

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 577.352.336: 57.043

**4'-ДИМЕТИЛАМИНОФЛАВОНОЛ – НОВЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ЗОНД
ДЛЯ ОЦЕНКИ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ОРГАНИЧЕСКИХ
ВЕЩЕСТВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ****А.Д. Рошаль¹, Т.С. Дюбко², Т.П. Линник²**¹НИИ химии Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина; пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина; alexandre.d.rochal@univer.kharkov.ua;²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23; Харьков, 61015; Украина; tdzubko@mail.ru

Поступила в редакцию 6 мая 2005 г.

Флуоресцентный зонд для детекции межфазовых переходов – 4'-диметиламинофлавонол (ДМАФ), был использован для прогнозирования криопротекторных свойств органических растворителей. Показано, что гипсохромный сдвиг полосы испускания зонда и рост интенсивности его флуоресценции в присутствии изученных криопротекторов коррелируют с параметром их липофильности, а также их токсичностью на клеточном уровне. Выявлена взаимосвязь между концентрацией половинной сольватации, полученной в результате титрования водных растворов зонда криопротекторами, с их криозащитной активностью по отношению к сперматозоидам петухов. Предполагается, что механизм защитного действия ряда исследованных веществ основан на эффекте частичной пересольватации гидратной оболочки клеточной мембраны.

Результаты, полученные с использованием зонда, хорошо коррелируют с экспериментальными данными по криоконсервированию клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 4'-диметиламинофлавонол, флуоресценция, криопротекторы, липофильность

Использование криозащитных веществ (криопротекторов) позволяет ретрибировать методы долгосрочного хранения биологических объектов при низких температурах для целей медицины и биотехнологии [1, 2]. Криопротекторы (КП) являются основными компонентами криозащитных сред [3, 4], поэтому их удачный выбор и оптимальные условия применения во многом определяют исход процесса криоконсервирования. В то же время, оказывая положительный криозащитный эффект, выражающийся в ослаблении эффектов кристаллизации воды, снижении гиперконцентрации солей и т.п. [5], многие КП, особенно в высоких концентрациях, тем не менее, проявляют цитотоксичность. Причем, как экспериментально показано в работе [5] на примере амидов, цитотоксическое действие КП имеет преимущественно химическую природу и обусловлено гидрофобностью и высокой донорно-акцепторной способностью их молекул. В связи с этим актуальным является предварительное тестирование КП на их потенциальную цитотоксичность.

Поскольку изучение криопротекторных свойств различных органических соединений, применяемых в качестве КП, проводится эмпирически и является трудоемким процессом, требующим значительных интеллектуальных и финансовых затрат, разработка зондов, позволяющих произвести предварительную оценку криопротекторной активности веществ, дает возможность существенно упростить доэкспериментальный скрининг эффективных криозащитных агентов. В связи с этим в настоящей работе предпринята попытка определить возможности синтезированного недавно флуоресцентного зонда 4'-диметиламинофлавонола (ДМАФ) для оценки физико-химических свойств водных растворов криопротекторов, предположительно коррелирующих с их криозащитной активностью.

ДМАФ является одним из представителей класса флавоноидов с внутримолекулярным переносом протона в возбужденном состоянии (ESIPT). Результатом ESIPT является образование флорохромной формы (Т*), обладающей собственной флуоресценцией, а также кислотно-основными свойствами отличными от таковых у исходной формы (N*). Наличие двух разных по свойствам и структуре форм обуславливает различное их поведение в средах с отличающейся полярностью, кислотностью, нуклео- и электрофильностью, протонодонорными и протоноакцепторными свойствами. В спектрах флуоресценции зонда влияние среды проявляется в виде изменения интенсивности максимума испускания и изменения их взаимного расположения [6,7]. Такое спектральное поведение ДМАФ обуславливает использование его в качестве радиометрического зонда для определения полярности среды, например полярности верхних слоев клеточных мембран [8]. В протонодонорных растворителях высокой

4'-диметиламинофлавонол – новый флуоресцентный зонд ...

нуклеофильности и полярности, например в низших спиртах и воде, форма T^* может не образовываться, и флуоресценция будет однополосной.

