

Оригінальна стаття

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2020-44-01>

УДК 577.3:678.744.7:547.42/43+57.086.13

ВИВЧЕННЯ АГРЕГАЦІЇ ПОЛІВІНІЛОВИХ СПИРТІВ (9 і 31 кДа) У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДУВАННЯ

Т. С. Дюбко¹, В. Г. Пивоваренко², В. В. Чеканова¹, Я. В. Гвоздюк¹,
Ю. С. Пахомова¹, А. М. Компанієць¹, А. Л. Татарець³

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна;

³ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України», просп. Науки, 60, Харків, 61072, Україна
e-mail: tdyubko@gmail.com

Надійшла до редакції 7 жовтня 2020 р.

Прийнята 13 листопада 2020 р.

Актуальність. При розробці методів низькотемпературного зберігання клітин серйозною проблемою є рекристалізація, яка призводить до пошкодження клітин при відігріві. Раніше була показана перспективність використання полівінілового спирту (ПВС) в якості інгібітора рекристалізації. Але механізми захисної дії ПВС з'ясовані недостатньо. Зокрема невідомо, які структурні особливості сприяють реалізації антирекристалізаційних властивостей ПВС в криозахисному діапазоні концентрацій.

Мета роботи. Встановлення особливостей структуроутворення молекул ПВС у водних розчинах методом флуоресцентного зондування.

Матеріали і методи. Досліджено 0,1–5% (ваг.%) водні розчини ПВС з молекулярною масою (м.м.) 9 і 31 кДа. В роботі використовували метод флуоресцентних зондів, фотометрію, сталагмометрію, молекулярне моделювання.

Результати. За допомогою флуоресцентного зонда 3-гідрокси-4'-(N,N-диметиламіно)флавонолу (ФМС) встановлено, що в 0,1–5% водних розчинах ПВС (м.м. 9 і 31 кДа) змінюється структурна організація полімерів з утворенням різних за розмірами і будовою локальних гідрофобних областей. В розчинах ПВС м.м. 9 кДа формуються міцели з меншими порожнинами, де ФМС більш щільно оточений сегментами полімера. У випадку ПВС м.м. 31 кДа утворюються міцели з крупнішими за розміром та більш гідрофільними порожнинами. При вмісті речовини більш ніж 3%, агрегати ПВС м.м. 31 кДа частково руйнуються, що може бути наслідком їх переповнення водою. За цих умов відбувається збільшення міцел ПВС м.м. 9 кДа внаслідок агрегації. За даними молекулярного моделювання ПВС здатний до утворення міцних воднево-зв'язаних комплексів з поверхнею нанокристалів льоду. Такий комплекс, маючи гідрофобну поверхню, може деполіаризувати молекули води, уповільнюючи цим подальше зростання кристалів льоду.

Висновки. У водних розчинах ПВС виявлені зміни структурної організації, які можуть впливати на їх рекристалізаційні властивості. Запропонований механізм реалізації антирекристалізаційної активності полімерів. Обговорюється можлива роль структури і надмолекулярної організації ПВС в розчинах в розумінні механізмів пригнічення рекристалізації при заморожуванні-відігріванні клітин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: полівініловий спирт; агрегація; міцелоутворення; розчин; флуоресценція; 3-гідрокси-4'-(N,N-диметиламіно)флавонол.

STUDY OF POLYVINYL ALCOHOLS (9 and 31 kDa) AGGREGATION IN AQUEOUS SOLUTIONS BY FLUORESCENT PROBING

T. S. Dyubko¹, V. G. Pivovarenko², V. V. Chekanova¹, Ya. V. Hvozdiuk¹,
Yu. S. Pakhomova¹, A. M. Kompaniets¹, A. L. Tatartsy³

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
23 Pereyaslavska Str., Kharkiv, 61015, Ukraine;

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine;

³SSI "Institute for Single Crystals" of National Academy of Sciences of Ukraine, 60 Nauky Ave., Kharkiv, 61072, Ukraine

Background: When developing low-temperature cell storage methods, a serious problem is recrystallization, which leads to cell damage during thawing. Previous studies have shown the promising use of polyvinyl alcohol (PVA) as an inhibitor of recrystallization. But the mechanisms of protective action of PVA are not finally clarified. So, it is not known what structural features contribute to implementation of PVA antirecrystallization properties in the cryoprotective concentration range.

Objectives: Establishing the peculiarities of structuring PVA molecules in aqueous solutions using the fluorescent probe.

Materials and Methods: Aqueous solutions of 0.1–5% (wt.%) PVA with molecular mass (m.m.) of 9 and 31 kDa) were studied. Fluorescence probe method, photometry, stalagmometry, and molecular modeling were used.

Results: Using the 3-hydroxy-4'-(N,N-dimethylamino)flavones (FME) fluorescent probe it was found that in 0.1–5% of PVA (m.m. 9 and 31 kDa) aqueous solutions the structural organization of polymers changes with formation of different in size and structure of local hydrophobic regions. In PVA solutions, m.m. 9 kDa micelles with smaller cavities are formed in which FME is densely surrounded by polymer segments. In the case of PVA m.m. 31 kDa, it forms micelles with smaller cavities surrounded by polymer segments. PVA m.m. 31 kDa forms micelles with larger in size and more hydrophilic cavities. If the content is more than 3%, PVA m.m. 31 kDa aggregates are partially destroyed, which may be the result of increased water content. Under these conditions, PVA m.m. 9 kDa micelles are enlarged. as a result of aggregation. According to molecular modeling data, PVA is able to form strong hydrogen-linked complexes with the surface of ice nanocrystals. Such complex, having a hydrophobic surface, can depolarize water molecules, thus slowing down further growth of ice crystals.

Conclusions: Changes in the structural organization, which may affect the recrystallization properties, have been found in water solutions of PVA. The mechanism of implementation of polymer anticrystallization activity has been suggested. The possible role of structure and supramolecular organization of PVA in aqueous solutions in understanding the mechanisms of depressing recrystallization during freeze-thawing of cells is discussed.

