

методом дифференциального центрифугирования. Показатели дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий определяли полярографическим методом с использованием субстратов: малат (5 мМ) + глутамат (5 мМ) или сукцинат (8 мМ). В гомогенатах и постмитохондриальных фракциях печени оценивали активность окислительно-восстановительных ферментов по восстановлению Alamar Blue (AB).

Установлено, что после гипотермического хранения печени в опытной группе скорость сукцинат-зависимого дыхания в состоянии V_3 и V_4 по Чансу достоверно увеличивалась. В присутствии малата и глутамата данные показатели не отличались от контрольных значений. Нами показано, что накопление восстановленной формы Alamar Blue пропорционально активности окислительно-восстановительных ферментов. При раздельном определении флюоресценции АВ в гомогенатах и постмитохондриальных фракциях печени установлено, что около 90% интенсивности флюоресценции АВ связано с работой митохондрий. Не митохондриальная составляющая восстановленного АВ принадлежит в основном гликолитической оксидоредукции, так как в постмитохондриальной фракции ингибитор гликолиза моноидоацетат ингибировал флюоресценцию АВ в контрольной группе животных на 94%. В то же время после предобработки крыс ЭСФ вклад негликолитического пути восстановления АВ увеличивался в 5 раз.

Обсуждаются возможные механизмы образования АТФ в условиях гипотермии под действием предобработки. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что введение животным ЭСФ может существенно повысить устойчивость клеток к гипоксии за счёт активации работы дыхательной цепи и других ферментов, прямо или косвенно участвующих в образовании АТФ в клетке. Однако для более детального изучения механизмов действия ЭСФ на процессы генерации энергии в гипотермических условиях необходимы дальнейшие исследования.

determined by polarographic method using malate (5mM) + glutamate (5mM) or succinate (8 mM) as substrates. Activity of oxidation-reduction enzymes was evaluated by the reduction of Alamar Blue (AB) in liver homogenates and postmitochondrial fractions.

It was found that succinate-dependent rate of respiration in V_3 and V_4 state according to Chance increased significantly in experimental group after rat liver hypothermic storage. In presence of malate and glutamate these data did not differ from the control. It was shown that accumulation of AB reduction form was proportional to the redox enzymes activity. Separate determination of AB fluorescence in liver homogenates and post-mitochondrial fractions shown that about 90% AB fluorescence strength related with mitochondrial function. Non-mitochondrial component of recovered AB generally belongs to glycolysis oxireduction, since in post-mitochondrial fraction an inhibitor of inhibitor of glycolysis, monoiodoacetate, inhibited AB fluorescence in animals' control group by 94%. At the same time contribution of non-glycolytic way of AB reduction in 5 times increased after rat preconditioning with ESF.

Possible ways of ATP generation under liver hypothermic storage after preconditioning are discussed. The obtained results testify to the fact that injection of ESFs to the animals can essentially improve stability of cells to ischemia due to the activation of mitochondrial respiratory chain and other enzymes, directly or indirectly participating in ATP generation in cells. However, for more detailed comprehension of mechanisms of ESFs influence on processes of energy generation under hypothermic conditions the further researches are required.

Калориметрические исследования водных растворов оксиэтилированных производных глицерина со степенью полимеризации 5 и 25

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Calorimetric Investigations of Aqueous Solutions of Glycerol Oxyethylated Derivatives with Polymerization Degrees of 5 and 25

E.N. ZHIVOTOVA, A.V. ZINCHENKO, V.V. CHEKANOVA, A.M. COMPANIETS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Количество криопротекторов, применяемых для криоконсервирования различных биологических объектов, увеличивается не только за счет синтеза принципиально новых, но и химической модификации тех, которые зарекомендовали себя как эффективные криопротекторы. Одним из способов такой модуляции является оксиэтилирование, т.е. добавление полимерной цепочки $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. Оксиэтилированные производные глицерина, синтезированные в отделе криопротекторов

Increase in variety of cryoprotectants used for cryopreservation of various biological objects occurs not only due to synthesis of principally new cryoprotectants but also due to chemical modification of those already recommended themselves as effective ones. One of the ways of such modification is oxyethylation, i.e. addition of $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ polymeric chain. Glycerol oxyethylated derivatives synthesized at Cryoprotectants' Department of Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of

ИПКиК, предполагается исследовать как криопротекторы для некоторых биологических объектов, в частности, тромбоцитов и эритроцитов человека, так как синтезированные соединения имеют более низкую токсичность по сравнению с глицерином. Цель работы – исследование низкотемпературных фазовых переходов и физических состояний полимергомологов глицерина (степень полимеризации 5 и 25).

Оксиэтилирование глицерина проводили в установке синтеза (УСК-1) с дискретной подачей окиси этилена с подогревом при 5 атм и температуре 110°C. Полученные продукты очищали углем ОАУ и понижали рН катионообменной смолой КУ-7-8 С.

