

УДК 547.422:544.01

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ГЛІЦЕРИНУ І ЙОГО ОКСИЕТИЛЬНИХ  
ПОХІДНИХ З ДИМЕТИЛАЦЕТАМІДОМ У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ  
МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ**

Т.С. Дюбко<sup>1</sup>, В.Г. Пивоваренко<sup>2</sup>, В.В. Чеканова<sup>1</sup>, Ю.С. Пахомова<sup>1</sup>,  
А.М. Компанієць<sup>1</sup>, А.Л. Татарець<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків,  
Україна,

<sup>2</sup> Київський Національний університет ім. Т.Г.Шевченка, Київ, Україна,

<sup>3</sup> ДНУ НТК «Інститут монокристалів НАН України», Харків, Україна

**Реферат**

В роботі досліджено взаємодію сумішей гліцерину (ГЛ) і його оксиетильних похідних (ОЕГ) зі ступенем полімеризації ( $n$ ) 3, 25 і 30 з диметилацетамідом (ДМАЦ) у водному розчині за допомогою флуоресцентного зонда 4'-диметиламінофлавонола. Встановлено, що комбінація ГЛ і його оксиетильних похідних з ДМАЦ знижує мембранотропність окремих кріопротекторів, які утворюють суміш. Комбінація ГЛ, як і його низькомолекулярного похідного (ОЕГ <sub>$n=3$</sub> ) з ДМАЦ знижує мембранотропність ДМАЦ. В той же час, комбінація високомолекулярних похідних ГЛ (ОЕГ <sub>$n=25$</sub>  і ОЕГ <sub>$n=30$</sub> ) з ДМАЦ знижує мембранотропність ОЕГ. Показано, що ОЕГ <sub>$n=30$</sub>  при концентраціях вище 1 мас.% утворює у водному розчині структури міцелярного типу або міцелярні асоціати. Це дозволяє припустити, що мембранотропна здатність асоціатів високомолекулярних ОЕГ обумовлена можливістю взаємодії їх неполярних сегментів з неполярними ділянками на поверхні біомембран. В якості одного з механізмів експериментально встановленого факту зниження цитотоксичності комбінованих кріозахисних середовищ названо перебудови структури молекулярних асоціатів у водних розчинах сумішей низько- і високомолекулярних кріопротекторів.

**Ключові слова:** гліцерин, оксиетильні похідні, диметилацетамід, кріопротектори, суміші, мембранотропність, 4'-диметиламінофлавонол, флуоресценція

### Реферат

В работе изучено взаимодействие смесей глицерина (ГЛ) и его оксиэтильных производных (ОЭГ) со степенью полимеризации ( $n$ ) 3, 25 и 30 с низкомолекулярным криопротектором диметилацетамидом (ДМАЦ) в водном растворе с помощью флуоресцентного зонда 4'-диметиламинофлавонола. Установлено, что комбинация ГЛ и его оксиэтильных производных с ДМАЦ снижает мембранотропность отдельных криопротекторов, образующих смесь. Комбинация ГЛ, как и его низкомолекулярного производного  $\text{ОЭГ}_{n=3}$  с ДМАЦ снижает мембранотропность ДМАЦ. В то же время, комбинация высокомолекулярных производных ГЛ ( $\text{ОЭГ}_{n=25}$  и  $\text{ОЭГ}_{n=30}$ ) с ДМАЦ снижает мембранотропность ОЭГ. Показано, что  $\text{ОЭГ}_{n=30}$  при концентрациях выше 1 мас.% образует в водном растворе структуры мицеллярного типа или мицеллярные ассоциаты. Предполагается, что мембранотропная способность ассоциатов высокомолекулярных ОЭГ обусловлена способностью взаимодействия их неполярных сегментов с неполярными участками поверхности биомембран. В качестве одного из механизмов экспериментально установленного факта снижения цитотоксичности комбинированных криозащитных сред названа перестройка структуры молекулярных ассоциатов в водных растворах смесей низко- и высокомолекулярных криопротекторов.

**Ключевые слова:** глицерин, оксиэтильные производные, диметилацетамид, криопротекторы, смеси, мембранотропность, 4'-диметиламинофлавонол, флуоресценция

Проблема створення нових, більш ефективних кріозахисних середовищ для низькотемпературного консервування біологічних об'єктів залишається однією з найважливіших і актуальних у структурі досліджень сучасної кріобіології. Як свідчать експериментальні дані, отримані в останні роки, перспективним напрямком є створення ефективних кріоконсервантів шляхом використання комбінацій кріопротекторів у кріозахисних середовищах і дослідження механізмів їх дії [3, 6, 11, 19, 22] (3, 12, 16, 17, 21). Метою такого підходу є отримання кріозахисних середовищ з покращеними властивостями, і, перш за все, зі зниженою цитотоксичністю [9, 17] (1, 10), проявом якої на рівні біомембран є, зокрема, зменшення мембранотропності. Під терміном «мембранотропність» в нашій роботі ми розуміємо спричинену зовнішнім агентом будь-яку (пряму або непряму) модифікацію мембранних структур, яка призвела до порушення початкових властивостей мембран (структури ліпідного бішару, конформації мембранних білків та ліпідів, гідратації, транспорту речовин, тощо). Так, виявлена висока кріозахисна ефективність оксигетильних похідних гліцерину обумовлює можливість застосування цих сполук в якості непроникаючих кріопротекторів при розробці нових методів кріоконсервування еритроцитів людини, які не потребують відмивки перед трансфузією [5, 6] (20, 21). При цьому, на етапі попереднього тестування сумішей кріопротекторів на їх потенційну цитотоксичність плідним є підхід, розроблений нами в роботах [1, 8] (4, 11). Цей підхід ґрунтується на аналізі флуоресцентного сигналу зонда, що знаходиться в водному розчині КП і завдяки особливостям своєї хімічної будови, є чутливим індикатором мембранотропності КП.

У роботі за допомогою флуоресцентного зонда було досліджено вплив ГЛ і його оксигетильних похідних (ОЕГ) окремо і в суміші з диметилацетамідом на мембранотропну здатність кріопротекторного розчину.