KEY WORDS: polyvinyl alcohol; aggregation; micelle formation; solution; fluorescence; 3-hydroxy-4'-(N,N-dimethylamino)flavones.

ИЗУЧЕНИЕ АГРЕГАЦИИ ПОЛИВИНИЛОВЫХ СПИРТОВ (9 и 31 кДа) В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ

Т. С. Дюбко¹, В. Г. Пивоваренко², В. В. Чеканова¹, Я. В. Гвоздюк¹, Ю. С. Пахомова¹,
А. М. Компанієць¹, А. Л. Татарець³

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23,
Харьков, 61015, Украина;

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64/13, Киев, 01601,
Украина;

³ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины», просп. Науки, 60, Харьков, 61072, Украина

Актуальность. При разработке методов низкотемпературного хранения клеток серьезной проблемой является рекристаллизация, приводящая к повреждению клеток при отогреве. Ранее была показана перспективность использования поливинилового спирта (ПВС) как ингибитора рекристаллизации. Но механизмы защитного действия ПВС окончательно не выяснены. Так, неизвестно, какие структурные особенности способствуют реализации антирекристаллизационных свойств ПВС в области криозащитных концентраций.

Цель работы. Установление особенностей структурирования молекул ПВС в водных растворах с помощью метода флуоресцентного зондирования.

Материалы и методы. Исследовали 0,1–5% (вес.%) водные растворы ПВС с молекулярной массой (м.м.) 9 и 31 кДа. В работе использовали метод флуоресцентных зондов, фотометрию, сталагмометрию, молекулярное моделирование.

Результаты. С помощью флуоресцентного зонда 3-гидрокси-4'-(N,N-диметиламино)флавона (ФМЕ) установлено, что в 0,1–5% водных растворах ПВС (м.м. 9 и 31 кДа) изменяется структурная организация полимеров с образованием разных по размерам и строению локальных гидрофобных областей. В растворах ПВС м.м. 9 кДа образуются мицеллы с меньшими полостями, в которых ФМЕ плотнее окружен сегментами полимера. В случае ПВС м.м. 31 кДа образуются мицеллы с большими по размерам и более гидрофильными полостями. При содержании вещества более чем 3%, агрегаты ПВС м.м. 31 кДа частично разрушаются, что может быть следствием повышенного содержания воды. В этих условиях происходит укрупнение мицелл ПВС м.м. 9 кДа в результате агрегации. По данным молекулярного моделирования ПВС способен образовывать

прочные водород-связанные комплексы с поверхностью нанокристаллов льда. Такой комплекс, имея гидрофобную поверхность, может деполаризовать молекулы воды, замедляя этим дальнейший рост кристаллов льда.

Выводы. В водных растворах ПВС обнаружены изменения структурной организации, которые могут влиять на рекристаллизационные свойства. Предложен механизм реализации антирекристаллизационной активности полимеров. Обсуждается возможная роль структуры и надмолекулярной организации ПВС в растворах в понимании механизмов угнетения рекристаллизации при замораживании-отогреве клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: поливиниловый спирт; агрегация; мицеллообразование; раствор; флуоресценция; 3-гидрокси-4'-(N,N-диметиламино)флавоин.

Одним з основних факторів пошкодження клітин при кріоконсервуванні є неконтрольований ріст кристалів льоду на етапі відігрівання – рекристалізація [1, 2]. Перспективною є розробка нових кріоконсервантів, здатних ефективно пригнічувати рекристалізацію льоду, у яких поряд з традиційними кріопротекторами використовуються синтетичні сполуки, яким, як і природним антифризовим білкам (AF(G)Ps), притаманна антирекристалізаційна активність (*англ.* ice recrystallization inhibitors, IRI) [3–5]. До переваг синтетичних аналогів відносять більшу доступність, меншу цитотоксичність та імуногенність у порівнянні з природними AF(G)Ps [6, 7]. Серед таких сполук заслуговує уваги полівініловий спирт (ПВС). В мікромольних концентраціях ПВС виявляє властивості ефективного інгібітора рекристалізації і сприяє підвищенню ефективності заморожування деяких клітин, в тому числі, еритроцитів [3, 6, 8, 9]. Однак, ці результати мають попередній характер і потребують додаткових досліджень. Зокрема, важливим є з'ясування ролі структури та надмолекулярної організації поліолів у розчині в розумінні механізмів пригнічення ними рекристалізаційних процесів при заморожуванні-відігріванні.

Недавніми дослідженнями встановлено, що поверхнево активні речовини (ПАР) на основі вуглеводів є інгібіторами кристалізації льоду нижче критичної концентрації міцелоутворення (ККМ) [10, 11]. У той самий час, аналіз кількох AF(G)Ps показав, що всі вони мають у своїй структурі гідрофобні домени. Тобто, додатковий внесок у проявлення IRI-активності може вносити контакт молекул води з інгібітором, адсорбованим поверхнею нанокристалу льоду. Авторами роботи [10] показано, що утворення міцел у розчинах похідних неіонних сурфактантів не є обов'язковим для проявлення IRI-активності. Не було знайдено також зв'язку між здатністю гідрохелаторів формувати гідрогелі та їх IRI-активністю. В той же час, важливим для виявлення IRI-активності відзначається рівень гідратації вуглеводів.

Було досліджено велику кількість вуглеводів і низькомолекулярних компонентів, які мають багато гідроксильних груп, на їх здатність виявляти антирекристалізаційну активність [6, 12]. Встановлено, що IRI-активність може корелювати з загальним числом гідроксильних груп в молекулах сахаридів [5]. Заміщення гідроксильних груп гідрофобними алкільними радикалами призводить до підвищення активності, навіть якщо загальне число гідроксильних груп знижене. Це показує, що хоч гідратація і важлива, присутність гідрофобних доменів також потрібна для виявлення IRI-активності. У роботі [6], яка продовжує даний напрямок, ці результати зіставляються з ПВС, який є високоактивним IRI-полімером і за наявними даними не має явних гідрофобних областей. Тим не менше, ПВС виявився здатним розчиняти гідрофобний флуоресцентний барвник [3].