К сожалению, испытания ДМАФ на биологических системах показывают, что аналитический сигнал такого зонда не обладает высокой селективностью, так как его реакция на взаимодействие со сложной системой (например, клеткой) носит, как правило, интегральный характер.

Тем не менее, очень многообещающим является использование ДМАФ в качестве индикатора фазового перехода. В этом случае при переходе между фазами, обладающими разным набором свойств – клеточная мембрана – вода, мицелла – растворитель, полярный – неполярный органические растворители происходит изменение флуоресценции зонда. Это свойство ДМАФ было использовано при анализе мицеллярных структур [9], для оценки площади поверхности митохондрий после криоконсервации [10].

Описанное выше спектральное поведение ДМАФ, возникающее при переходе между фазами, связано, в первую очередь, с изменением химического состава сольватной оболочки молекул зонда. Так, в смеси растворителей вода-ацетонитрил ДМАФ будет иметь сольватную оболочку, состоящую преимущественно из молекул ацетонитрила, ибо молекула зонда создает вокруг себя оболочку, состоящую из молекул более близких по полярности и липофильности, чем вода.

Таким образом, изменения в спектрах испускания ДМАФ являются ответом на изменения химического состава сольватной оболочки молекул зонда и могут быть использованы не только для детектирования межфазных переходов, но и для анализа состава смесей органических реагентов в воде, а также оценки липофильных свойств последних.

Для определения спектральной реакции ДМАФ на присутствие в воде липофильных компонентов нами были выбраны органические растворители, обычно используемые в качестве КП. Для исследований нами были взяты КП, имеющие разную полярность и липофильность – диметилсульфоксид (*I*), диметилформамид (*II*), этиленгликоль (*III*), монометиловый эфир этиленгликоля (*IV*), 1,2-пропандиол (*V*), глицерин (*VI*) и его 1-монометиловый эфир (*VII*). Поскольку известно, что криозащитные и, в первую очередь, цитотоксические свойства криопротекторов зависят от величины $lg P$ (логарифма коэффициента распределения в системе октанол–вода), которая характеризует их липофильность, мы попытались установить зависимость между параметром $lg P$ для каждого КП и спектральным поведением зонда. Нами также изучалось влияние параметров КП, описывающих электростатическую природу их молекул, на спектральные свойства ДМАФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Флуоресцентный зонд ДМАФ был синтезирован известным методом [11]. Чистота зонда проверялась хроматографически. Рабочий раствор зонда получали добавлением аликвоты 10 мкл 1 мМ спиртового раствора ДМАФ к 2 мл бидистиллированной воды. Конечная концентрация ДМАФ в образцах составляла 5×10^{-6} М.

В работе использовали 1,2-пропандиол (ПО «Химпром», Кемерово) марки «х.ч.», диметилсульфоксид, глицерин, диметилформамид марки «ч.д.а» («Реахим», Москва), этиленгликоль марки «х.ч.», («Merck», Австрия), а также монометиловый эфир глицерина (ММЭГ) и метиловый эфир этиленгликоля (МЭГ), которые были синтезированы в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины. Все растворы готовили на дважды дистиллированной воде, а КП перед использованием дополнительно очищали. Глицерин (ГЛ) и диметилформамид (ДМФ) очищали путем двукратной вакуумной перегонки [12], диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль (ЭГ) и 1,2-пропандиол (1,2-ПД) тем же способом, предварительно выдержав 24 часа над окисью алюминия или активированным углем марки «А» [13].

Водные растворы ДМАФ титровали растворами КП до максимальной концентрации последних ~ 5 моль/л. Изменения спектров испускания ДМАФ регистрировали при помощи флуориметра Hitachi F-4010 (Япония) в области 425-700 нм, используя длину волны возбуждения 405 нм.

Все измерения были выполнены в термостатируемом держателе образцов при 20 °С. Измеренные значения параметров спектров флуоресценции ДМАФ в растворах КП усредняли для каждого КП по 6-ти параллельным образцам.

