

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 57.043:536.6:547.415

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ
АДДУКТОВ N-АЦЕТИЛЭТАНОЛАМИНА

А.В. Зинченко, Е.Н. Животова, В.В. Чеканова, А.В. Николенко, А.М. Компаниец

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины**ул. Переяславская, 23, г. Харьков, 61015**hivotova@inbox.ru*

Поступила в редакцию 23 мая 2005 г.

Впервые исследованы фазовые переходы и процессы стеклования систем вода–N-ацетилэтаноллин (степень полимеризации $n = 1, 7-8$) методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) в температурном диапазоне -150 ± 0 °С. Построены диаграммы физических состояний, установлены закономерности развития стеклообразного и кристаллического состояний в зависимости от концентрации исследуемых веществ. С увеличением степени полимеризации исследуемых систем наблюдается рост стабильности аморфного состояния и увеличение концентрационного диапазона развития кристаллической фазы из аморфного состояния при нагреве. Показана их криозащитная активность в отношении различных биологических объектов в зависимости от структуры, степени полимеризации и молекулярно-массового распределения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксигенирование, N-ацетилэтаноллин, криопротекторы, ДСК, диаграммы состояния, тромбоциты, клетки СПЭВ, миелокарициты

Одной из наиболее важных задач криобиологии является поиск новых эффективных криопротекторов и создание на их основе криозащитных сред для низкотемпературного консервирования различных клеток и тканей. Одним из классов химических соединений, используемых в качестве криопротекторов, являются амиды алифатических карбоновых кислот [1]. Некоторые из этих соединений нашли применение в практике низкотемпературного консервирования лейкоцитов и тромбоцитов человека, спермы птиц, спермиев человека и других биологических объектов [2-4]. Однако алифатические амиды в ряде случаев могут оказывать выраженное токсическое действие, как на организм, так и на клетки, что значительно ограничивает их применение в практике низкотемпературного консервирования. Ранее установлено, что одним из способов уменьшения токсичности веществ является оксигенирование, которое даёт возможность широко варьировать степень их полимеризации и молекулярно-массовое распределение (ММР), получая при этом смесь полимергомологов, включающих как низко-, так и высокомолекулярные соединения [5]. В работе [6] изучались возможные подходы изменения токсичности и криопротекторной активности при вариации структуры амидов, пути химической модификации амидов низкомолекулярных алифатических кислот, обуславливающие достижение необходимой эффективности криопротекторов при криоконсервировании различных биологических объектов. В связи с этим в работах [7-8] проведено исследование влияния оксигенирования на токсичность, цитотоксичность и криопротекторные свойства амидов и сравнение их с исходными веществами.

В литературе имеется достаточно большое количество работ (и наблюдается тенденция к их возрастанию) по исследованию физических состояний водных растворов неэлектролитов, используемых в качестве криопротекторов биологических объектов [9-10]. Одним из показателей эффективности вещества как криопротектора является его склонность к стеклованию и способность менять характер кристаллизации систем, содержащих водный компонент.

Таким образом, целью настоящей работы является исследование низкотемпературных фазовых переходов и стеклования для водных растворов производных ацетамида, а именно N-ацетилэтаноллинов со степенью полимеризации $n = 1$ и $n = 7-8$, которые были синтезированы в ИПКиК НАН Украины, а также апробация полимергомологов N-ацетилэтаноллина в качестве криозащитных веществ на некоторых биологических объектах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оксигенирование N-ацетилэтаноллина проводили в установке синтеза УСК-1 с дискретной подачей окиси этилена и подогревом по методу Козлова [11]. Полученные продукты очищали углем ОАУ и понижали рН катионообменной смолой КУ-2-8С. Аддукты N-ацетилэтаноллина со степенью полимеризации $n = 7-8$ разгоняли на молекулярно-дистилляционной установке в глубоком вакууме при остаточном давлении $2-4 \times 10^{-5}$ мм. рт. ст., отбирая фракцию $n = 1$ при температуре от 85 °С. Для

идентификации исследуемых веществ определяли плотность, показатель преломления, температуру кипения. Для подтверждения структуры синтезированных соединений снимали ИК-спектры на спектрофотометре «Specord 75 IR» и ЯМР-спектрометре «TESLA». Чистоту веществ и фракционный состав образцов оксиэтилированных амидов определяли газо-жидкостной хроматографией на хроматографе ЛХМ-80, а также ТСХ-хроматографией.

