали.

Материалы и методы

В качестве гидрофобного кремнезема использовали метилированный кремнезем Cab-O-Sil TS-100 (Cabot Corporation, США), спектрально чистые *n*-декан и ТФУК. Композитная система TS-100/декан формировалась путем добавления порции жидкого декана к порошку кремнезема. После этого материал подвергался механохимическому уплотнению в агатовой ступке путем растирания в течение 15 мин. В результате насыпная плотность материала увеличивалась от 40 до 250 мг/мл. Затем к навеске композита (200 мг) добавляли порцию криосреды, содержащей репродуктивные клетки быка, и перемешивали образец путем встряхивания в течение 10 мин непосредственно в 5-миллиметровой ампуле ЯМР. В качестве биоматериала использовали криоконсервированные гаметы быка в ЛГЖ-среде, которые размораживали при температуре 293 К, смешивали с композитом TS-100/декан и охлаждали в датчике ЯМР-спектрометра до 210 К.

Микрофотографирование порошков и эмульсий проводили с помощью микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 1000$ с применением иммерсии.

Спектры ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian Mercury) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали 90° -й зондирующий импульс длительностью 3 мкс и шириной полосы 20 кГц. Температу-

ра в датчике регулировалась термоприставкой Bruker VT-1000 с точностью ± 1 град. Интенсивность сигналов определяли путем измерения площади пиков с использованием процедуры разложения сигнала на его составляющие в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов была не ниже 5%, а для перекрывающихся — $\pm 10\%$. С целью предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах измерения концентрации незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до температуры 210 К.

В качестве основного параметра, определяющего структуру сетки водородных связей воды, использовали величину химического сдвига протонов (δ_H). Предполагалось, что вода, в которой каждая молекула участвует в формировании четырех водородных связей (двух за счет протонов и двух — неподделенных электронных пар атомов кислорода), имеет химический сдвиг $\delta_H = 7$ м. д. (реализуется для гексагонального льда), а слабоассоциированная вода (не участвующая в формировании водородных связей в качестве протонодонора) — $\delta_H = 1-1,5$ м. д. [5–7]. Для определения геометрических размеров кластеров адсорбированной воды использовали уравнение Гиббса–Томсона, связывающее радиус сферического или цилиндрического водного кластера или домена (R) с величиной депрессии температуры замерзания [8]:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

где $T_m(R)$ — температура плавления льда, локализованного в порах радиуса R ; $T_{m,\infty}$ — температура плавления объемного льда; ρ — плотность твердой фазы; σ_{sl} — энергия взаимодействия твердого тела (макромолекулы, лед) с жидкостью; ΔH_f — объемная энтальпия плавления. Для практического использования (1) можно применять в виде $\Delta T_m = (k/R)$, в котором константа k для многих гетерогенных систем, содержащих воду, близка к 50 град·нм [8]. Метод проведения ЯМР-измерений и способов определения радиусов кластеров межфазной воды подробно описан в [5–7].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведена микрофотография ЛГЖ-криосреды, содержащей гаметы быка, снятая при увеличении $\times 1000$. Кроме ре-

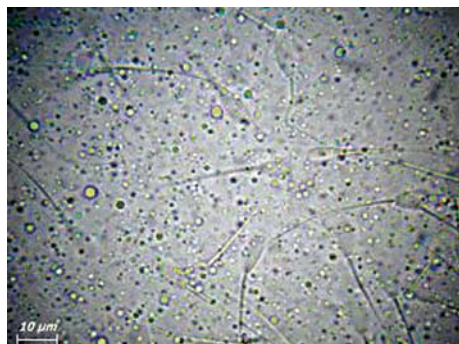


Рис. 1. Микрофотография ЛГЖ-криосреды, содержащей гамету быка, снятые с иммерсией при увеличении $\times 1000$

продуктивных клеток, в среде наблюдаются шарообразные микрокапли лецитина, входящего в состав яичного желтка, с диаметром 1–4 мкм. Клеточная суспензия остается фазовоустойчивой в течение 5–6 ч.

Снятые при разной температуре и чувствительности ЯМР-спектрометра, спектры ^1H -ЯМР исходной криосреды (а, б) и криосреды, содержащей гамету быка (в, г), показаны на рис. 2. Наиболее интенсивным сигналом в спектрах исходной криосреды (а) является сигнал сильноассоциированной воды ($\delta_{\text{H}} = 5\text{--}5,6$ м. д.). С понижением температуры интенсивность этого сигнала существенно уменьшается из-за заморозки основной массы воды, а химический сдвиг увеличивается вследствие роста степени ее ассоциированности.