Анализ спектральных кривых, расчет точек перегиба на кривых титрования, а также концентрации половинной сольватации $S_{1/2}$ проводили при помощи пакета программ Spectra Data Lab, разработанных в НИИ химии при ХНУ им. В.Н. Каразина [14]. Значения $lg P$ были рассчитаны при помощи пакета программ ACD Labs [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из рисунков 1А,Б, для спектров флуоресценции ДМАФ в воде характерно наличие только одной полосы испускания, соответствующей исходной форме N^* . Наличие однополосного спектра говорит о существовании прочных водородных связей между зондом и молекулами воды, приводящих к подавлению ESИPT.

Результаты титрования водного раствора зонда криопротекторами показали, что последние можно разделить на две группы, в зависимости от спектрального поведения ДМАФ. В случае соединений *I*, *II*, *IV*, *V*, *VII* наблюдается значительный, до 30 нм, гипсохромный сдвиг полосы испускания. При добавлении к водным растворам зонда этиленгликоля и глицерина, *III* и *VI*, сдвиг полосы испускания менее существенный и не превышает 10-20 нм. Спектральное поведение зонда в присутствии криопротекторов обеих групп представлено на рисунке 1.

Как следует из данных приведенных в табл. 1, в растворах криопротекторов, относящихся к первой группе, полоса флуоресценции зонда находится при 537-539 нм, в растворах этиленгликоля и глицерина – при 546 и 556 нм, соответственно.

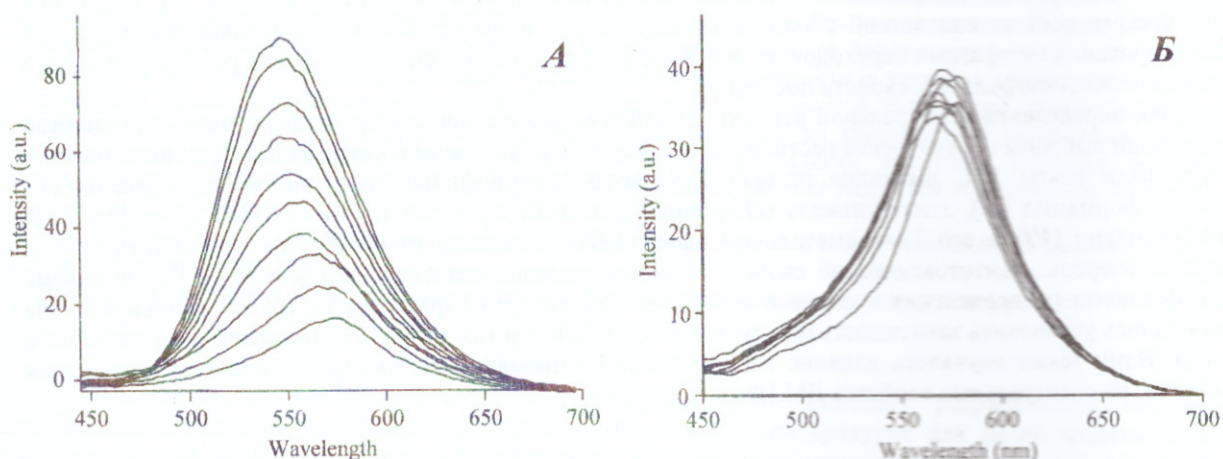


Рисунок 1. Изменение положения и интенсивности полос испускания зонда при добавлении пропандиола *V* (А) и глицерина *VI* (Б)

Таблица 1. Спектральные параметры ДМАФ в водных растворах криопротекторов*.

Криопротектор	$\lambda_{\text{фл}}$ (нм)	$\Delta\lambda_{\text{фл}}$ (нм)	$\Delta\nu_{\text{фл}}$ (см^{-1})	$\Gamma_{\text{КП}}$	$I_{\text{КП}}/I_{\text{вода}}$
вода	565	–	–	23,3**	–
<i>I</i>	539	26	855	35,2	10,00
<i>II</i>	538	27	890	51,9	11,88
<i>III</i>	546	19	620	27,0	3,08
<i>IV</i>	538	27	890	34,9	7,77
<i>V</i>	537	28	920	33,1	7,31
<i>VI</i>	556	9	290	26,2	1,55
<i>VII</i>	537	28	920	43,2	10,02