У якості флуоресцентного зонда був використаний 4'-диметиламінофлавонол (ДМАФ). Диметиламінофлавонол належить до класу

флуорофорів, для яких спостерігається внутрішньомолекулярне фотоперенесення протону (*англ.* excited state intramolecular proton transfer, ESIPТ). Результатом ESIPТ є утворення в збудженому стані таутомерної форми  $T^*$ , яка дає окрему смугу в спектрі флуоресценції, зміщену батохромно відносно положення смуги початкової форми  $N^*$ . Різниця в будові та у взаємодії з молекулами оточення цих таутомерних форм створює різницю в їх спектральних властивостях і цим уможлиблює за змінами у спектрах флуоресценції відслідковувати полярність середовища, а також його протонодонорні та протонакцепторні властивості. У спектрах флуоресценції вплив середовища віддзеркалюється у вигляді змін інтенсивності і загального або взаємного розташування максимумів смуг емісії [20] (13). У полярних розчинниках з високою нуклеофільністю або протонодонорністю, наприклад, у нижчих спиртах чи воді,  $T^*$ -форма може утворюватись у мінімальних кількостях, і флуоресценція буде візуально односмуговою, проте з характерним положенням максимуму у кожному випадку [13] (6). Такі спектральні властивості ДМАФ, а також доволі висока ліпофільність обумовили його використання в якості ратіометричного зонда для вивчення приповерхневої області ліпідних мембран, як це було показано у дослідженнях фазових переходів мембран різного складу з допомогою ДМАФ [11] (3). Цю властивість ДМАФ було використано також при аналізі міцелярних структур [5] (20), та для оцінки стану ліпідного бішару [20] (13).

Наведені вище спектральні властивості ДМАФ, що дозволяють відслідковувати зміну полярності, фазові переходи або зміну структури розчинів, пов'язані, в першу чергу, зі змінами складу сольватної оболонки молекул зонду. Так, у сумішах більш гідрофобних речовин з водою ДМАФ буде мати змішану сольватну оболонку, в якій можна буде відслідковувати зміну кількості молекул води за зміною положення двох смуг емісії або відношення їх інтенсивностей [5] (20).

Таким чином, зміни в спектрах емісії ДМАФ є відповіддю на зміни у хімічному складі сольватної оболонки молекул зонда, склад якої в свою

чергу залежить від сумарної енергії взаємодій (специфічного і неспецифічного типів) кожної молекули оточення із зондом. Ці спектральні зміни можуть бути використані не лише для детектування фазових переходів чи для аналізу складу сумішей органічних реагентів у воді, а також для оцінки гідрофобних властивостей останніх. Флуоресцентний зонд ДМАФ дозволяє за змінами його спектральних характеристик у присутності потенційного КП, зробити попередні висновки про цитотоксичність КП на мембранному рівні (мембранотропність) і ефективність його захисної дії.

### Матеріали і методи

У роботі використовували оксиетильні похідні (ОЕГ) гліцерину (ГЛ) зі ступенем полімеризації ( $n$ ) 3, 25 і 30 (ОЕГ <sub>$n=3$</sub> , ОЕГ <sub>$n=25$</sub>  і ОЕГ <sub>$n=30$</sub> , – відповідно), синтезовані у м. Івано-Франківську на фірмі «Барва» за розробленим у ІПКіК НАНУ методом [3] (16). ГЛ і диметилацетамід (ДМАЦ) («Sigma», США).

Суміші КП (ДМАЦ : ГЛ, ДМАЦ : ОЕГ <sub>$n=3$</sub> , ДМАЦ : ОЕГ <sub>$n=25$</sub>  і ДМАЦ : ОЕГ <sub>$n=30$</sub> ) готували на двічі дистильованій воді (рН 7,2) у ваговому співвідношенні 1:1. Концентрацію кріопротекторів виражали у масових процентах (мас.%).

Зонд ДМАФ (3-гідрокси-4`-(N,N-диметиламіно)флавіон) синтезували у Київському Національному університеті ім. Т.Г.Шевченка за методом [19] (11) і використовували у вигляді спиртового розчину. Кінцева концентрація зонда в зразках становила  $1,7 \times 10^{-6}$  М.

Спектри флуоресценції реєстрували за кімнатної температури (20 °С) у кварцевих кюветах 1x1x3 см на спектрофлуориметрі («Varian Cary Eclipse», США) з автоматичною корекцією. Ширини вхідної та вихідної щілин монохроматора становили 5 нм. Флуоресценцію ДМАФ збуджували світлом з довжиною хвилі 405 нм. Оптична щільність зразків не перевищувала 0,05–0,1 од. на довжині хвилі збудження флуоресценції.

Для уточнення положення смуг, які не мали вираженого максимуму, виконували деконволюцію спектрів флуоресценції ДМАФ за програмою «*Siano*» (автор – д-р хім. наук А.О.Дорошенко, кафедра органічної хімії ХНУ ім. В.Н. Каразіна) [23] (14). Кожен експеримент повторювали 5 разів ( $n=5$ ). Дані наведені як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка. Спектри кожного зразка реєстрували тричі і для аналізу використовували середні значення. Аналіз спектрів і статистичну обробку результатів проводили в програмі «Microcal Origin 8.0».

### Результати і обговорення

Аналіз впливу кріопротекторів на флуоресценцію зонда ДМАФ показав, що усі вони змінюють інтенсивність ( $I_{max}$ ), положення ( $\lambda_{max}$ ) і форму спектрів (табл. 1).

Як видно з табл. 1, «гідрофільний» ГЛ (коефіцієнт розподілу *n*-октанол-вода  $K_p$  становить 0,005) у порівнянні з іншими КП, найменше впливає на параметри флуоресценції ДМАФ. В досліджених концентраціях він практично не змінює форму і положення спектру, лише дещо підвищує його інтенсивність.

Навпаки, ДМАЦ, один із найбільш «гідрофобних» кріопротекторів ( $K_p$  *n*-октанол-вода дорівнює 0,233), суттєво впливає на положення і інтенсивність спектру ДМАФ, приводячи до зростання інтенсивності флуоресценції у 3,4 рази і зсуву максимуму смуги у короткохвильовий бік на 7 нм. ДМАФ є порівняно невеликою молекулою ( $M = 281,3$  г/моль), яка добре моделює ліпофільність та міжмолекулярні взаємодії на зовнішній поверхні ліпідної мембрани (моделює усі типи неспецифічних взаємодій та водневі зв'язки). Агрегація кріопротекторів з ДМАФ у водних розчинах буде свідчити про їх агрегацію з поверхнею ліпідних мембран, оскільки у випадку мембран збільшується кількість точок міжмолекулярних взаємодій специфічної і неспецифічної природи з кріопротектором, а значить збільшується енергія їх взаємодії.