При высокой чувствительности прибора (б) кроме сигнала воды в спектрах фиксируются две группы сигналов, относящихся

к растворенному в воде глицеролу ($\delta_{\text{H}} = 3,5\text{--}4$ м. д.) и коллоидным частицам лецитина [9] ($\delta_{\text{H}} = 1\text{--}2,5$ м. д.). Заморозка основной части глицерола происходит при температуре, более низкой, чем температура заморозки воды ($T < 240$ К), поэтому его концентрация в незамерзшей фазе с понижением температуры возрастает (ср. интенсивность сигнала воды и глицерола на рис. 2, б). Заморозка коллоидных частиц лецитина происходит при T около 270 К, вероятно в результате формирования молекулярных кристаллов, в которых молекулы лецитина связаны ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. Аналогичные изменения в спектрах наблюдаются и для образца ЛГЖ, содержащего репродуктивные клетки (рис. 2, в, г). Следует отметить, что химический сдвиг сигнала метиленовых групп лецитина ($\delta_{\text{H}} = 1,2$ м. д.) совпадает с химическим сдвигом слабоассоциированной воды [5–7], что не позволяет идентифицировать наличие WAW в ЛГЖ или системе ЛГЖ–репродуктивные клетки.

На рис. 3, а приведены снятые при разной температуре спектры ^1H -ЯМР композитной системы, состоящей из одной части кремнезема TS-100, трех частей декана и пяти частей воды. Декан наблюдается в спектрах в виде двух сигналов (метиленовых и метильных групп) с химическими сдвигами $\delta_{\text{H}} = 0,9$ и 1,25 м. д., соответственно. Сильноассоциированная вода отмечается при $T > 265$ К в виде одного или двух широких сигналов с химическими сдвигами $\delta_{\text{H}} = 4,5\text{--}5,5$ м. д. Кроме SAW, в спектрах фиксируется сигнал WAW с химическим сдвигом $\delta_{\text{H}} = 1,5\text{--}1,75$ м. д.

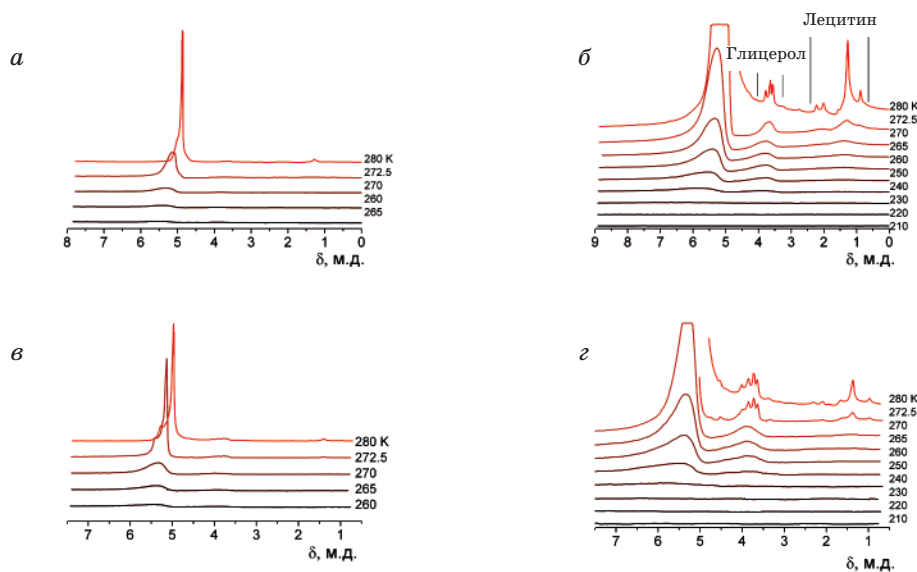


Рис. 2. Снятые при разных температурах и чувствительности ЯМР-спектрометра спектры ^1H -ЯМР: исходной ЛГЖ-криосреды (а, б) и криосреды с гаметами быка (в, г)

Сигнал WAW хорошо разрешен при $T = 280$ К. С уменьшением температуры (и замерзанием значительной части SAW) он уширяется и распадается на несколько близко расположенных сигналов. Замерзание WAW происходит синхронно с замерзанием декана при $T < 250$ К. Вероятно, молекулы адсорбированного декана и WAW формируют единую коллигативную систему, замерзание которой осуществляется путем формирования смешанных молекулярных кристаллов неассоциированной воды и декана либо молекулярных кристаллов декана, содержащих включения нанокристаллов гексагонального льда.