* $\lambda_{\text{фл}}$ – положение максимума полосы испускания зонда, $\Delta\lambda_{\text{фл}}$ и $\Delta\nu_{\text{фл}}$ – максимальный сдвиг полосы испускания при добавлении КП в водный раствор ДМАФ, выраженный в нм и в см^{-1} , соответственно; $\Gamma_{\text{КП}}$ – интенсивность полосы испускания в точке максимума при концентрации КП 1 моль/л, $I_{\text{КП}}/I_{\text{вода}}$ – отношение максимальной интенсивности флуоресценции ДМАФ в присутствии КП (вычислено экстраполяцией кривой титрования на область высоких концентраций КП) к интенсивности его флуоресценции в воде.

** – приведена интенсивность флуоресценции в воде без добавления КП.

Добавление КП первой группы вызывает максимальное увеличение интенсивности флуоресценции ($I_{\text{КП}}/I_{\text{вода}}$) в 7-12 раз, в то время как вещества *III* и *VI* приводят к менее существенным изменениям интенсивности полос испускания зонда – в 1,5–3 раза. Как видно из таблицы 1, интенсивность флуоресценции ДМАФ в 1 М растворах криопротекторов *III* и *VI* ненамного превышает интенсивность флуоресценции в чистой воде.

4'-диметиламинофлавонол – новый флуоресцентный зонд ...

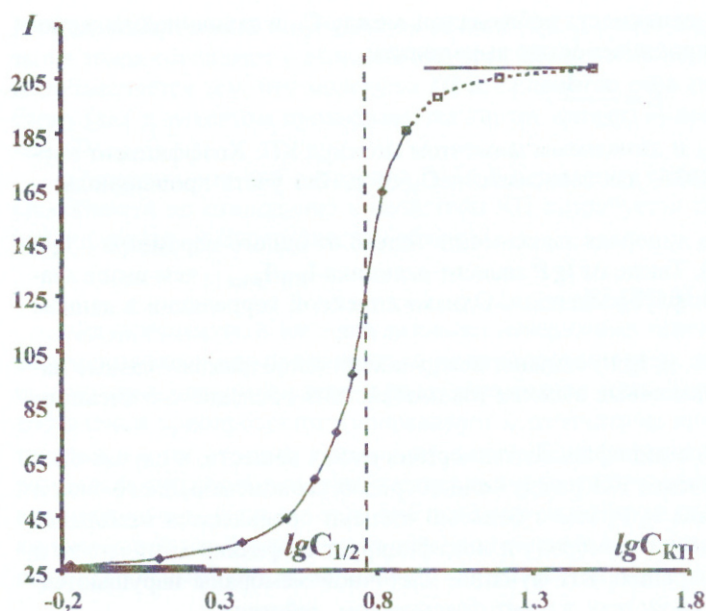


Рисунок 2. Кривая титрования водного раствора ДМАФ криопротектором VII. ■ – экспериментальные точки, □ – точки, экстраполированные программой SpectraDataLab на область максимальной интенсивности испускания. I – относительная интенсивность флуоресценции, $\lg C_{\text{КП}}$ – логарифм концентраций криопротектора в воде.

наполовину состоит из молекул КП. Рассчитанные величины логарифмов молярных концентраций половинной пересольватации приведены в таблице 2.

Таблица 2. Концентрации криопротекторов, необходимые для полной и частичной пересольватации ДМАФ*.

Криопротектор	μ	ϵ	E	$\lg P$	$\lg C_{1/2}$
I	3,90	46,7	0,484	-1.35 ± 0.28	0.914
II	3,86	36,7	0,480	-1.01 ± 0.28	0.989
III	2,28	37,7	0,480	-1.69 ± 0.21	-
IV	2,04	16,0	0,455	-0.80 ± 0.24	0.445
V	2,25	32,0	0,477	-1.34 ± 0.22	0.947
VI	2,56	42,5	0,483	-2.41 ± 0.32	-
VII	2,99	~ 22	0,467	-1.42 ± 0.34	0.748

* – μ , ϵ и E – соответственно, дипольный момент, диэлектрическая проницаемость и полярность растворителя, $\lg C_{1/2}$ – логарифм концентрации половинной пересольватации ДМАФ.