Цікаво, що у присутності 5 % ОЕГ<sub>n=3</sub> інтенсивність спектра флуоресценції ДМАФ зростає у 3,9 разів без суттєвої зміни його положення і форми. Збільшення інтенсивності пов'язане зі зростанням в'язкості оточення зонда. При цьому зменшення кількості молекул води в оточенні не є значним, бо в такому разі максимум флуоресценції зміщувався б у короткохвильовий бік внаслідок падіння полярності оточення [24, 25] (24, 25).

У присутності 5 % ОЕГ<sub>n=25</sub> інтенсивність спектру флуоресценції ДМАФ зростає майже 7 разів, а положення максимуму зсувається у короткохвильовий бік на 13 нм без суттєвих змін форми спектра. Такий зсув свідчить про значне зменшення полярності середовища внаслідок зменшення кількості молекул води у сольватній оболонці зонду.

Деконволюція спектрів флуоресценції зонда в розчинах ОЕГ<sub>n=3</sub> і ОЕГ<sub>n=25</sub> показала, що в їх 5 % водних розчинах присутня короткохвильова складова флуоресценції ДМАФ, але її внесок невеликий (не більше 3–5 %) і суттєво не впливає на форму спектрів. В той же час, у присутності 5 % ОЕГ<sub>n=30</sub> поряд із 20-разовим зростанням інтенсивності і зсувом максимуму спектра на 4 нм у короткохвильовий бік, помітно змінюється і його форма (з'являється плече при 509 нм). Все це є результатом наявності значної кількості молекул ОЕГ у сольватній оболонці зонда. Плече свідчить про зростання флуоресценції нормальної форми зонду у малополярному оточенні. Подібні спектральні зміни можуть свідчити про те, що в присутності ОЕГ у водному розчині утворюються асоціати молекул КП, внутрішні області яких містять невеликі кількості води. Ці асоціати захоплюють у свої внутрішні області молекули ДМАФ.

Отже, незважаючи на те, що у спектрах ДМАФ у малополярних розчинниках добре виражені обидві смуги емісії [12, 16] (5, 9), у воді і водних розчинах низькомолекулярних КП фотоперенесення протону (ESIPT) переважно блокується водою, і спектр стає односмуговим, що свідчить про високу концентрацію молекул води в оточенні зонда. Однак, кількість води зменшується у випадку більш високомолекулярного ОЕГ<sub>n=30</sub>. Значення  $K_p$  в

системі *n*-октанол-вода для  $\text{OEG}_{n=30}$  наближається до нуля [3] (17), цю речовину слід віднести до таких, які однаково добре сольватуються і водою, і октанолом, що є можливим лише при утворенні міцних сольватів з цими розчинниками. Враховуючи велику молекулярну масу та будову молекули  $\text{OEG}_{n=30}$  слід допустити, що його сольвати мають міцелярну природу. А отримані результати спектральної поведінки зонду ДМАФ підтверджують утворення надмолекулярних структур молекулами  $\text{OEG}_{n=30}$ , найпростішими з яких є міцели з високим рівнем гідратації. Така міцела має достатній розмір, щоб захопити молекулу ДМАФ. Потрапляючи в середину міцели, ДМАФ дає смугу флуоресценції з максимумом 509 нм.

Нами було досліджено концентраційні залежності впливу ГЛ і ОЕГ зі ступенем полімеризації (*n*) 3, 25 і 30 на спектральні характеристики зонду ДМАФ у водному розчині окремо і в присутності ДМАЦ. Зміни у положенні максимуму флуоресценції при додаванні КП від їх концентрації наведені на рис. 1.

Як можна бачити з рис. 1, а, зростання вмісту ГЛ у водному розчині до 25% призводить до зниження інтенсивності ( $I_{\text{max}}$ ) флуоресценції ДМАФ, яке супроводжується короткохвильовим зсувом максимуму спектра ( $\lambda_{\text{max}}$ ) на  $1,5 \pm 0,5$  нм. Це може бути пояснено втягненням молекул ДМАФ в водно-гліцеринові асоціати, які присутні в розчині. Дещо більший короткохвильовий зсув (на  $3,5 \pm 0,5$  нм) спектрів флуоресценції зонда спостерігається при вмісті ГЛ в розчині понад 25%. Він може вказувати на перебудову структури водно-гліцеринових асоціатів у мікрооточенні молекул зонда.

В присутності амідю ДМАЦ (рис. 1, б), який має більш виражені гідрофобні властивості ( $K_p = 0,233$ ), спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції зонда ДМАФ в усьому діапазоні концентрацій, які були досліджені (до 45%), при одночасному зсуві  $\lambda_{\text{max}}$  у короткохвильовий бік на 11 нм. Це свідчить про взаємодію КП з ДМАФ, яка супроводжується

утворенням навкруги молекул зонда сольватної оболонки, що складається з молекул ДМАЦ і води.

У суміші ГЛ : ДМАЦ (рис. 1, в), зміни спектральних параметрів зонда ( $I_{max}$  і  $\lambda_{max}$ ) дещо менші, ніж для розчинів чистого ДМАЦ. Наприклад, зсув положення максимуму спектрів ДМАФ  $I_{max}$  є на 2-4 нм меншим. Таке зменшення є доказом того, що присутність молекул ГЛ в суміші ГЛ : ДМАЦ знижує здатність ДМАЦ до сольватації зонду. Таке зниження свідчить про зменшення мембранотропності ДМАЦ у присутності гліцерину.

На рис. 1, г і 1, д, наведено зміни параметрів флуоресценції ДМАФ  $I_{max}$  і  $\lambda_{max}$  у присутності ОЕГ<sub>n=3</sub> і його суміші з ДМАЦ.

Як видно з рис. 1, г, підвищення концентрації ОЕГ<sub>n=3</sub> у водному розчині до 4,8% призводить до різкого зростання інтенсивності флуоресценції ДМАФ, яке уповільнюється при більших концентраціях ОЕГ<sub>n=3</sub>. Положення максимуму спектрів флуоресценції ДМАФ при цьому має різну направленість: при вмісті ОЕГ<sub>n=3</sub> в розчині до 4,8% параметр  $\lambda_{max}$  зсувається у довгохвильовий бік на  $8 \pm 0,5$  нм, а при збільшенні вмісту ОЕГ<sub>n=3</sub> з 4,8 до 30% відбувається зсув  $\lambda_{max}$  у короткохвильовий бік на  $5 \pm 0,5$  нм.