Из данных рис. 3, *a* следует, что поверхность гидрофобизированного кремнезема с адсорбированным на его поверхности деканом способна структурировать водную среду таким образом, что на межфазной границе формируются кластеры (домены), состоящие из адсорбированного декана и слабоассоциированной воды. Учитывая, что молекулярная масса воды на порядок меньше, чем у декана, а также соотношение интенсивностей сигналов, можно заключить, что в этих кластерах на каждую молекулу декана приходится 5–7 молекул WAW.

При замене воды на ЛГЖ-криосреду, содержащую репродуктивные клетки (рис. 3, *б*), общий вид спектров остается сходным с приведенными на рис. 3, *a*. В спектрах наблюдаются сигналы SAW ($\delta_H = 4,5$ – $5,5$ м. д.), WAW

($\delta_H = 1,5$ м. д.) и декана ($\delta_H = 0,9$ – $1,5$ м. д.). Кроме них, наблюдается сигнал при $\delta_H = 3,5$ м. д., который может быть идентифицирован как сигнал глицерола или одной из форм SAW с частично разрушенной сеткой водородных связей. Для предотвращения возможности расслоения водной и органической фаз концентрация водной фазы на рис. 3, *б* была значительно меньше, чем на рис. 3, *a*. Варьирование соотношения концентраций компонентов в композитной системе, содержащей клеточную суспензию, инкорпорированную в среду гидрофобного кремнезема с адсорбированным на его поверхности деканом, слабо влияет на спектральные параметры сигналов (рис. 3, *в*). Следовательно, поверхность гидрофобизированного кремнезема с адсорбированным деканом способна структурировать не только чистую воду, но и воду, входящую в состав сложной биологической среды, содержащей репродуктивные клетки, органические вещества и молекулы биополимеров.

С целью изучения возможности растворения сильной кислоты в разных формах межфазной воды на рис. 3, *г* приведены снятые при разных температурах спектры ^1H -ЯМР композитной системы TS-100/декан/ЛГЖ (2:1:2) с репродуктивными клетками при добавлении одной части трифторуксусной кислоты (ТФУК). Поскольку кислота содержит подвижный протон карбоксильной группы (химический сдвиг составляет $\delta_H = 11$ м. д.),

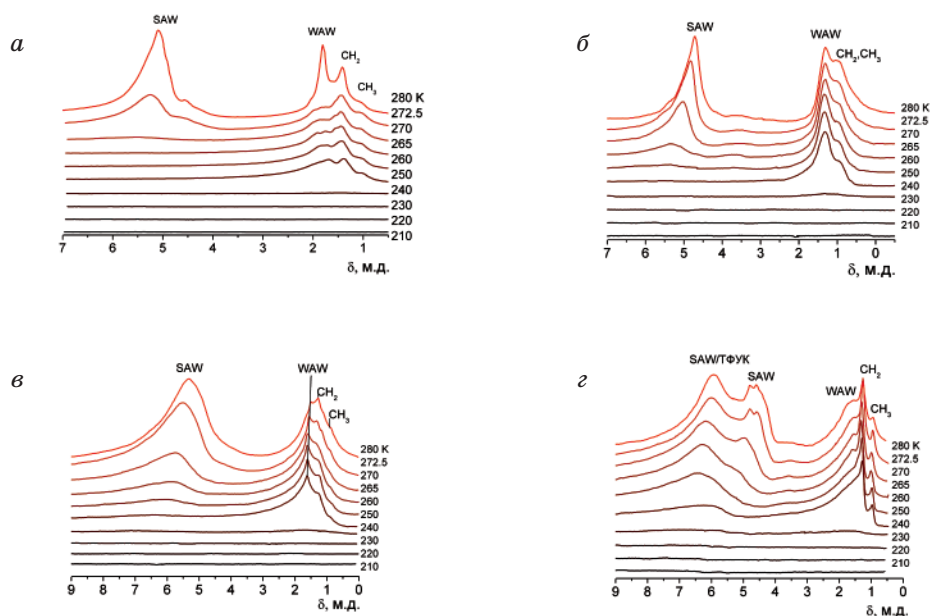


Рис. 3. Снятые при разных температурах спектры ^1H ЯМР воды и декана: в композитах 1:3:5 TS-100/декан/ H_2O (*a*); 1:3:0,8 TS-100/декан/ЛГЖ-криосреда с репродуктивными клетками (*б*); 2:1:2 TS-100/декан/ЛГЖ-криосреда с репродуктивными клетками (*в*); 2:1:2:1 TS-100/декан/ЛГЖ-криосреда с репродуктивными клетками/ТФУК (*г*)