У даній роботі, з метою подальшого вивчення особливостей структурування молекул ПВС, досліджені властивості водних розчинів цього поліола з молекулярною масою 9 і 31 кДа методом флуоресцентного зондування з використанням зонда 3-гідрокси-4'-(N,N-диметиламіно)флавоина (ДМАФ, або ще використовується скорочена назва — ФМС).

Для ФМЄ, як і інших флавонолів, у збудженому стані характерний ефект внутрішньомолекулярного фотопереносу протона (ESIPT), у результаті якого виникають дві спектральні форми (рис. 1, А) — нормальна (N^*) і таутомерна (T^*) [13–17], флуоресценція яких виявляє високу чутливість до параметрів оточення. Оскільки найбільш чутливою до гідратації оточення є N^* -смуга, ступінь гідратації молекул зонда ФМЄ в водному розчині можна характеризувати співвідношенням інтенсивностей смуг I_{N^*}/I_{T^*} [13, 18, 19].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В роботі використовували полівініловий спирт з молекулярною масою 9 і 31 кДа (далі — ПВС м.м. 9 кДа і ПВС м.м. 31 кДа відповідно) фірми “Sigma” (Aldrich, США). Розчини ПВС готували ваговим методом на дистильованій воді (рН 7,2) і концентрацію виражали у вагових відсотках (ваг. %).

Значення ККМ для ПВС визначали сталагометричним методом [20, 21].

ФМЄ (3-гідрокси-4'-(N,N-диметиламіно)флавіон) був синтезований за методом [22].

Спектри флуоресценції записували на спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Varian, Австралія) при ширині вхідної і вихідної щілин монохроматорів 5 нм. Крок сканування складав 0,2 нм, час накопичення — 2 с. Флуоресценцію ФМЄ збуджували світлом з довжиною хвилі 405 нм. В експериментах використовували 1×10^{-3} М спиртовий розчин ФМЄ. Кінцева концентрація зонда в розчинах була $1,7 \times 10^{-6}$ М.

Оптичне поглинання реєстрували на фотометрі КФК-3-01 («ЗОМЗ», Росія). Всі спектральні вимірювання проводили у кварцових кюветах $1 \times 1 \times 3$ см при температурі $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Моделювання конформацій сегментів ПВС та їх комплексів із зондами проводили шляхом оптимізації енергії конформера методом молекулярної механіки ММ+.

Аналіз результатів і їх статистичну обробку виконували в програмі Microcal Origin 8.0. Положення максимумів спектрів уточнювали за допомогою других похідних.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення розчинів ПВС м.м. 9 кДа

З рис. 1, Б видно, що в розчині ПВС м.м. 9 кДа ФМЄ має двосмугову форму спектра флуоресценції. N^* -смуга має максимум при 515 нм. T^* -смуга за концентрації ПВС м.м. 9 кДа 0,1 і 0,2% спостерігається у вигляді плеча, однак з подальшим ростом концентрації полімеру вона виділяється на спектрах в самостійну смугу з максимумом

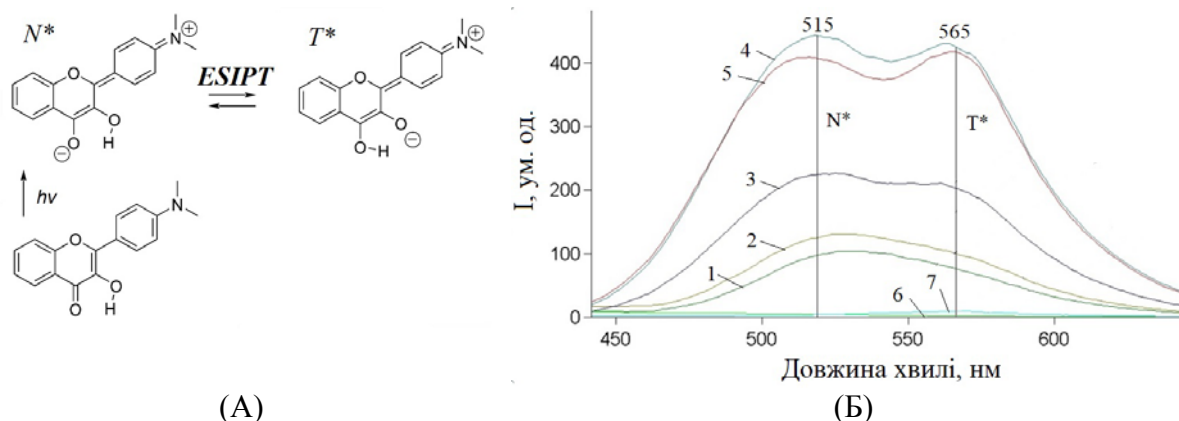


Рис. 1. (А) хімічна структура основного і збудженого станів ФМЄ [16]; (Б) форма спектрів флуоресценції ФМЄ в розчинах ПВС м.м. 9 кДа різних концентрацій: 1 — 0,1%, 2 — 0,2%, 3 — 0,5%, 4 — 1%, 5 — 5%, 6 — ПВС м.м. 9 кДа без зонда, 7 — ФМЄ у воді, рН 7,2; I — інтенсивність флуоресценції, N^* — смуга нормальної форми, T^* — смуга таутомерної форми ($\lambda_{36} = 405$ нм).

при 565 нм. Обидві смуги мають близьку інтенсивність, схожу з формою спектрів ФМЄ в мембранних структурах (ліпосомах або міцелах [23]).

Із збільшенням концентрації ПВС м.м. 9 кДа у водному розчині (рис. 2, А) інтенсивність N^* - і T^* -смуг флуоресценції ФМЄ немонотонно зростає. Так, відбувається близьке до лінійного зростання інтенсивності флуоресценції в області 0,1–1 ваг.% і подальші незначні зміни інтенсивності флуоресценції зонда до концентрації ПВС 5 ваг.%.