Присутність ДМАЦ впливає на характер спектральних змін ОЕГ<sub>n=3</sub> в усьому діапазоні концентрацій, які було досліджено (рис. 1, д), що віддзеркалюється у збільшенні загального короткохвильового зсуву спектрів і прискоренні зростання їх інтенсивності у порівнянні з монорозчинами ОЕГ<sub>n=3</sub>.

Ці результати вказують на складний концентраційно-залежний характер взаємодії компонентів в системі ОЕГ<sub>n=3</sub>:ДМАЦ. Зростання інтенсивності флуоресценції зонда без змін форми спектру як правило пов'язують зі збільшенням в'язкості його мікрооточення [24, 25] (24, 25). Такий ефект може спричинятись за рахунок оточення зонда великорозмірними агрегатами ліпофільних молекул. При цьому молекули води вилучаються з його гідратної оболонки. Оскільки оксиетильовані похідні ГЛ є гідрофільними молекулами ( $K_p$  ОЕГ перебуває в межах  $0 \div 0,03$ )

[3] (17), ця причина зростання параметру  $I_{max}$  є результатом агрегації ОЕГ з ДМАЦ і наступним проникненням зонду в цей агрегат, де він сольватується переважно більш ліпофільним компонентом – ДМАЦ. Тобто, можна припустити, що ОЕГ<sub>n=3</sub> (маючи невелику ліпофільність), вже при концентрації 4,8% може ефективно взаємодіяти з поверхнею біомембран, заміщуючи там молекули води. При більш високих концентраціях КП цей процес інтенсифікується.

Як можна переконатися з [рис. 1, є і 1, ж](#), присутність ДМАЦ подібним же чином впливає на спектри зонда в розчинах ОЕГ<sub>n=25</sub>, зменшуючи довгохвильовий зсув максимуму флуоресценції. Проте, на відміну від ОЕГ<sub>n=3</sub>, в розчинах ОЕГ<sub>n=25</sub> при низьких концентраціях кріопротекторів у суміші (до 5%) має місце кооперативний ефект – в присутності ДМАЦ відбувається суттєве зростання інтенсивності флуоресценції у порівнянні з монорозчинами ОЕГ<sub>n=25</sub>. Це свідчить про агрегацію ОЕГ з ДМАЦ і наступну сольватацію зонда в агрегаті переважно більш ліпофільним компонентом – ДМАЦ, зі значним зменшенням вмісту води в сольватній оболонці зонду. Вочевидь, ДМАЦ ініціює перебудову гідратної оболонки молекул ОЕГ<sub>n=25</sub>. Слід зазначити при цьому, що поєднання у кріозахисному середовищі ОЕГ<sub>n=25</sub> і ДМАЦ сприяє значному підвищенню осмотичної стійкості кріоконсервованих еритроцитів [\[6\] \(21\)](#).

Відома здатність ОЕГ до міцелоутворення [\[7, 8\] \(4, 22\)](#). При цьому зростання ступеня полімеризації  $n$  від 5 до 25 веде до росту критичної концентрації міцелоутворення (ККМ), яка для ОЕГ<sub>n=25</sub> становить 2,5%. Такі зміни пов'язують із підвищенням впливу гідрофільної частини в молекулі ОЕГ<sub>n=25</sub> [\[8\] \(4\)](#). Додавання ДМАЦ веде до зменшення величини ККМ [\[8, 18\] \(4, 12\)](#). Зокрема, показано [\[8, 18\] \(4, 12\)](#), що при змішуванні ОЕГ<sub>n=25</sub> з ДМАЦ ККМ зменшується з 2,5 до 0,25%. Цей ефект вважають результатом утворення змішаних міцел [\[8, 18\] \(4, 12\)](#).

В той же час, як можна бачити з [рис. 2, крива 1](#), при вмісті ОЕГ<sub>n=30</sub> у розчині більш ніж 1%, спостерігається злам на кривій відношення

нормальної і таутомерної форм ДМАФ, який свідчить про різку зміну полярності мікрооточення зонду. Можна припустити, що за вище зазначеної концентрації відбувається перебудова асоціатив, які утворює  $\text{ОЕГ}_{n=30}$  у розчині. При цьому, присутність ДМАЦ практично не впливає на положення точки зламу (див. [рис. 2, крива 2](#)). Вочевидь, саме останнє спостереження пояснює більш низьку захисну ефективність  $\text{ОЕГ}_{n=30}$  при кріоконсервуванні клітин крові у порівнянні з  $\text{ОЕГ}_{n=25}$  [\[2, 6, 7\]](#) [\(16, 22, 23\)](#). Воно вказує на те, що більш стабільні міцелярні структури  $\text{ОЕГ}_{n=30}$  гірше зв'язуються з ліпідною мембраною у порівнянні з  $\text{ОЕГ}_{n=25}$ . На більшу стабільність міцелярних структур  $\text{ОЕГ}_{n=30}$  також вказує подібність кривої  $\text{ОЕГ}_{n=25}$ –ДМАЦ ([рис. 1, ж](#)) з кривими для  $\text{ОЕГ}_{n=30}$  ([рис. 2, а, б](#)) без та в присутності ДМАЦ. Оскільки міцелоутворення розчинів  $\text{ОЕГ}_{n=25}$  вже є вивченим [\[8, 18\]](#) [\(4, 12\)](#), таке порівняння додатково підтверджує сам факт міцелоутворення для водних розчинів  $\text{ОЕГ}_{n=30}$ .

Таким чином, усі оксигетильні похідні ГЛ, які було досліджено, у більшій мірі, ніж початкова сполука (ГЛ), впливають на спектральні параметри зонда ДМАФ, що відображається у зростанні інтенсивності, зміні положення максимуму та форми спектру останнього. В розчинах  $\text{ОЕГ}_{n=30}$ , поряд із зростанням більш ніж на порядок інтенсивності флуоресценції зонда, відбувається також зміна форми спектру (див. [табл. 1](#)), який стає двосмуговим. Всі ці зміни свідчать як про збільшення в'язкості, так і про зневоднення середовища в оточенні зонду. Присутність ДМАЦ у розчині посилює спектральні ефекти збільшення в'язкості та зневоднення середовища в оточенні зонда, на підставі чого можна стверджувати про утворення спільних агрегатів  $\text{ОЕГ}$  та ДМАЦ. Як і інші типи поліетиленгліколів,  $\text{ОЕГ}$  у присутності ліпідних біомембран агрегує з їх поверхнею, витісняючи звідти значну кількість молекул води [\[15\]](#) [\(8\)](#). Високомолекулярні  $\text{ОЕГ}$  мають вищу енергію агрегації з мембранами внаслідок збільшення точок міжмолекулярних взаємодій специфічної і неспецифічної природи.