который легко вступает в реакцию быстрого протонного обмена с молекулами воды [10], при растворении кислоты в кластерах межфазной воды следует ожидать значительного роста величины химического сдвига.

Как видно из рис. 3, *з*, при добавлении ТФУК сигнал SAW разделяется на два, с разными значениями химического сдвига, в то время как химический сдвиг сигнала WAW не изменился, а его интенсивность несколько уменьшилась. Отсюда следует, что входящая в состав криосреды и клеток сильноассоциированная вода неоднородна по своей структуре. Некоторая ее часть ($\approx 1/3$) формирует кластеры, плохо растворяющие ТФУК. Именно этот тип воды с понижением температуры замерзает первым и перестает регистрироваться в спектрах при $T < 250$ К. Слабоассоциированная вода практически не растворяет ТФУК, однако в ее присутствии часть WAW трансформируется в SAW.

На рис. 4, *а* приведены микрофотографии композитной системы TS-100/декан/ЛГЖ (2:1:2) с репродуктивными клетками, разбавленной 1:1 цитратным буфером (для получения однородной гелеподобной массы). Отсутствие на микрофотографии изображений репродуктивных клеток свидетельствует о том, что в процессе формирования композита

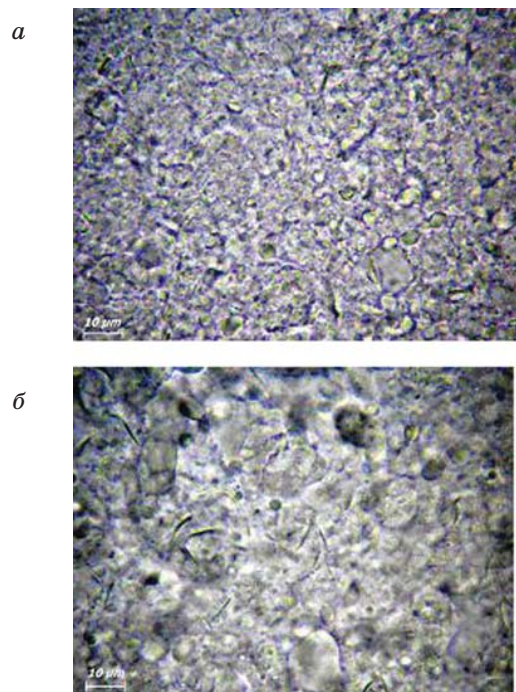


Рис. 4. Микрофотографии композитных систем: 2:1:2 TS-100/декан/ЛГЖ-криосреда с репродуктивными клетками (*а*); 2:1:2:1 TS-100/декан/ЛГЖ-криосреда с репродуктивными клетками/ТФУК (*б*)

клетки локализуются во внутренних полостях, окруженных твердыми частицами. Введение ТФУК (рис. 4, *б*) приводит к разрушению (фрагментации) клеточного материала. При этом в поле зрения попадают хвостики гамет.

Изменение интенсивности сигнала WBW для изученных систем показано на рис. 5, *а*. На зависимости $I/I_0(T)$ наблюдаются участки, обусловленные SBW и WBW. Количество SBW для разных систем находится в диапазоне 0,1–0,2 от общего количества воды. При этом минимальные значения SBW фиксируются для чистой криосреды, не содержащей клеток, максимальное — для криосреды с клетками, а промежуточные — для клеточных суспензий, инкорпорированных в гидрофобный композит.