Калориметрические исследования проводили на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК), разработанном и изготовленном в ИПКиК НАН Украины в отделе криобиофизики [12]. Образцы охлаждали в жидком азоте со средней скоростью 200 °С/мин до -150 °С. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью 0,5 °С/мин.

Для калориметрических исследований были выбраны растворы оксиэтилированного N-ацетилэтаноламина со степенью полимеризации 1 и 7-8, т.е. крайние представители исследуемого в данной работе гомологического ряда.

Объектом криобиологических исследований являлись концентраты тромбоцитов, полученные из донорской крови методом дифференцированного центрифугирования (центрифуга "Janetzki", ГДР) в двойные пластиковые мешки типа "Гемакон" на гемоконсерванте "Глюгицер".

Криоконсервирование осуществляли с растворами исследуемых веществ, которые готовили на плазме ex tempore. Непосредственно перед замораживанием образцы тромбоконцентрата медленно, постоянно перемешивая, соединяли с равным объемом сгущающих растворов до достижения 5% конечной концентрации в суспензии клеток. Полученную смесь переводили в металлические контейнеры на 10 мл и замораживали со скоростью 1 °С/мин до -196 °С.

Функциональную полноценность тромбоцитов оценивали по следующим параметрам: подсчет общего количества клеток в камере Горяева, определение ретрактильной активности [13], АДФ-индуцированной агрегации (фотометрический метод. Криоконсервирование клеток СПЭВ (перевиваемая клеточная культура почки эмбрионов свиньи) и клеток костного мозга проводили по методу, описанному в работе [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Некоторые термограммы водных растворов оксиэтилированного N-ацетилэтаноламина (ОЭАц) со степенью полимеризации $n = 1$ и 7-8 для ряда концентраций приведены на рис. 1 и 2, соответственно. На термограммах зарегистрированы следующие особенности: скачок теплопоглощения, экзо- и эндотермические пики. Согласно литературным данным [3], они могут быть идентифицированы следующим образом:

1 – скачок теплопоглощения – расстеклование при нагреве (процесс, обратный стеклованию, то есть переход из твердого аморфного состояния в состояние переохлажденной жидкости);

2 – кристаллизация переохлажденной жидкости;

3 – завершение процесса кристаллизации при нагреве;

4 – плавление системы.

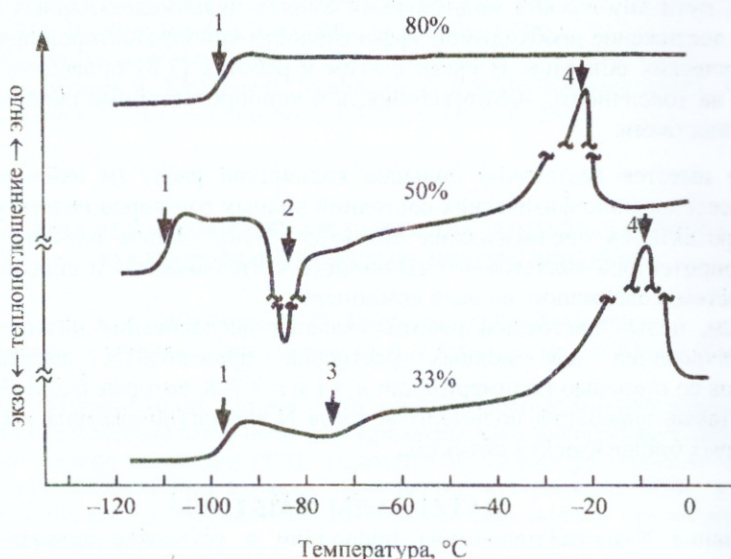


Рис. 1. ДСК-термограммы водных растворов N-ацетилэтаноламина со степенью полимеризации $n = 1$. Концентрации растворов указаны на термограммах. Пояснения в тексте.