### Висновки

Методом флуоресцентного зондування встановлено, що комбінація ГЛ і його оксиетильних похідних з ДМАЦ знижує потенційні мембранотропні властивості окремих кріопротекторів, що входять до складу суміші. Так, комбінація ГЛ, як і його низькомолекулярного похідного ОЕГ<sub>n=3</sub> з ДМАЦ знижує потенційні мембранотропні властивості ДМАЦ. В той же час, комбінація високомолекулярних похідних (ОЕГ<sub>n=25</sub> і ОЕГ<sub>n=30</sub>) з ДМАЦ знижує потенційні мембранотропні властивості ОЕГ (або їх здатність до неполярної взаємодії з мембранами). Встановлено, що ОЕГ<sub>n=30</sub> при концентраціях вище 1 мас.% утворює у водному розчині структури міцелярного типу або міцелярні агрегати. Цей факт дозволяє припустити, що мембранотропна здатність асоціатів високомолекулярних ОЕГ обумовлена можливістю взаємодії їх сегментів з поверхневою і приповерхневою зонами біомембран.

Таким чином, перебудова структури молекулярних асоціатів у розчинах сумішей низько- і високомолекулярних кріопротекторів може розглядатись у якості одного з механізмів експериментально встановленого зниження цитотоксичності комбінованих кріозахисних середовищ.

## Литература

1. Грищенко ВІ, Дюбко ТС, Пивоваренко ВГ, Ліннік ТП, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора. Патент України №13838. 17.04.2006.
2. Компанієць АМ, Ніколенко ОВ, Чеканова ВВ, та ін. Кріозахисна ефективність середовищ на основі оксиетильних похідних поліолів при заморожуванні еритроцитів людини. Проблеми кріобіології. 2008; 18(3): 299-301.
3. Компаниец АМ, Чеканова ВВ, Николенко АВ, и др. Синтез, физико-химические свойства оксиэтильных производных глицерина. Криозащитные среды на основе комбинаций криопротекторов для замораживания биологических объектов. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков: ИПКиК НАНУ; 2012. С. 26–73.
4. Пахомова ЮС, Чеканова ВВ, Компаниец АМ. Криозащитные свойства растворов на основе непроникающего ОЭГ $n=25$  в комбинации с проникающими криопротекторами при замораживании эритроцитов человека. Проблеми криобиологии и криомедицины. 2013; 23(1): 26-39.
5. Пахомова ЮС, Кулешова ЛГ, Компаниец АМ. Трансформация эритроцитов на этапах криоконсервирования в криозащитных средах на основе оксиэтилированных производных глицерина со степенью полимеризации  $n=25$  и  $n=30$ . Проблеми криобиологии и криомедицины. 2016; 26(4): 349-60.
6. Рошаль АД, Дюбко ТС, Линник ТП. 4'-диметиламинофлавонол – новый флуоресцентный зонд для оценки криопротекторных свойств органических веществ в водных растворах. Биофизический вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. 2005; 2(16): 106-11.
7. Русанов АИ. Мицеллообразование в растворах ПАВ. Санкт-Петербург: Химия; 1992. 528 с.

8. Чеканова ВВ, Пахомова ЮС, Компаниец АМ. Мицеллообразование в растворах оксиэтилированных глицеринов и комбинированных средах на их основе. Вестник университета ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия «Химия». 2016; 26(49): 40-4.
9. Bakaltcheva IB, Odeyale CO, Spargo BJ (1996). Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1280: 73-80.
10. Bondar OP, Pivovarenko VG, Rowe ES. Flavonols – new fluorescent membrane probes for studying the interdigitation of lipid bilayers. *Biochim et Biophys Acta*. 1998; 1369(1): 119-30.
11. Chattoraj S, Chowdhury R, Ghosh S, Bhattacharyya K. Heterogeneity in binary mixtures of dimethyl sulfoxide and glycerol: fluorescence correlation spectroscopy. *J Chem Phys*. 2013; 138(21): 214507.
12. Demchenko AP, Ercelen S, Rochal AD, et al. Excited-state proton transfer reaction in a new benzofuryl 3-hydroxychromone derivative: the influence of low-polar solvents. *Polish J Chem*. 2002; 76(9): 1287-99.
13. Douhal A, Roshal AD, Organero JA. Stepwise interactions, sodium ion photoejection and proton-transfer inhibition in a crown-ether and proton-transfer dye. *Chem Phys Lett*. 2003; 381(3-4): 519-25.
14. Duportail G, Klymchenko A, Mely I, et al. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes. *FEBS Letters*. 2001; 508 (2): 196-00.
15. Dutheil D., Underhaug Gjerde A., Petit-Paris I., Mauco G., Holmsen H. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection? *J Chem Biol*. 2009, 2, 39–49.
- 16.. Ercelen S, Klymchenko AS, Demchenko AP. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities. *Anal Chim Acta* 2002; 464(2): 273-87.
17. Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*. 2010; 60(3): S545-S553.

18. Holmberg K. Surfactants and polymers in aqueous solutions. Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 2002. 545 p.
19. Indra S, Biswas R. How Heterogeneous Are Trehalose/Glycerol Cryoprotectant Mixtures? A Combined Time-Resolved Fluorescence and Computer Simulation Investigation. *J Phys Chem B*. 2016, 3; 120(43): 11214-28.
20. Klymchenko AS, Duportail G, Turan O et al. Novel Two-Band Ratiometric Fluorescence Probes with Different Location and Orientation in Phospholipid Membranes. *Chemistry & Biology*. 2002; 9(11): 1199-208.
21. Klymchenko AS, Mely Y, Demchenko AP, et al. Simultaneous probing of hydration and polarity of lipid bilayers with 3-hydroxyflavone fluorescent dyes. *BBA*. 2004; 1665(1-2): 6-19.
22. Mitrus I, Smagur A, Fidyk W et al. Reduction of DMSO concentration in cryopreservation mixture from 10% to 7.5% and 5% has no impact on engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation: results of a prospective, randomized study. *Bone Marrow Transplant*. 2018, 53(3):274-80.
23. McMorrow D, Kasha M. Proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone in anisole-site crystal matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984, 81(11): 3375-8.
24. Smith MA, Neumann RM, Webb RA. A modification of the Algar-Flynn-Oyamada preparation of flavonols. *J Heteroc Chem*. 1968; 5(3): 425-6.
25. Yushchenko DA, Shvadchak VV, Klymchenko AS, Duportail G, Pivovarenko VG, Mély Y. Modulation of excited-state intramolecular proton transfer by viscosity in protic media. *The J. Phys Chem. A* 2007; 111(42); 10435-38.