Для соединений III и VI, добавление которых не приводило к существенным изменениям параметров флуоресценции, соотношение числа гидроксильных групп к числу атомов углерода в молекулах равно 1:1 и существенно выше, чем для других исследованных КП. Авторы полагали, что молекулы данных соединений сами имеют устойчивую гидратную оболочку, что не дает им возможности взаимодействовать с молекулами зонда и участвовать в пересольватации.

В присутствии остальных КП пересольватация протекает более эффективно (табл. 2). Замена половины молекул воды в сольватной оболочке ДМАФ молекулами КП достигается при концентрациях последних в 5-18 раз меньших, чем при достижении 50 молярн. % криопротекторов в растворе.

С целью определения взаимосвязи между аналитическим сигналом от зонда и параметрами КП нами было проведено сопоставление данных, полученных от зонда – $C_{1/2}$ и смещения максимума полосы испускания в спектрах флуоресценции $\Delta\nu_{\text{фл}}$, с микро- и макропараметрами исследуемых сред – дипольным моментом их молекул – μ , диэлектрической проницаемостью – ϵ , полярностью – E , логарифмом коэффициента распределения в системе октанол-вода – $\lg P$.

Нами не было обнаружено какой-либо взаимосвязи между величиной $C_{1/2}$ зонда и диэлектрической

Хотя добавляемые количества КП невелики и не могут существенно изменить диэлектрическую проницаемость и другие макропараметры растворителя, значительный гипсохромный сдвиг полосы N^* , наблюдаемый в экспериментах, однозначно говорит о понижении полярности окружения зонда.

Логичным будет объяснить наблюдаемый эффект формированием вокруг молекул ДМАФ сольватной оболочки, состоящей из менее полярных молекул КП.

Как показано на рисунке 2, зависимость интенсивности полосы испускания ДМАФ от концентрации КП в растворе, имеет «сигмоидный» характер, типичный для кривых кислотно-основного и комплексонометрического титрования. Положение точки перегиба в центре полученной кривой – $C_{1/2}$, может служить количественной мерой сольватирующего действия КП. Фактически $C_{1/2}$ является концентрацией «половинной пересольватации» соответствующей мольной доле КП в растворе, при которой сольватная оболочка зонда

проницаемостью КП. В то же время линейная зависимость наблюдалась между $C_{1/2}$ и величиной полярности (рисунок 3), связанной с диэлектрической проницаемостью выражением

$$E = \frac{\varepsilon + 1}{2\varepsilon - 1}.$$

Также обнаружена зависимость между $C_{1/2}$ и дипольным моментом молекул КП. Коэффициент корреляции для зависимости $C_{1/2}$ от E составил 0,936, для зависимости $C_{1/2}$ от μ (без учета пропандиола) – 0,972.

Напротив, для величины $\Delta\nu_{\text{фл}}$ обнаружена линейная зависимость только от одного параметра – $\lg P$ (коэффициент корреляции – 0,895) (рисунок 4). Также от $\lg P$ зависит величина $I_{\text{КП}}/I_{\text{вода}}$ – чем выше значение $\lg P$, тем больше прирост интенсивности флуоресценции. Однако линейной корреляции в данном случае не обнаружено.

Хотя все приведенные параметры КП (ε , E , μ , $\lg P$) связаны между собой, они отражают разные параметры электрического поля в молекулах и различные аспекты взаимодействия последнего с внешним электрическим полем.

$\lg P$ – эмпирический параметр, связанный с липофильностью органических веществ, в случае биологических объектов моделирует перераспределение КП между водной средой околослойной мембраны и липидной фазой мембраны. Чем выше величина $\lg P$, тем в большей степени проявляются мембранотропные свойства КП – тем сильнее он проникает в мембрану и модифицирует ее физико-химические и биофизические свойства. При высоких концентрациях КП функции клеточной мембраны нарушаются, что позволяет говорить не о его криозащитных свойствах, а о цитотоксическом действии.