Калориметрическое исследование водных растворов аддуктов ...

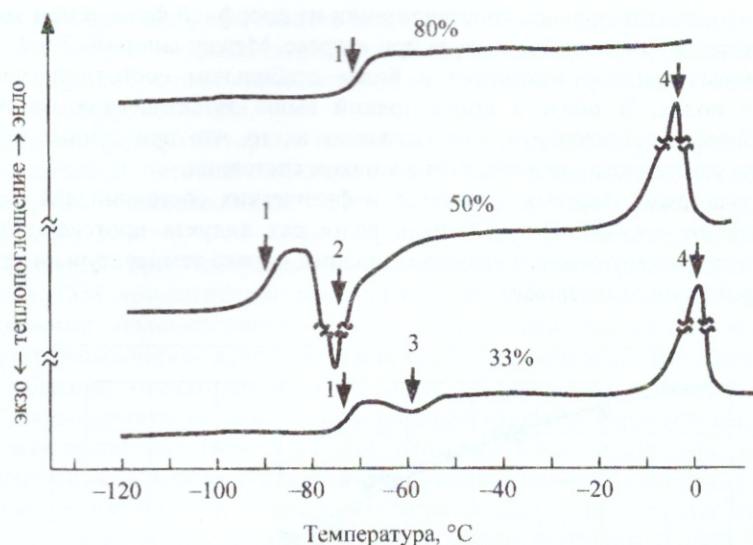


Рис. 2. ДСК-термограммы водных растворов N-ацетилэтанолamina со степенью полимеризации $n = 7-8$ концентрации растворов указаны на термограммах. Пояснения в тексте.

На основе термограмм построены диаграммы фазовых переходов и физических состояний (динамические диаграммы). На рис. 3 и 4 представлены динамические диаграммы состояния ОЭАц (степень полимеризации $n = 1$ и $n = 7-8$), где линии 1 и 1' обозначают расстеклование, линия 2 – кристаллизацию переохлажденной жидкости; линия 3 – завершение процесса кристаллизации при нагреве и линия 4 – плавление.