### References

1. Bakaltcheva IB, Odeyale CO, Spargo BJ (1996). Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1280: 73-80.
2. Bondar OP, Pivovarenko VG, Rowe ES. Flavonols - new fluorescent membrane probes for studying the interdigitation of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1369(1): 119-30.

3. Chatteraj S, Chowdhury R, Ghosh S, Bhattacharyya K. Heterogeneity in binary mixtures of dimethyl sulfoxide and glycerol: fluorescence correlation spectroscopy. *J Chem Phys.* 2013; 138(21): 214507.
4. Chekanova VV, Pakhomova YuS, Kompaniets AM. [Micelle formation in solutions of ethoxylated glycerols and combined media based on them]. *Bulletin of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Chemistry"* 2016; 26(49): 40-4. Russian
5. Demchenko AP, Ercelen S, Rochal AD, et al. Excited-state proton transfer reaction in a new benzofuryl 3-hydroxychromone derivative: the influence of low-polar solvents. *Polish J Chem.* 2002; 76(9): 1287-99.
6. Douhal A, Roshal AD, Organero JA. Stepwise interactions, sodium ion photoejection and proton-transfer inhibition in a crown-ether and proton-transfer dye. *Chem Phys Lett* 2003; 381(3-4): 519-25.
7. Duportail G, Klymchenko A, Mely I, et al. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes. *FEBS Letters.* 2001; 508 (2): 196-00.
8. Dutheil D., Underhaug Gjerde A., Petit-Paris I., Mauco G., Holmsen H. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection? *J Chem Biol.* 2009, 2, 39–49.
9. Ercelen S, Klymchenko AS, Demchenko AP. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities. *Anal Chim Acta* 2002; 464(2): 273-87.
10. Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* 2010; 60(3): S45-S53.
11. Grischenko VI, Dyubko TS, Pivovarenko VG, Linnik TP, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS Ukraine, assignee. [Method for determining membranotropic activity]. Patent № 13838. 2006 Apr 17. Ukrainian.
12. Holmberg K. Surfactants and polymers in aqueous solutions. Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 2002.

13. Indra S, Biswas R. How Heterogeneous Are Trehalose/Glycerol Cryoprotectant Mixtures? A Combined Time-Resolved Fluorescence and Computer Simulation Investigation. *J Phys Chem B*. 2016, 3;120(43):11214-28.
14. Klymchenko AS, Duportail G, Turan O, Pivovarenko VG, Mély Y, Demchenko AP. Novel Two-Band Ratiometric Fluorescence Probes with Different Location and Orientation in Phospholipid Membranes. *Chemistry & Biology*. 2002; 9(11): 1199-208.
15. Klymchenko AS, Mely Y, Demchenko AP, et al. Simultaneous probing of hydration and polarity of lipid bilayers with 3-hydroxyflavone fluorescent dyes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1665(1-2): 6-19.
16. Kompaniets AM, Nikolenko OV, Chekanova VV et al. Cryoprotective efficiency of media based on oxyethyl derivatives of polyols during freezing of human erythrocytes, *Probl Cryobiol* 2008; 18(3): 299-301.
17. Kompaniets AM, Chekanova VV, Nikolenko AV et al. Synthesis, physicochemical properties of hydroxyethyl glycerol derivatives. Cryoprotective environments based on combination of cryoprotectants for freezing biological objects. In: Goltsev AN, ed. *Actual problems of cryobiology and cryomedicine*. Kharkiv: IPC&C NASU; 2012. P. 26-73. Russian
18. Mitrus I, Smagur A, Fidyk W et al. Reduction of DMSO concentration in cryopreservation mixture from 10% to 7.5% and 5% has no impact on engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation: results of a prospective, randomized study. *Bone Marrow Transplant*. 2018, 53(3):274-80.
19. McMorro D, Kasha M. Proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone in an isolated-site crystal matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(11): 3375-8.
20. Pakhomova YuS, Chekanova VV, Kompaniets AM. Cryoprotective properties of solutions based on non-penetrative OEG<sub>n=25</sub> combined with penetrating cryoprotectants during freezing of human erythrocytes. *Probl Cryobiol Cryomed* 2013; 23(1): 26-39.
21. Pakhomova YuS, Kompaniets AM, Kuleshova LG. Transformation of erythrocytes during cryopreservation with oxyethylated glycerol derivation with

$n=25$  and  $n=30$  polymerization degree. Probl Cryobiol Cryomed 2016; 24(4): 349-60.

22. Roshal AD, Dyubko TS, Linnik TP. 4'-dimethylaminoflavanol – a new fluorescent probe to evaluate the cryoprotective properties of organic substances in aqueous solutions. Biophysical Bulletin of V.N. Karazin Kharkiv National University. 2005; 2(16): 106-11. Russian

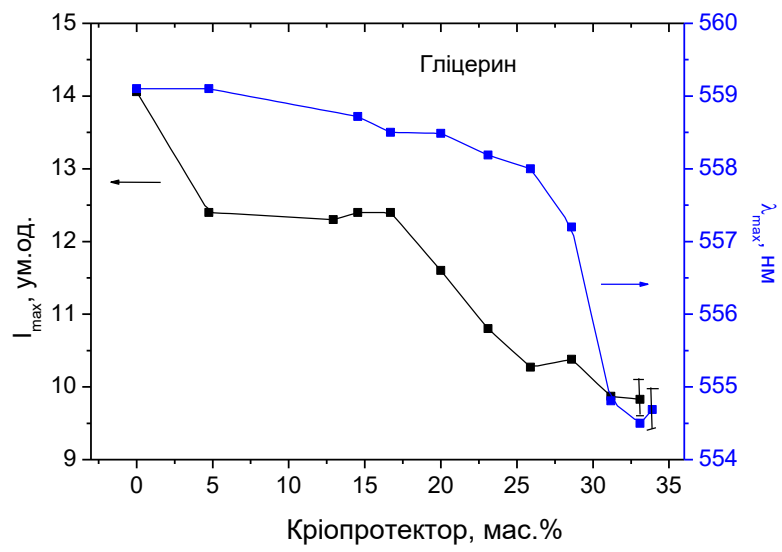
23. Rusanov AI. [Micelle formation in surfactant solutions]. St.-Petersburg: Khimia; 1992. 528 p. Russian

24. Smith MA, Neumann RM, Webb RA. A modification of the Algar-Flynn-Oyamada preparation of flavonols. J Heteroc Chem 1968; 5(3): 425-6.