Із зростанням концентрації ПВС м.м. 9 кДа положення максимуму N^* -смуги ФМЄ зміщується в короткохвильовий бік, що відповідає підвищенню гідрофобності мікрооточення зонда, але вище концентрації полімеру 1 ваг.% зміщення максимуму сильно вповільнюється (рис. 2, Б). На підставі змін загальної інтенсивності флуоресценції і положення максимуму N^* -смуги можна зробити висновок, що підвищення концентрації ПВС м.м. 9 кДа у розчині призводить до утворення неполярного оточення навколо молекул ФМЄ. Тобто, за концентрації ПВС більше 0,5 ваг.% відбувається інтенсивна сольватація зонда молекулами полімеру.

Відношення інтенсивностей флуоресценції смуг I_{N^*}/I_{T^*} ФМЄ (рис. 2, В), яке є показником кількості молекул води в мікрооточенні зонда, з ростом концентрації ПВС м.м. 9 кДа знижується також немонотонно: на фоні загального зниження відношення I_{N^*}/I_{T^*} , різкий злам спостерігається в області 0,5–1 ваг.% ПВС. Це свідчить про зниження загальної кількості молекул води в мікрооточенні зонда ФМЄ в присутності ПВС м.м. 9 кДа і підтверджує зроблені висновки.

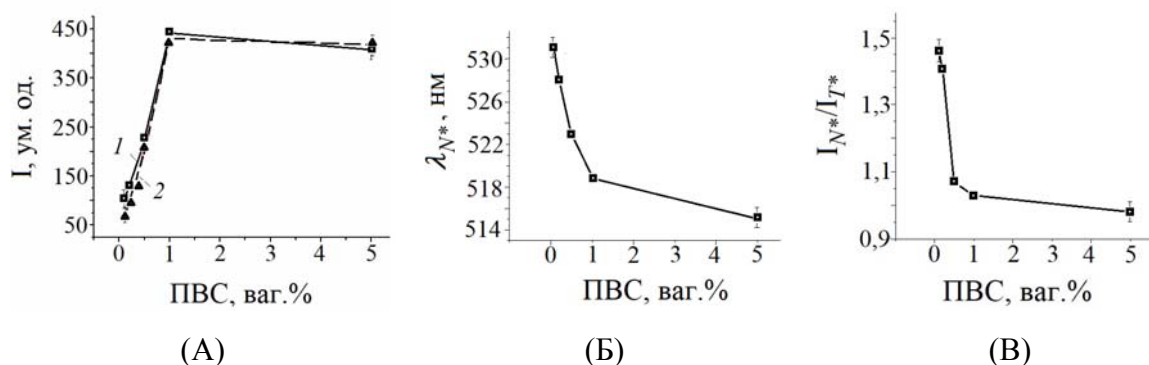


Рис. 2. Вплив ПВС (м.м. 9 кДа) на інтенсивність N^* - (1) і T^* -смуг (2) (А), на положення максимуму нормальної (N^*) смуги (Б) і на відношення максимумів (В) флуоресценції нормальної (N^*) і таутомерної (T^*) форм ФМЄ.

В цілому, підсумовуючи отримані результати, можна сказати, що в області концентрацій 0,5–1 ваг.% ПВС м.м. 9 кДа відбувається зміна складу сольватної оболонки зонда ФМЄ, яка відображає перебудову надмолекулярної структури розчину полімера з утворенням порожнин, що містять зонд ФМЄ. На користь перебудови структури розчину ПВС м.м. 9 кДа у зазначеній області концентрацій свідчить також визначена величина ККМ для цієї речовини, яка має значення 0,24%.

Вивчення розчинів ПВС м.м. 31 кДа

Як видно з рис. 3, у спектрах флуоресценції ФМЄ, який знаходиться в розчинах ПВС м.м. 31 кДа досліджених концентрацій (0,1–5 ваг.%), переважає нормальна складова з максимумом при 528 нм. Її внесок дещо зменшується тільки за вмісту ПВС у розчині 5 ваг.%, що відображає зміну просторової організації міжмолекулярних

водневих зв'язків у розчині. T^* -смуга за малих концентрацій ПВС слабо виражена і стає помітною лише за вмісту ПВС у розчині 5 ваг.%.

На відміну від ПВС м.м. 9 кДа, зі збільшенням концентрації ПВС м.м. 31 кДа у водному розчині спостерігається немонотонне зростання інтенсивності N^* - і T^* -смуг флуоресценції ФМЄ, з уповільненням росту в області малих концентрацій (0,5–1 ваг.%) і наступним різким збільшенням (рис. 4).

Незначні зміни положення N^* -смуги (1–3 нм) з ростом концентрації ПВС м.м. 31 кДа (див. рис. 4, Б) свідчать про невеликі зміни полярності оточення зонда. Відношення інтенсивностей флуоресценції смуг I_{N^*}/I_{T^*} з ростом концентрації ПВС м.м. 31 кДа знижується різноспрямовано (рис. 4, В): в області 0,2–1 ваг.% ПВС відношення I_{N^*}/I_{T^*} зростає, вказуючи на ріст полярності найближчого мікрооточення зонда, а в області концентрацій полімеру вище 1 ваг.%, навпаки, це відношення знижується, що свідчить про зниження полярності мікрооточення ФМЄ за рахунок зменшення кількості молекул води. Виявлений ефект може бути наслідком підвищення густини упаковки молекул у розчині даної сполуки з ростом її концентрації внаслідок агрегації. Визначена величина ККМ для ПВС м.м. 31 кДа склала 0,2%.