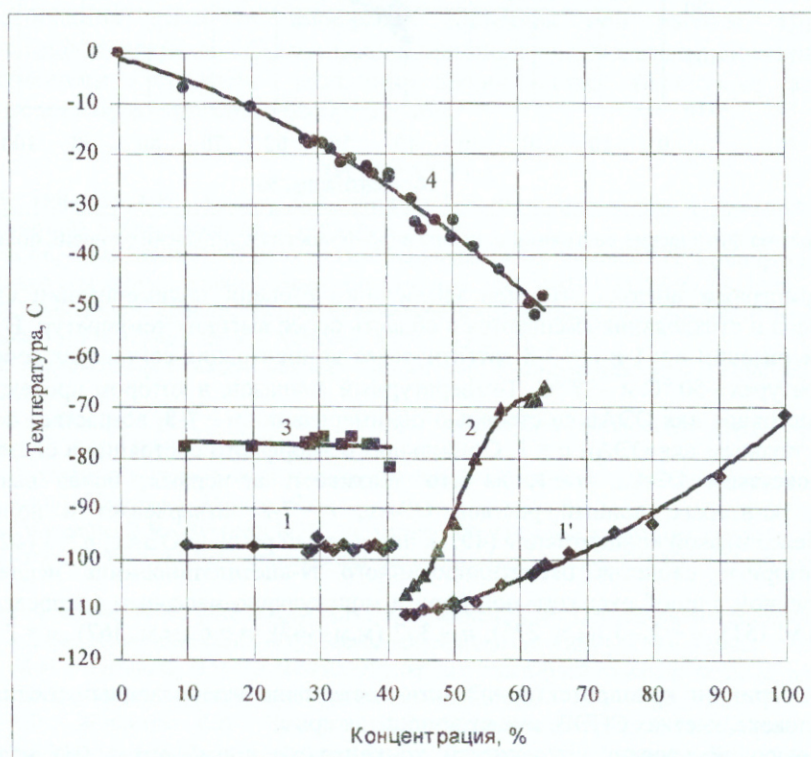


Рис. 3. Диаграмма физических состояний системы вода-N-ацетилэтанолamin (степень полимеризации $n = 1$)

Ниже линии 1 (рис. 3) при концентрациях ниже 41% образец (ОЭАц, $n = 1$) представляет собой смесь кристаллов и аморфных образований. При концентрациях выше 41% ниже линии 1 образец находится в полностью твердоаморфном состоянии. Между линиями 1 и 3, а также между линиями 1' и 2 после расстеклования наряду с кристаллами льда появляется переохлажденная жидкость. Вследствие нестабильности жидкой фазы при таких низких температурах развивается кристаллизация. При

концентрациях выше 41% происходит процесс кристаллизации из аморфной фазы, а при концентрациях ниже 41% – завершение процесса кристаллизации льда при нагреве. Между линиями 2 и 4, а также 3 и 4 расположены поля, в которых раствор находится в более стабильном состоянии, чем состояния растворов в нижележащих полях. В области концентраций выше эвтектических на термограммах регистрируется только процесс расстеклования, что указывает на то, что при данных концентрациях вещество выше температуры расстеклования находится в жидком состоянии.

На рис. 4 приведена диаграмма фазовых переходов и физических состояний для системы вода–ОЭАц (степень полимеризации $n = 7-8$). Видно, что в растворах аддукта протекают те же самые процессы, что и для исходного, рассмотренного выше соединения, однако температуры и температурные диапазоны протекающих процессов отличаются.

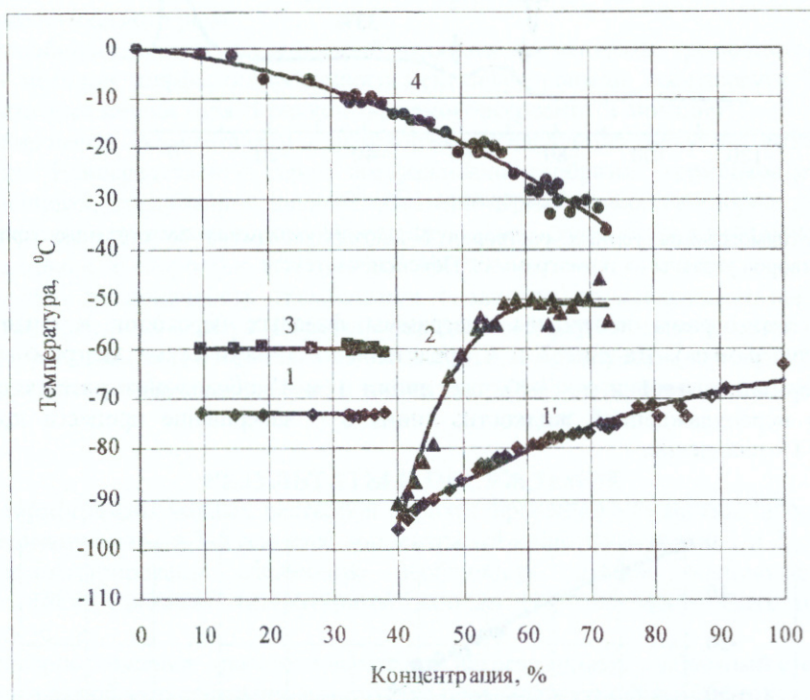


Рис. 4. Диаграмма физических состояний системы вода–N-ацетилэтаноламин (степень полимеризации $n = 7-8$)