Поскольку величина $\lg P$ связана с $\Delta\nu_{\text{фл}}$ и $I_{\text{КП}}/I_{\text{вода}}$, можно заключить, что чем больше гипсохромный сдвиг полосы испускания ДМАФ при добавлении КП к водным растворам зонда, и чем больше возрастает интенсивность флуоресценции последнего, тем большим будет повреждающее действие КП на мембраны клеток.

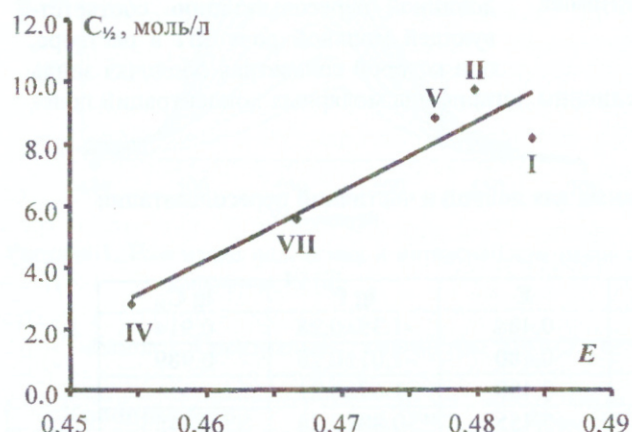


Рисунок 3. Зависимость концентрации половинной пересольватации от полярности растворителя (обозначения осей приведены в таблицах 1 и 2).

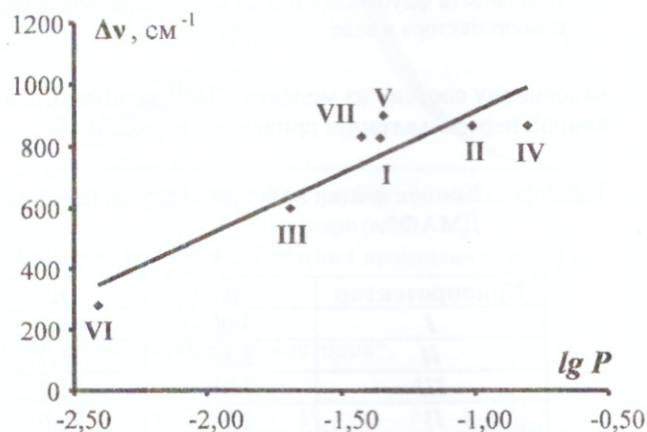


Рисунок 4. Зависимость смещения максимума полосы испускания в спектрах флуоресценции водных растворов ДМАФ от величины $\lg P$ криопротекторов.

Величины дипольного момента и полярности КП описывают его микро- (μ) и макровзаимодействие (E) с зондом на уровне сольватной оболочки последнего. По нашему мнению, аналитический сигнал от зонда в этом случае может говорить об эффективности процесса пересольватации криопротекторами гидратной оболочки макромолекул, входящих в состав клеточной мембраны. Таким образом, величина концентрации половинной пересольватации зонда должна быть связана с криозащитным действием веществ.

Сравнение спектральных характеристик ДМАФ с криозащитной активностью КП было проведено на основании работ [5, 17, 18, 19], в которых обобщены экспериментальные результаты исследования криопротекторного и цитотоксического действия нескольких классов химических соединений с постепенно усложняющейся структурой при криоконсервировании спермы петухов. По данным, приведенным в этих работах, наибольшей цитотоксичностью обладают соединения, для которых наблюдаются высокие значения $\Delta\nu$ зонда – IV, VII, I. Этиленгликоль (III) и глицерин (VI) с меньшими значениями $\Delta\nu$ менее токсичны. Любопытно, что диметилформамид (II) с высоким $\Delta\nu$ в случае консервации сперматозоидов петуха проявляет наименьшую токсичность, в то время как при криоконсервации некоторых клеток кролика его токсичность соизмерима с I и выше, чем у VI [20]

Согласно данным, приведенным в работе [18], по степени уменьшения криопротекторного действия на сперматозоиды петухов исследованные вещества можно выстроить в ряд II > I > V > III > VI > VII >

4'-диметиламинофлавонол – новый флуоресцентный зонд ...