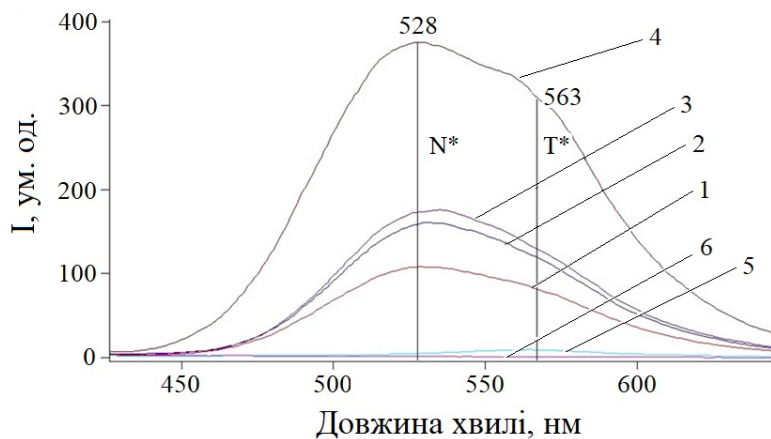


Рис. 3. Форма спектрів флуоресценції зонда ФМЄ в розчинах ПВС м.м. 31 кДа різних концентрацій: 1 — 0,2%, 2 — 0,5%, 3 — 1%, 4 — 5%, 5 — ПВС м.м. 31 кДа без зонда, 6 — ФМЄ у воді, рН 7,2 ($\lambda_{36}=405$ нм).

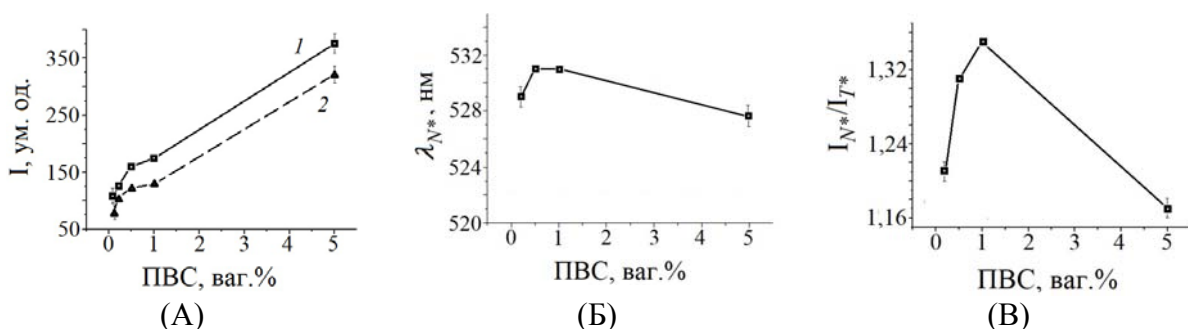


Рис. 4. Вплив ПВС м.м. 31 кДа на інтенсивність флуоресценції N^* - (1) і T^* - (2) форм ФМЄ (А), на положення максимуму спектра зонда (Б) і на відношення інтенсивностей його N^* - (1) і T^* -форм (В).

Порівнюючи положення N^* -смуги флуоресценції ФМЄ в розчинах ПВС м.м. 9 кДа і ПВС м.м. 31 кДа бачимо, що за однакової їхньої концентрації у випадку ПВС м.м. 31 кДа вона зміщена в червону область (див. рис. 2, Б і рис. 4, Б). Особливо це помітно в 5%-х розчинах, де положення N^* -смуги ФМЄ в розчині ПВС м.м. 9 кДа і ПВС м.м. 31 кДа становить 515 і 528 нм відповідно. Це свідчить про те, що полярність мікрооточення зонда, який знаходиться у розчинах, завжди вища у випадку полімера з вищою молекулярною масою (31 кДа). Висока відносна інтенсивність N^* -смуги ($I_{N^*}/I_{T^*}=1,17$ у порівнянні з 0,98 для ПВС м.м. 9 кДа) при цьому вказує на присутність

більшої кількості молекул води, яка оточує молекулу зонда в розчині ПВС м.м. 31 кДа. Можна припустити, що низькомолекулярний ПВС м.м. 9 кДа в розчинах формує міцели з дрібнішими порожнинами, де зонд щільніше оточений сегментами полімеру. У випадку високомолекулярного ПВС м.м. 31 кДа формуються інші структури, міцели з крупнішими і більш гідрофільними порожнинами, або без вираженого ядра, або з ядром, до якого не проникає флуоресцентний зонд.

Раніше, в роботі [3] було виявлено зростання інтенсивності флуоресценції гідрофобного флуоресцентного зонда дифенілгексатрієна (DPH) при послідовному додаванні ПВС м.м. 9 кДа до розчину в області концентрацій вище 0,5% (досліджували область до 2%), яке автори пояснювали формуванням гідрофобних доменів у розчині даного полімеру. В той самий час, для аналогічних концентрацій ПВС м.м. 15 кДа, при збільшенні концентрації полімеру спостерігалось дещо менше зростання інтенсивності флуоресценції зонда з точкою перетину за нижчої концентрації, що може свідчити, на думку авторів, про його більшу гідрофобність. Автори роботи припускають, що за певних умов ПВС здатний до утворення локальних порожнин з підвищеною гідрофобністю, зокрема, може перебудовувати свою структуру в присутності зовнішніх молекул. Виявлену властивість ПВС автори вважають унікальною, непритаманною іншим сурфактантам. Раніше також було зазначено, що більш високомолекулярні ПВС після заморожування-відігрівання здатні утворювати агрегати [24]. Також при підвищенні температури (на етапі відігрівання) у водних розчинах ПВС може відбуватись реорганізація системи Н-зв'язків [25], яка впливає на здатність ОН-груп полімеру до утворення міжмолекулярних Н-зв'язків. Більш конформаційно рухливі глікополімери, які мають низьку IRI, мають подібні гідрофобні домени, а їхня активність корелює з (оліго)сахаридним і гідратаційним індексами. Так, октилглюкозид, який має крупний гідрофобний домен, був значно менш активним, ніж ПВС. Вище точки ККМ (~25 мкМ [26]) октилглюкозид не має гідрофобних доменів через скупчення однорідних алкільних ланцюгів у ядрі. Вважається [3], що таким чином виявляється унікальна здатність ПВС утворювати гідрофобні домени або спонтанно, або у відповідь на введення зовнішніх молекул, які порушують його поверхнево-активні властивості.