Анализ термограмм показал, что при увеличении степени полимеризации ОЭАц температуры фазовых переходов и стеклования смещаются в область более высоких температур. В системах ОЭАц со степенью полимеризации $n = 1$ и $n = 7-8$ эвтектическая концентрация составляет соответственно 63% и 74% при температурах -50°C и -37°C . Температурный диапазон, в котором протекает кристаллизация из аморфного состояния для ОЭАц со степенью полимеризации $n = 7-8$, возрастает более чем в 1,5 раза по сравнению с таковым для ОЭАц $n = 1$. Стабильность аморфного состояния в системах ОЭАц, $n = 7-8$ выше, чем в системах ОЭАц, $n = 1$, на что указывает, во-первых, более высокая температура расстеклования; во-вторых, водный раствор ОЭАц, $n = 7-8$ затвердевает в полностью аморфном состоянии при более низкой концентрации (40%), чем водный раствор ОЭАц, $n = 1$ (42%).

Криопротекторные свойства оксигетилированного N-ацетилэтанолamina исследованы на узких фракциях с различной длиной оксигетильной цепи и молекулярно-массовым распределением: $n = 1$ (м.м. 103), $n = 1-3$ (м.м. 151), $n = 2-5$ (м.м. 275), $n = 3-7$ (м.м. 367), $n = 6$ (м.м. 367), $n = 7-8$ (м.м. 411), $n = 9$ (м.м. 499).

Первичный скрининг криопротекторной активности вышеперечисленных соединений проведен на тромбоцитах человека, клетках СПЭВ, миелокариоцитах крыс.

Так, наиболее высокий уровень сохранности концентратов тромбоцитов (по количеству кровяных пластинок и их ретрактивной активности) установлен для ОЭАц со степенью полимеризации $n = 1$. В результате замораживания тромбоцитов с 10%-ми растворами ОЭАц в плазме в концентратах тромбоцитов сохранялось в среднем 88% кровяных пластинок, их ретрактивная активность составила $80 \pm 2\%$ по отношению к свежезаготовленным, величина реакции тромбоцитов на гипотонический шок – $30 \pm 2\%$, АДФ-агрегация – $10 \pm 1\%$. Для фракций $n = 7-8$ результаты сохранности тромбоцитов после замораживания значительно хуже: в образцах сохранялось около 70% кровяных пластинок, однако их ретрактивная активность невелика – 20-25%, способность к АДФ-агрегации не сохранялась. При

Калориметрическое исследование водных растворов аддуктов ...

исследовании криопротекторных свойств аддуктов ОЭАц со степенью полимеризации $n = 1-3$, $n = 2-5$ и $n = 9$ были получены неудовлетворительные результаты. Приведенные предварительные данные указывают на целесообразность продолжения исследований по использованию ОЭАц ($n = 1$) в качестве криопротектора для тромбоцитов.

При изучении криопротекторных свойств ОЭАц на клетках культуры СПЭВ было установлено, что наименее выраженной цитотоксичностью в отношении этих клеток и наибольшей криопротекторной активностью (96% жизнеспособных клеток после отогрева) обладает фракция $n = 3-4$. Удлинение оксиэтильной цепи до $n = 6$, $n = 7-8$, $n = 9-10$ способствовало повышению криопротекторной активности данного соединения при замораживании миелокарицитов крыс (75–81% сохранных клеток при использовании 15% концентраций испытуемых соединений в ограждающих растворах). При этом оксиэтилированные полимергомологи амидов оказывали на клетки костного мозга крыс менее выраженное цитотоксическое действие, чем исходное, «стартовое» соединение.