По данным рис. 5, *а*, в соответствии с уравнением Гиббса–Томсона (формула 1), могут быть рассчитаны распределения по радиусам кластеров межфазной воды. Однако это уравнение относится к процессу замерзания чистых жидкостей. В нашем случае в водной фазе присутствует сложная смесь органических веществ и биополимеров. Для правомерности использования уравнения Гиббса–Томсона к растворам следует предположить, что в них вода также замерзает в виде гексагонального льда. Тогда начальный процесс таяния определяется размерами нанокристаллов чистого льда, а формирование раствора происходит уже после плавления его компонентов. При этом в соответствии с (1) можно определить распределение по размерам нанокристаллов льда, выпадающих из раствора. Соответствующие распределения приведены на рис. 5, *б*. Крайняя правая точка, идентифицируемая как кристаллы радиусом 100 нм ($\Delta T_m = 0,5$ град), реально относится ко всем кристаллам с радиусам $R \geq 100$ нм вплоть до объемных кристаллов льда.

Согласно данным рис. 5, *б*, в исходной ЛГЖ-среде вода замерзает в виде кристаллов с радиусом 10–100 нм. В присутствии клеток вклад от больших кристаллов уменьшается более чем в четыре раза. При инкорпорировании клеточной суспензии в гидрофобный композит большие кристаллы исчезают. Минимальный размер нанокристаллов в замерзшей клеточной суспензии наблюдается для композита TS-100/декан/ЛГЖ (2:1:2) с репродуктивными клетками.

Установлено, что композитные системы на основе метилированного кремнезема с адсорбированным на его поверхности *n*-деканом оказывают на воду структуриру-

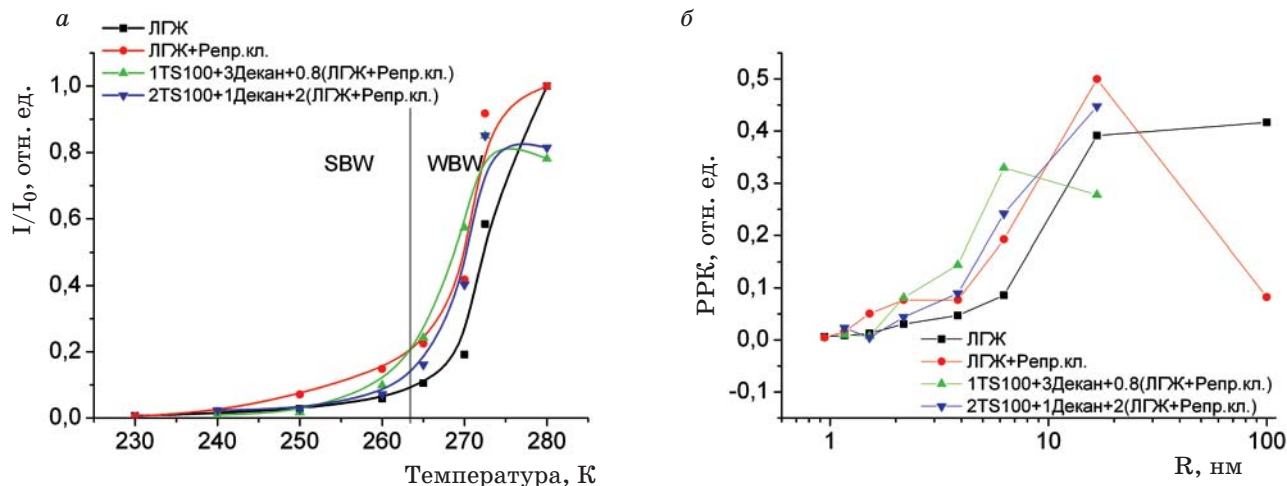


Рис. 5. Температурная зависимость изменения интенсивности сигнала сильноассоциированной воды отнесена к интенсивности сигнала до замораживания образца (а) и распределения по радиусам кристаллов размерзающегося льда (б) в исходной криосреде и клеточных суспензиях, инкорпорированных в гидрофобный композит на основе метилированного кремнезема

ющее воздействие при переходе части воды в слабоассоциированное состояние и существуют в виде концентрированного раствора вода–декан. Аналогичное воздействие поверхность оказывает и на сложные биологические среды, содержащие репродуктивные клетки.