Експериментально показано [8], що для проявлення IRI-активності ПВС важливі такі параметри, як молекулярна маса, співвідношення гідрофільних і гідрофобних ділянок, а також концентрація у розчині. Так, визначена критична довжина ланцюга, перевищення якої знижує IRI-активність полімеру. Припускають, що певна довжина ланцюга є оптимальною для взаємодії ПВС з поверхнею льоду. Гідрофобні домени відіграють важливу роль у проявленні IRI у протеїнів та їхніх синтетичних аналогів, але в молекулах ПВС впорядковане розташування гідрофобних груп призводить до зниження IRI-активності. Тобто, будова інгібітору, який знаходиться в розчині, визначає ефективність його адсорбції на поверхні льоду або орієнтацію гідрофобних груп полімеру на цій поверхні, що є важливим для проявлення IRI-активності.

Молекулярне моделювання можливих конформацій ланцюгів ПВС

З метою дослідження просторової взаємодії сегментів ланцюгів досліджуваних розчинів між собою і з поверхнею льоду ми провели молекулярне моделювання можливих конформацій ланцюгів ПВС, а також їхніх агрегатів з зондами ФМС і DPH. Одна з отриманих конформацій (рис. 5, А) свідчить про можливість утворення Н-зв'язків сегментами молекули ПВС безпосередньо з поверхнею льоду, або опосередковано — через ланцюжок Н-зв'язків окремих молекул води. Міцність такого комплексу забезпечується множинністю Н-зв'язків, а характерною його особливістю є

гідрофобна поверхня, яка формується з протилежного боку від зони Н–зв’язків з льодом. Гідрофобні фрагменти молекул зменшують ступінь поляризації води у своєму оточенні, зменшуючи їхню здатність до утворення Н–зв’язків з поверхнею кристала (тобто, блокуючи його зростання). Аналогічним чином можуть впливати на поверхню льоду гідрофобні білки, антирекристалізаційна активність яких обговорювалася вище. Утворення гідрофобної поверхні сегментом ланцюга ПВС забезпечує формування гідрофобних порожнин у структурі міцел, передбачених раніше в роботі [3].

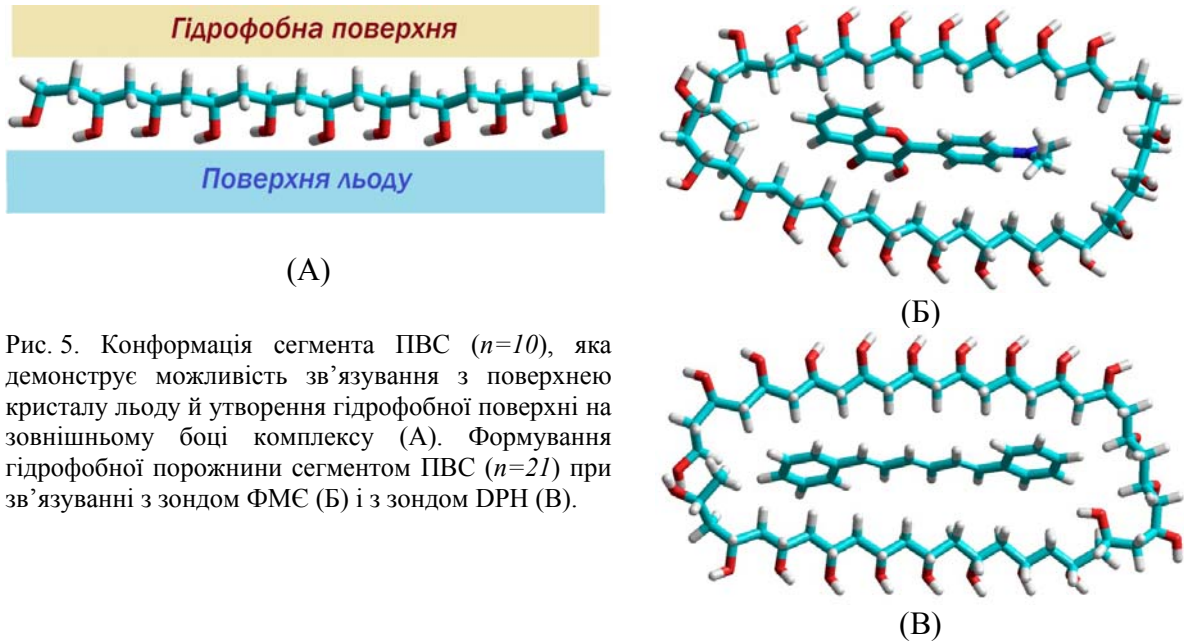


Рис. 5. Конформація сегмента ПВС ($n=10$), яка демонструє можливість зв’язування з поверхнею кристалу льоду й утворення гідрофобної поверхні на зовнішньому боці комплексу (А). Формування гідрофобної порожнини сегментом ПВС ($n=21$) при зв’язуванні з зондом ФМС (Б) і з зондом DPH (В).

Моделювання комплексу ФМС з сегментом ланцюга ПВС показало, що для повного охоплення молекули ФМС сегментом ПВС достатньо 16–20 мономерних ланок ланцюга з двохста або семиста наявних у молекулах ПВС м.м. 9 кДа і ПВС м.м. 31 кДа відповідно (рис. 5, Б). Стабілізація такого комплексу відбувається за рахунок заповнення гідрофобної порожнини ПВС найбільш гідрофобною частиною молекули ФМС. Аналогічним чином формується комплекс зонда DPH з сегментом ланцюга ПВС (рис. 5, В).

З такого уявлення про просторову будову комплексів кристалів льоду і ПВС можна зробити висновок, що менша антирекристалізаційна активність високомолекулярних зразків (ПВС м.м. 15 кДа, ПВС м.м. 31 кДа) може бути результатом неповного розгортання і контакту довголанцюгового полімера з поверхнею льоду.