IV. Ряд, построенный по убыванию величин $\lg C_{1/2}$, имеет вид $II > I > V > VII > IV$. Таким образом, показания зонда совпадают с данными для всех КП за исключением этиленгликоля и глицерина. Это, вероятно, объясняется тем, что молекулы III и VI сами по себе сильно гидратированы, и их действие на мембрану (как и механизм проницаемости внутрь клетки) существенно отличается от таковых в случае других КП.

Очевидно, что для внедрения ДМАФ в практику и надежного подтверждения его прогностической способности по отношению к свойствам КП потребуются дальнейшее систематическое изучение действия последних на биологические объекты.

ВЫВОДЫ

Флуоресцентный зонд для детекции межфазовых переходов – 4'-диметиламинофлавонол (ДМАФ), был использован для прогнозирования криопротекторных свойств органических растворителей. Показано, что гипсохромный сдвиг полосы испускания зонда и рост интенсивности его флуоресценции при добавлении криопротектора коррелирует с параметром липофильности последнего и с его мембранотропными и цитотоксическими свойствами. Концентрация половинной пересольватации, полученная в результате титрования водных растворов зонда криопротекторами, коррелирует с криозащитным действием последних, в случае если оно основано на эффекте частичной пересольватации гидратной оболочки клеточной мембраны. Результаты, полученные с использованием зонда, хорошо коррелируют с экспериментальными данными по криоконсервированию клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Актуальные проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н.С.Пушкаря, А.М.Белоуса.- Киев: Наук. думка, 1981.- 608 с.
- 2 Белоус А.М., Грищенко В.И., Парашук Ю.С. Криоконсервация репродуктивных клеток.- К.: Наук. думка, 1986.- 208 с.
3. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы.- К.: Наук. думка, 1978.- 202 с.
- 4 Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты.- К.: Наук. думка, 1979.- 200 с.
5. Линник Т.П. Фізико-хімічні фактори кріолошкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного кріоконсервування: Автореф. дис. докт. біол. наук / НАНУ: ІПКіК.- Харків, 2003.- 36 с.
6. McMorrow D., Kasha M. // J. Am. Chem. Soc.- 1983.- v.105.- P.5133-5134.
7. McMorrow D., Kasha M. // J. Phys. Chem.- 1984.- v.88.- P.2235-2243.
8. Pivovarenko V.G., Tuganova A.V., Klimchenko A.S., Demchenko A.P. // Cellular & Molecular Biol. Lett.- 1997.- v.2.- P. 355-361.
9. Duportail G., Klymchenko A., Mely I., Demchenko A. // FEBS Letters.- 2001.- v.508.- P. 196-200.
10. Міронова Н.Г., Коваль Ю.В., Рошаль О.Д. // II з'їзд українського біофізичного товариства.- Харків, 1998.- С.197.
11. Smith M.A., Neumann R.M., Webb R.A. // J. Heterocyclic Chem.-1968.- № 5.- P. 425-426.
12. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Роддик Д., Тупс Э. Органические растворители. М.: Химия, 1968.- 1450 с.
13. Протива М. Очистка растворителей // В кн.: Лабораторная техника органической химии. М.: Мир, 1966.- С. 591-615.
14. Дорошенко А.О. Комплект программ Spectra Data Lab 1.3/ НИИ химии при ХНУ им. Каразина, Харьков. 1999.
15. Program Package ACDLabs / Avanced Chemistry Development Inc. Toronto. 1996.
16. Пичугин Ю.И. Итоги и перспективы поиска новых эндоцеллюлярных криопротекторов // Пробл. криобиол. – 1993. – № 2. – С. 3-10.
17. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. I. Цитотоксичность диолов и амидов // Пробл. криобиол.- 2001.- №2.- С.72-79.
18. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. II. Криозащитная активность диолов и амидов // Пробл. криобиол.- 2001.- №4.- С.43-51.
19. Линник Т.П., Новиков А.Н., Рындин В.Ф., Хайкин Р.К., Терещенко А.В. // Криобиология.- 1990.- №3.- С.41-45.
20. Криоконсервирование клеточных суспензий / Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др.; под общ. ред. Цуцаевой А.А.- Киев: Наук. думка, 1983.- 240 с.