REFERENCES

1. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003, V. 46, P. 205–229.
2. Karlson J. O. M., Toner M. Long-term storage by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996, V. 17, P. 243–256.
3. Cucaeva A. A. (Ed). Crioconservation of cells suspensions. *Kyiv: Naukova dumka*. 1983, 240 p. (In Russian).
4. Pushkar N. C. (Ed). Cryoconservation of cells and tissues. *Kharkiv Institute of problems of cryobiology and cryomedicine*. 1989, 187 p. (In Russian).
5. Gun'ko V. M., Turov V. V., Gorbik P. P. Water on interfaces. *Kyiv: Naukova dumka*. 2009, 694 p. (In Russian).
6. Turov V. V., Gun'ko V. M. The clustered water and ways of its applications. *Kyiv: Naukova dumka*. 2011, 313 p. (In Russian).
7. Gun'ko V. M., Turov V. V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. *New York: Taylor & Francis*. 2013, 1076 p.
8. Petrov O. V., Furo I. NMR cryoporometry: Principles, application and potential. *Progr. NMR*. 2009 V. 54, P. 97–122.
9. Turov V. V., Kerus S. V., Gun'ko V. M. Behavior of water bound in bone marrow cells affected by organic solvents of different polarity. *Cryobiology*. 2009, V. 59, P. 102–112.
10. Pople J. A., Schneider W. G., Bernstein H. J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. *New York: McGraw-Hill Book Company*. 1959, P. 165–180.

**ОСОБЛИВОСТІ ЗАМЕРЗАННЯ ВОДИ
У КРІОЗАХИСНОМУ СЕРЕДОВИЩІ
ЗІ СПЕРМІЯМИ БИКА,
ІНКОРПОРОВАНОМУ В МАТРИЦЮ
ГІДРОФОБНОГО КРЕМНЕЗЕМУ**

*V. V. Turov
T. V. Krupskaya
N. P. Galagan*

Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка
НАН України, Київ

E-mail: *v_turov@ukr.net*

Метою роботи було дослідження процесу танення води в лактозо-гліцерол-жовтковому середовищі з гаметами бика, інкорпорованому у порошок гідрофобного кремнезему, на поверхні якого адсорбовано фіксовані кількості неполярного вуглеводню — *n*-декану. Вивчали можливість структурування твердою поверхнею міжфазної води водних поліасоціатів і розчинність у ній трифтороцтової кислоти. При цьому виживаність репродуктивних клітин після контакту з поверхнею не аналізували.

Методом низькотемпературної ¹H-ЯМР-спектроскопії вивчено стан води у вихідному кріозахисному лактозо-гліцерол-жовтковому середовищі та інкорпорованого в матрицю гідрофобного нанокремнезему TS-100, що містить добавку адсорбованого на його поверхні *n*-декану. Показано, що тверда матриця індукуює формування на міжфазній межі 6–7 молекул води на кожну молекулу декану, які не беруть участі в утворенні водневих зв'язків, і різке зменшення (від 100 до 20 нм) радіуса кристалів льоду, що формуються в клітинній суспензії за її заморожування. Одержані результати можуть слугувати основою для поліпшення умов збереження клітин за їх кріоконсервування і низькотемпературного зберігання шляхом інкорпорування в порошкоподібне композитне середовище.

Ключові слова: ¹H-ЯМР-спектроскопія, гамети бика, сильно- і слабоасоційована вода, кластери води.

**PECULIARITIES OF WATER FREEZING
IN CRYOPROTECTIVE MEDIUM
IMPLEMENTED IN A MATRIX
OF HYDROPHOBIC SILICA BULL SPERM**

*V. V. Turov
T. V. Krupskaya
N. P. Galagan*

Chuiko Institute of Surface Chemistry
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: *v_turov@ukr.net*

The study of the process of melting water in lactose-glycerol-yolk kriomedium containing gametes bull, incorporated in the hydrophobic silica powder, which are adsorbed on the surface of fixed amounts of nonpolar hydrocarbon — *n*-decane was the aim of the work. The possibility of water polyassociates structuring with a solid surface of interfacial water and solubility of trifluoroethanoic acid in it have been studied. Thereat survival of the germ cell after contact with the surface was not analyzed.

State of water in initial cryoprotective glycerol-lactose-yolk medium and hydrophobic nanosilica TS-100 containing *n*-decane additive adsorbed on its surface incorporated in a matrix was studied using low-temperature ¹H-NMR spectroscopy method. It is shown that the solid matrix induces formation of 6–7 water molecules per each dean molecule at the interface, which do not take part in formation of hydrogen bonds, and a sharp radius decrease (from 100 to 20 nm) of ice crystals formed in cell suspension at its freezing. The results could give rise to safety improving of their cells at their cryopreservation and low temperature storage conditions by incorporating into a powder composite environment.

Key words: ¹H-NMR spectroscopy, bull gametes, strongly and weakly associated water, water clusters.