Таким чином, можливий механізм антирекристалізаційної активності полімерів ПВС може бути таким. Утворення міцних воднево-зв’язаних комплексів ПВС з поверхнею кристалів льоду сильно змінює структуру поверхні. Утворені комплекси модифікують поверхню, деполіаризують молекули води у своєму оточенні і цим гальмують подальший ріст кристалів льоду.

Визначення оптичної густини розчинів ПВС м.м. 9 кДа і ПВС м.м. 31 кДа

На рис. 6 показано зміни оптичної густини розчинів ПВС м.м. 9 кДа і ПВС м.м. 31 кДа в області концентрацій від 0,1 до 5% у порівнянні з розчинами детергента Тритон Х-100. Можна бачити, що вже за концентрації 1–2% полімер ПВС м.м. 31 кДа має найвище значення оптичної густини, яке свідчить про присутність у розчині асоціатів найбільшого розміру.

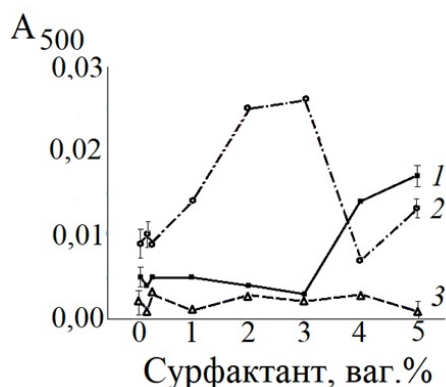


Рис. 6. Залежність оптичної густини водних розчинів ПВС м.м. 9 кДа (1), ПВС м.м. 31 кДа (2) і тритона X-100 (3) від їхньої концентрації ($\lambda_{\text{реєстр}} = 500 \text{ нм}$).

Як видно з рис. 6, оптична густина монотонно зростає при збільшенні концентрації ПВС м.м. 31 кДа до 3%, після чого падає до початкового рівня. Це свідчить про зміну структури розчину. Ми вважаємо, що причиною такого перетворення може бути часткове руйнування міцел ПВС м.м. 31 кДа при їхній агрегації, яка починається за концентрацій $>3\%$, коли міцели стають у значній мірі наповненими водою. Таке припущення підтверджується в дослідях з зондом ФМЄ, які показали, що кількість води в оточенні зонда вища саме в середовищі міцел ПВС м.м. 31 кДа (див. вище).

У випадку полімеру меншої молекулярної маси (ПВС м.м. 9 кДа) такий ефект не спостерігається: оптична густина його розчинів майже не змінюється до концентрації 3%, після чого різко (в 3 рази) зростає. Причиною такого росту оптичної густини може бути збільшення міцел ПВС м.м. 9 кДа внаслідок агрегації. Менший розмір міцел ПВС м.м. 9 кДа призводить до того, що їхня агрегація відбувається за вищих концентрацій, ніж для міцел ПВС м.м. 31 кДа. Однак, як і у флуориметричному експерименті з зондом ФМЄ, у процесі агрегації їх розпушення не спостерігається.

Таким чином, згідно з отриманими нами даними, полімери ПВС м.м. 9 кДа і ПВС м.м. 31 кДа здатні утворювати локальні гідрофобні області у водних розчинах, наявність яких може впливати на їхню рекристалізаційну активність. В досліджуваному діапазоні концентрації відбуваються також перебудови структури водно-полімерних асоціатів, які можуть впливати на кристалоутворення і життєздатність клітин на етапах охолодження і відігрівання, коли в результаті виморожування вільної і слабо зв'язаної води в системі змінюється концентрація розчинених компонентів.

ВИСНОВКИ

З використанням мультипараметричного флуоресцентного зонда ФМЄ встановлено, що у 0,1–5% розчинах ПВС (м.м. 9 і 31 кДа) структура водних розчинів ПВС зазнає перебудов, в результаті яких формуються локальні гідрофобні області й утворюються асоціати, ймовірно міцелярного типу. В водних розчинах ПВС м.м. 9 кДа формує міцели з меншими порожнинами, де зонд ФМЄ більш щільно оточений сегментами полімера. У випадку ПВС м.м. 31 кДа утворюються міцели іншої структури, з крупнішими за розміром та більш гідрофільними порожнинами, без вираженого ядра, або з ядром, в яке не проникає флуоресцентний зонд.

При концентраціях більших ніж 3%, агрегати ПВС м.м. 31 кДа починають частково руйнуватись, що може бути наслідком їх значного наповнення водою. У випадку ПВС м.м. 9 кДа, за концентрацій $>3\%$, відбувається збільшення міцел ПВС м.м. 9 кДа внаслідок агрегації.

На підставі даних молекулярного моделювання запропонований механізм реалізації антирекристалізаційної активності ПВС-полімерів, який полягає в утворенні міцних

воднево-зв'язаних комплексів з поверхнею нанокристалів льоду. Сформований таким чином на поверхні льоду комплекс, маючи гідрофобну поверхню, деполаризує молекули води, уповільнюючи цим подальше зростання кристалів льоду.

ПОДЯКА

Роботу виконано за підтримки НАН України (тема НДР 2.2.6.102, керівник — доктор мед. наук, проф. А. М. Компанієць).