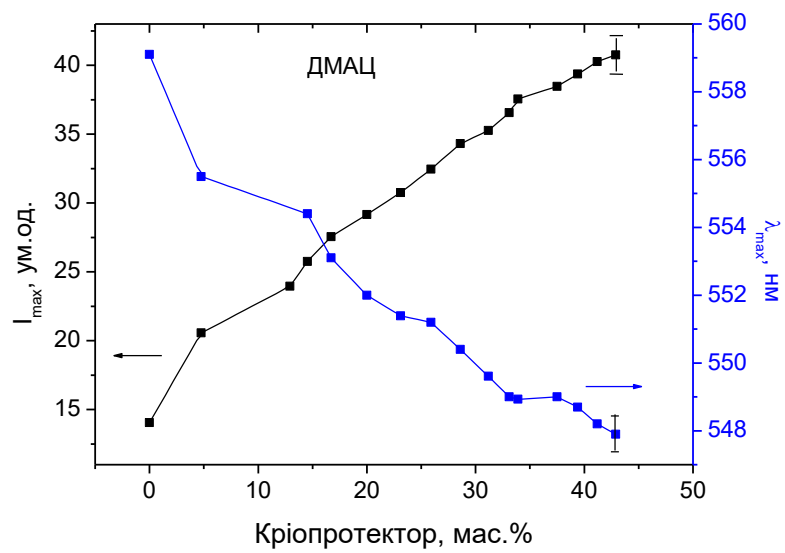
25. Yushchenko DA, Shvadchak VV, Klymchenko AS, Duportail G, Pivovarenko VG, Mély Y. Modulation of excited-state intramolecular proton transfer by viscosity in protic media. The J. Phys Chem. A2007; 111(42); 10435-38.

Параметри спектрів флуоресценції зонда ДМАФ  
у водних розчинах кріопротекторів

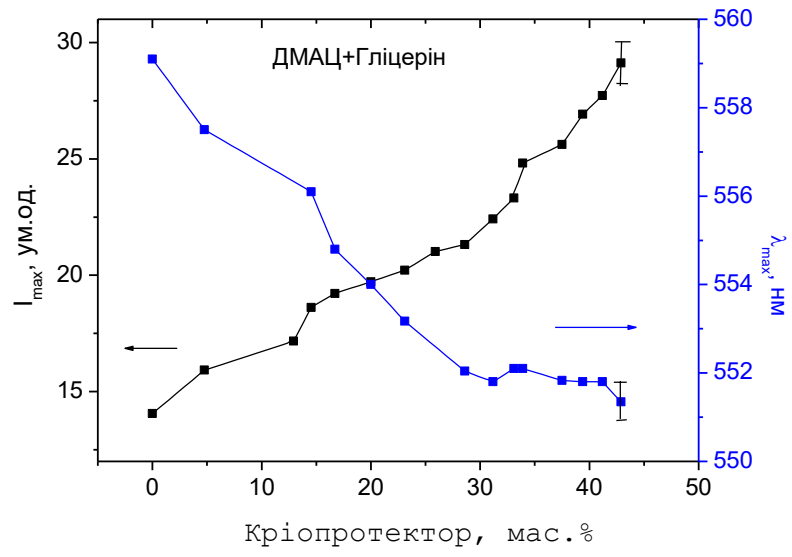
| Середовище                | $I_{max}$ , ум.од.     | $\lambda_{max}$ , нм |
|---------------------------|------------------------|----------------------|
| Вода дистильована, рН 7,2 | 10±1                   | 559±0,5              |
| + 5 % ГЛ                  | 12±1                   | 559±0,5              |
| +5 % ДМАЦ                 | 34±2                   | 552±0,5              |
| +5 % ОЕГ <sub>n=3</sub>   | 39±2                   | 558±0,5              |
| +5 % ОЕГ <sub>n=25</sub>  | 69±1                   | 546±0,5              |
| +5 % ОЕГ <sub>n=30</sub>  | 132±3 (плече)<br>202±5 | 509±2,0<br>554±0,5   |



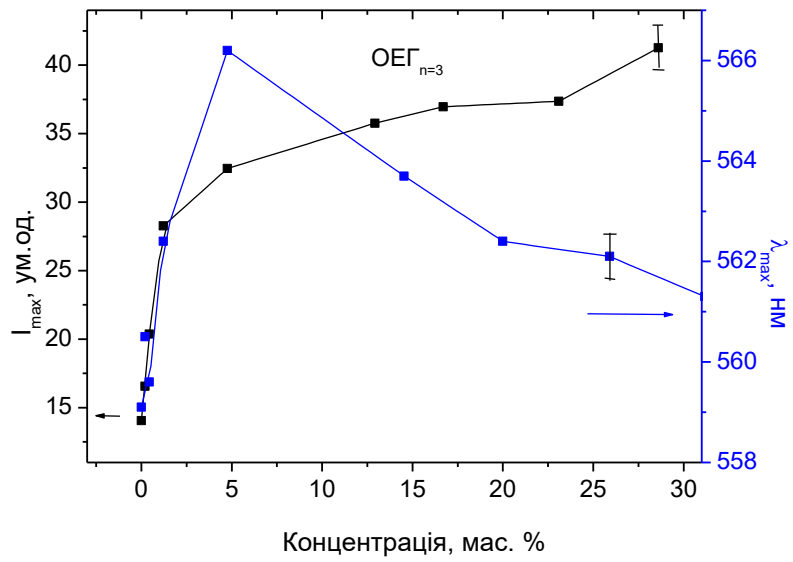
а)