Таким образом, оксиэтилирование амидов, направленное на изменение структуры исходного соединения, варьирование степени полимеризации является перспективным способом, позволяющим получить новые вещества с низкой цитотоксичностью и криопротекторными свойствами в отношении ряда биологических объектов (тромбоциты, миелокарициты, клетки культуры СПЭВ). Изучение криопротекторной активности полимергомологов N-ацетилэтананоламина на клетках культуры СПЭВ, тромбоцитах человека и миелокарицитах крыс свидетельствуют о наличии видовой специфичности различных биологических объектов при взаимодействии их с активными центрами исследуемых фракций ОЭАц.

ВЫВОДЫ

Таким образом, впервые построены диаграммы физических состояний систем вода-N-ацетилэтананоамин ($n = 1$) (степень полимеризации $n = 1, 7-8$), установлены закономерности развития стеклообразного и кристаллического состояний в зависимости от концентрации аддуктов N-ацетилэтананоамина. Показано, что с увеличением степени полимеризации исследуемых систем наблюдается рост стабильности аморфного состояния и увеличение концентрационного диапазона развития кристаллической фазы из аморфного состояния при нагреве. При исследовании криопротекторных свойств аддуктов ОЭАц с разной степенью полимеризации показана зависимость их криозащитной активности в отношении различных биологических объектов от структуры, степени полимеризации и молекулярно-массового распределения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шраго М.И., Новиков А.Н., Ханина Л.А., Линник Т.П. Криопротекторы и криоконсерванты (основные направления исследований). // Криобиология. – 1985. № 3. – С. 8-13.
2. Компаниец А.М., Новиков А.Н., Шраго М.И., Николенко А.В., Линник Т.П. Криопротекторная активность соединений ряда амидов при криоконсервировании тромбоцитов. Деп. ВИНТИ, 26.03.85.-1985.- № 2111-85.
3. Линник Т.П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - Харьков, 1986. – 19 с.
4. Линник Т.П. Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. // Проблемы криобиологии. – 1998. – № 3.- С.21-28.
5. Ханина Л.А., Шраго М.И., Калугин и др. N-оксиэтил-гепта(оксиэтилен)морфолин в качестве криопротектора. А.с. СССР № 1089090. БИ.- 1984.- № 16. – С. 42.
6. Чеканова В.В. Синтез, токсичность и криопротекторная активность оксиэтилированных амидов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков. – 1993. – 17 с.
7. Ханина Л.А., Чеканова В.В., Луговой В.И., Петренко Т.Ф. Цитотоксичность и криопротекторная активность оксиэтилированных амидов при криоконсервировании перевиваемых культур СПЭВ. // Проблемы криобиологии. – 1995. - № 1. – С. 37-42.
8. Ханина Л.А., Чеканова В.В., Николенко А.В., Компаниец А.М. Структура и криопротекторные свойства оксиэтилированных алифатических амидов. // Проблемы криобиологии. – 2001. - №3. – С.22.
9. Щетинский М.И., Чеканова В.В. О межмолекулярных взаимодействиях в водных растворах амидов. // Холодовой анабиоз: Сб. научн. тр. – Киев.: Наук. Думка, 1991. – С.57-63.
10. Зинченко А.В., Животова Е.Н., Чеканова В.В., Компаниец А.М. Исследование водных растворов оксиэтилированных производных ацетамида методом ДСК. // Тез. докл. “Проблеми біологічної і медичної фізики”. – Харьков. – 2004. – С.85.
11. Козлов И.А., Шоломов И.К., Осипов О.А. и др. Дипольные моменты и строение этаноламинов карбоновых кислот // ЖОХ. – 1966. – 38, № 2. – С. 189–194.
12. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур –196 – 0°С. Автореф. дисс. ... канд. физ-мат. наук. – Харьков, 1983. – 22 с.
13. Скопина С.Б., Виноград-Финкель Ф.Р., Полушина Т.В., Суздалева В.В. Изыскание эффективных ограждающих растворов для криоконсервирования тромбоцитов. // Проблемы гематологии и переливания крови.–1975.–20, №9.–С. 17-21.