Автори висловлюють щире вдячність зав. відділом фізико-органічної хімії НДІ хімії, професору кафедри хімічного матеріалознавства хімічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Олександрю Давидовичу Рошалю за цінні зауваження, висловлені при обговоренні статті.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Tatyana Dyubko  <https://orcid.org/0000-0003-3207-4779>
Vasyl Pivovarenko  <https://orcid.org/0000-0002-6652-2333>
Yuliya Pakhomova  <https://orcid.org/0000-0003-2682-3796>
Yana Hvozdiuk  <https://orcid.org/0000-0001-9377-4678>
Anatoliy Tatars  <https://orcid.org/0000-0003-4406-7883>

REFERENCES

1. Mazur P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 1984;247:125–42. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
2. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present and future. *Transfus. Med. Rev.* 2005;19:127–42. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2004.11.004>
3. Deller RC, Vatish M, Mitchell DA, Gibson MI. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. *Nature Communications.* 2014;5:3244–51. <https://doi.org/10.1038/ncomms4244>
4. Leclere M, Kwok BK, Wu LK, Allan DS, Ben RN. C-Linked antifreeze glycoprotein (C-AFGP) analogues as novel cryoprotectants. *Bioconj.Chem.* 2011;22:1804–10. <https://doi.org/10.1021/bc2001837>
5. Tam RY, Ferreira SS, Czechura P, Chaytor JL, Ben RN. Hydration index A better parameter for explaining small molecule hydration in inhibition of ice recrystallization. *J. Am. Chem. Soc.* 2008;130:17494–501. <https://doi.org/10.1021/ja806284x>
6. Deller RC, Congdon T, Sahid MA, Morgan M, Vatish M, Mitchell DA, et al. Ice recrystallization inhibition by polyols comparison of molecular and macromolecular inhibitors and role of hydrophobic units. *Biomaterials Science.* 2013;1:478–85. <https://doi.org/10.1039/C3BM00194F>
7. Gibson MI. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules: beyond antifreeze(glyco) proteins. *Polym. Chem.* 2010;1:1141–52. <https://doi.org/10.1039/C0PY00089B>
8. Congdon T, Notman R, Gibson MI. Antifreeze (glyco)protein mimetic behavior of poly(vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. *Biomacromolecules.* 2013;14:1578–86. <https://doi.org/10.1021/bm400217j>
9. Richards SJ, Jones MW, Hunaban M, Haddleton DM, MI Gibson. Probing bacterial-toxin inhibition with synthetic glycopolymers prepared by tandem post-polymerization modification: role of linker length and carbohydrate density. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012;51:7812–16. <https://doi.org/10.1002/anie.201202945>
10. Capicciotti CJ, Leclere M, Perras FA, Bryce DL, Paulin H, Harden J, et al. Potent inhibition of ice recrystallization by low molecular weight carbohydrate-based surfactants and hydrogelators. *Chem. Sci.* 2012;3:1408–16. <https://doi.org/10.1039/C2SC00885H>
11. Haymet ADJ, Ward LG., Harding MM. Winter flounder “antifreeze” proteins: synthesis and ice growth inhibition of analogues that probe the relative importance of hydrophobic and hydrogen-bonding interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999;121:941–48. <https://doi.org/10.1021/ja9801341>
12. Gibson MI, Barker CA, Spain SG, Albertin L, Cameron NR. Inhibition of ice crystal growth by synthetic glycopolymers: implications for the rational design of antifreeze glycoprotein mimics. *Biomacromolecules.* 2009;10:328–33. <https://doi.org/10.1021/bm801069x>

13. Roshal AD, Grigorovich AV, Dorochenko AO, Pivovarenko VG, Demchenko AP. Flavonols as methal ion chelators. Complex formation with Mg^{2+} and Ba^{2+} cations in the excited state. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1999;127:89–100. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(99\)00105-7](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(99)00105-7)
14. Ercelen S, Klymchenko AS, Demchenko AP. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities. *Analytica Chimica Acta*. 2002;464:273–87. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00493-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00493-2)
15. Ercelen S, Klymchenko AS, Demchenko AP. Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin. *FEBS Letters*. 2003;538:25–8. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00116-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00116-9)
16. Roshal AD, Organero JA, Douhal A. Tuning the mechanism of proton-transfer in a hydroxyflavone derivative. *Chemical Physics Letters*. 2003;379:53–9. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.08.008>
17. Moroz VV, Chalyi AG, Roshal AD. The properties of 4'-N,N-dimethylaminoflavonol in the ground and excited states. *Russ. J. Phys. Chem.* 2008;82(9):1464–69. <https://doi.org/10.1134/S0036024408090100>
18. Klymchenko AS, Demchenko AP. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003;5:461–8. <https://doi.org/10.1039/B210352D>
19. Shynkar VV, Klymchenko AS, Piémont E, Demchenko AP, Mély Y. Dynamics of intermolecular hydrogen bonds in the excited states of 4'-dialkylamino-3-hydroxyflavones. On the pathway to an ideal fluorescent hydrogen bonding sensor. *J. Phys. Chem. A*. 2004;108:8151–9. <https://doi.org/10.1021/jp047990l>
20. Harkins WD, Brown FE. The determination of surface tension (free surface energy), and the weight of falling drops: the surface tension of water and benzene by the capillary height method. *J. Am. Chem. Soc.* 1919;41(4):499–24. <https://doi.org/10.1021/ja01461a003>
21. Abe M, editor. *Measurement techniques and practices of colloid and interface phenomena*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2019; 145 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-5931-6>
22. Smith MA, Neumann RM, Webb RA. A modification of the Algar-Flynn-Oyamada preparation of flavonols. *J. Heteroc. Chem.* 1968;5:425–6. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570050323>
23. Klymchenko AS, Mely Y, Demchenko AP, Duportail G. Simultaneous probing of hydration and polarity of lipid bilayers with 3-hydroxyflavone fluorescent dyes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004;1665:6–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2004.06.004>
24. Liu M, Cheng R, Qian R. Effect of solution concentration on the gelation of aqueous polyvinyl alcohol solution. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 1995;33:1731–35. <https://doi.org/10.1002/polb.1995.090331204>
25. Rumyantsev MS, Gushchin AV. The effect of hexamethylphosphoramide solvent on the viscosity of polyvinyl alcohol solutions. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. NI Lobachevskogo*. 2013;1:91–4. Available from: [http://www.unn.ru/pages/e-library/vestnik/99999999_West_2013_1\(1\)/20.pdf](http://www.unn.ru/pages/e-library/vestnik/99999999_West_2013_1(1)/20.pdf) (in Russian)
26. Shinoda K, Yamaguchi T, Hori R. The surface tension and the critical micelle concentration in aqueous solution of β -D-alkyl glucosides and their mixtures. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1961;34:237–41. <https://doi.org/10.1246/bcsj.34.237>