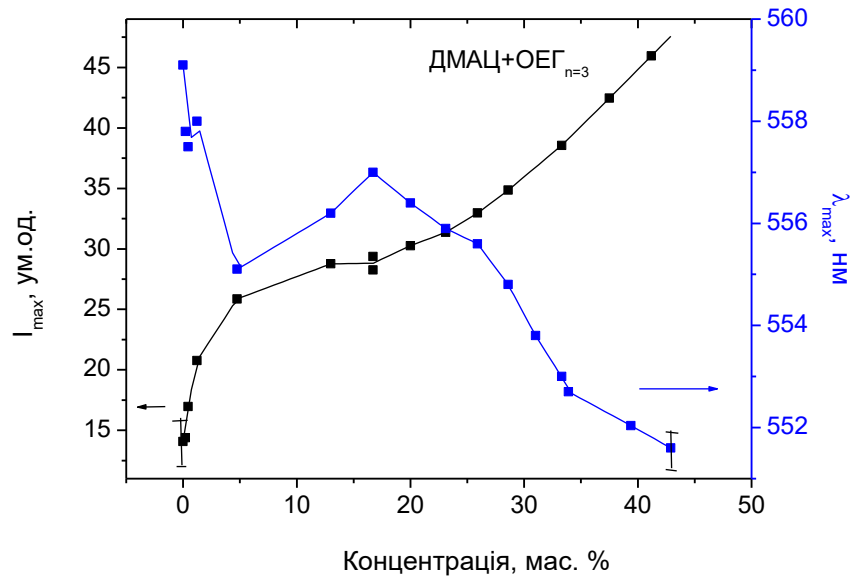
б)



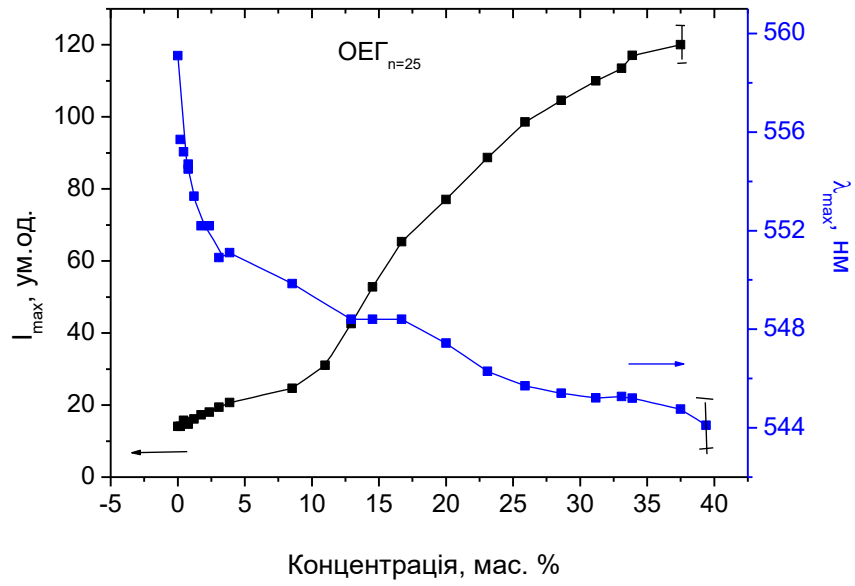
В)



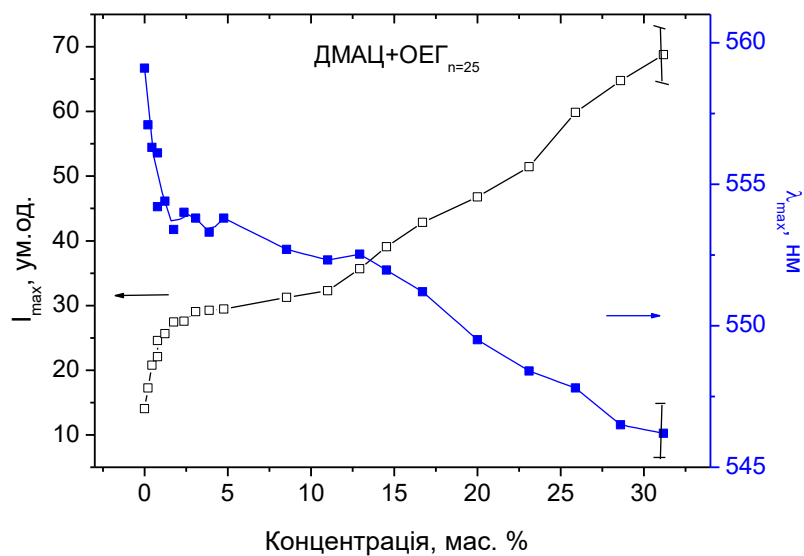
Г)



Д)



є)



ж)

Рис. 1 Вплив кріопротекторів та їх сумішей (1:1, мас. %) на інтенсивність ( $I_{\max}$ ) і положення максимуму ( $\lambda_{\max}$ ) спектрів флуоресценції зонда ДМАФ у водному розчині, рН 7,2: а) гліцерин; б) ДМАЦ; в) ДМАЦ+гліцерин; г) ОЕГ<sub>n=3</sub>; д) ДМАЦ+ ОЕГ<sub>n=3</sub>; е) ОЕГ<sub>n=25</sub>; ж) ДМАЦ+ ОЕГ<sub>n=25</sub>

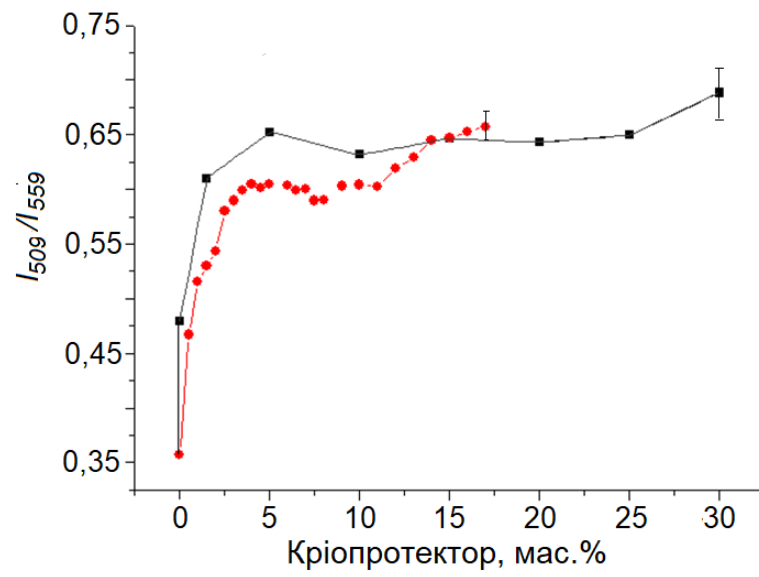


Рис. 2. Криві відношення інтенсивностей нормальної ( $I_{509}$ ) і таутомерної ( $I_{559}$ ) форм зонда ДМАФ у водному розчині ОЕГ<sub>n=30</sub> (■) і суміші (1 : 1) ДМАЦ : ОЕГ<sub>n=30</sub> (●).