Исследования проводили на дифференциальном сканирующем калориметре, разработанном и изготовленном в ИПКиК НАН Украины (отдел криобиофизики). Образцы охлаждали в жидком азоте со средней скоростью 200°C/мин до –150°C. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью 0,5°C/мин. На термограммах зарегистрированы скачок теплопоглощения (переход из твердого аморфного состояния в состояние переохлажденной жидкости), экзотермические (кристаллизация переохлажденной жидкости и завершение процесса кристаллизации при нагреве) и эндотермические пики (плавление системы).

На основании термограмм построены диаграммы физических состояний водных растворов оксиэтилированных производных глицерина в диапазоне концентраций 0÷100 % (масс. %) и температурном диапазоне –150÷0°C.

Проанализировав полученные диаграммы, можно заключить, что водные растворы оксиэтилированного глицерина (ОГ) со степенью полимеризации как 5, так и 25 в твердом состоянии представляют собой гетерогенные системы, включающие аморфную и кристаллическую фазы соответственно.

Нагрев водных растворов сопровождается их переходом из метастабильного в стабильное состояние, на что указывают такие процессы, как расстеклование и низкотемпературная кристаллизация из переохлажденного состояния. С увеличением степени полимеризации ОГ повышается температура фазовых переходов и стеклования.

В растворах ОГ со степенью полимеризации 25 наблюдается почти двукратное уменьшение диапазона кристаллизации в процессе нагрева в области средних концентраций. Также отмечается небольшое снижение концентрационного диапазона первой ветви ликвидуса, что указывает на то, что кристаллизация воды в водных растворах ОГ со степенью полимеризации 25 перестает наблюдаться при более низкой концентрации вещества, чем в водных растворах ОГ со степенью полимеризации 5.

В то же время на диаграмме физических состояний водных растворов ОГ со степенью полимеризации при высоких концентрациях вещества появляются экзотермические пики и вторая ветвь ликвидуса. Вероятно, эти эффекты обусловлены тем, что при высоких концентрациях ОГ со степенью полимеризации 25 происходят кристаллизация ОГ и его последующее плавление. В растворах ОГ со степенью полимеризации 5 вышеописанные явления не наблюдаются.

Эвтектическая концентрация составляет 45 и 50% водных растворов ОГ со степенью полимеризации 5 и 25 соответственно.

National Academy of Sciences of Ukraine are supposed to be investigated as cryoprotectants for some biological objects, in particular, human platelets and red blood cells, as the synthesized compounds have lower toxicity in comparison with glycerol. The research aim is investigation of low-temperature phase transitions and physical states glycerol polymer homologues (n polymerization degrees are equal to 5 and 25).

Glycerol oxyethylation has been carried-out in USK-1 synthesis device with discrete ethylene oxide supply with heating at a pressure of 5 atm and at temperature of 110°C. The obtained products have been purified by means of OAU device; pH has been decreased with cation exchange resin KU-7-8 С.

The investigations were made using a differential scanning calorimeter developed and made at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine at Cryobiophysics Department. Samples were cooled in liquid nitrogen at average rate of 200°C/min to –150°C. Thermograms were recorded at warming rate of 0.5°C/min.

In thermograms there were registered heat absorption step (the transition from solid amorphous state to the one of overcooled liquid), exothermic (crystallization of overcooled liquid and termination of crystallization process at warming) and endothermic (system fusion) peaks. On the basis of the thermograms the diagrams of physical states of water solutions of oxyethylated derivatives of glycerol over the concentration range 0 to 100 % (w/w) and the temperature range 150 to 0°C have been plotted.

Having analysed the built diagrams, it is possible to conclude that, in solid state, the aqueous solutions of oxyethylated glycerol with the polymerization degrees of 5, and 25 are heterogeneous systems including both amorphous and crystal phases, correspondingly.

Heating of both systems is accompanied by their transition from metastable state to stable one, that is supported by the processes as glass-transition and low-temperature crystallization from overcooled liquid. As oxyethylated glycerol polymerisation degree rises the temperature of phase and glass-transition increases.

In solutions of oxyethylated glycerol with polymerization degree ($n = 25$), it is observed significant (approximately twice) reduction of the crystallization range during heating in the area of average concentrations. Also moderate decrease in concentration range of the first branch of liquidus line is observed. This indicates that the observation of water crystallisation in aqueous solutions of oxyethylated glycerol ($n = 25$) terminates at lower concentration of the substance than in aqueous solutions of oxyethylated glycerol ($n = 5$). At the same time in the diagram of physical states of aqueous solutions of oxyethylated glycerol ($n = 25$) at high concentration of the substance, exothermic peaks and the second branch of liquidus line appear. Probably, these effects are stipulated by oxyethylated glycerol crystallization and its following melting under high concentration of oxyethylated glycerol with polymerisation degree of 25.

In oxyethylated glycerol solutions with polymerisation degree of 5 mentioned above phenomena are not observed.

Eutectic concentration makes 45 and 50% for aqueous solutions with polymerisation degrees of 5 and 25, correspondingly.