

УДК 547.422:544.01

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

## Дослідження взаємодії кріопротектора гліцерину та його похідних із диметилацетамідом у водному розчині методом флуоресцентних зондів

UDC 547.422:544.01

T.S. Dyubko<sup>1\*</sup>, V.G. Pivovarenko<sup>2</sup>, V.V. Chekanova<sup>1</sup>,  
Yu.S. Pakhomova<sup>1</sup>, Ya.V. Hvozdiuk<sup>1</sup>, A.M. Kompaniets<sup>1</sup>, A.L. Tatarets<sup>3</sup>

### Study of Interaction of Glycerol Cryoprotectant and Its Derivatives with Dimethylacetamide in Aqueous Solution Using Fluorescent Probes

**Реферат:** У роботі досліджено взаємодію сумішей гліцерину (ГЛ) та його оксиетильних похідних (ОЕГ) зі ступенем полімеризації ( $n$ ) 3, 25 і 30 із диметилацетамідом (ДМАЦ) у водному розчині за допомогою флуоресцентного зонда 3-гідрокси-4'-(N, N диметиламінофлавонол). Встановлено, що комбінація ГЛ та його оксиетильних похідних із ДМАЦ знижує мембранотропність окремих кріопротекторів, які складають суміш. Комбінація ГЛ, як і його низькомолекулярного похідного (ОЕГ <sub>$n=3$</sub> ), із ДМАЦ знижує мембранотропність останнього. У той самий час комбінація високомолекулярних похідних ГЛ (ОЕГ <sub>$n=25$</sub>  і ОЕГ <sub>$n=30$</sub> ) із ДМАЦ знижує мембранотропність ОЕГ. Показано, що ОЕГ <sub>$n=30$</sub>  за концентрацій вище 1 мас.% утворює у водному розчині структури міцелярного типу або міцелярні асоціати. Цей факт дозволяє припустити, що мембранотропна здатність асоціатів високомолекулярних ОЕГ обумовлена можливістю взаємодії їх неполярних сегментів із неполярними ділянками на поверхні біомембран. Експериментально встановленим механізмом зниження цитотоксичності комбінованих кріозахисних середовищ названо перестройку структури молекулярних асоціатів у водних розчинах сумішей низько- і високомолекулярних кріопротекторів.

**Ключові слова:** гліцерин, оксиетильні похідні, диметилацетамід, кріопротектори, суміші, мембранотропність, 3-гідрокси-4'-(N, N диметиламінофлавонол), флуоресценція.

**Abstract:** In this paper we have studied the interaction of the mixtures of glycerol (GL) and its oxyethylated derivatives (OEG) with polymerization degree  $n = 3, 25$  and  $30$  with dimethylacetamide (DMAc) in aqueous solution using 3-hydroxy-4'-(N, N dimethylaminoflavone) fluorescent probe. The combination of GL and its oxyethylated derivatives with DMAc was found to reduce the membranotropy of certain cryoprotective agents, forming a mixture. The combination of both GL and its low molecular weight derivative (OEG <sub>$n=3$</sub> ) with DMAc reduced the membranotropy of the latter. At the same time, combining GL derivatives of high molecular weight (OEG <sub>$n=25$</sub>  and OEG <sub>$n=30$</sub> ) with DMAc diminished the membranotropy of OEG. The OEG <sub>$n=30$</sub>  at concentrations above 1 wt.% was shown to form the micellar-type structures or micellar associates in aqueous solution. This enabled suggesting the membranotropic ability of high molecular weight OEG associates to be stipulated by possible interaction of their nonpolar segments with nonpolar sites on biomembrane surface. Structural rearrangements of molecular associates in aqueous solutions of low and high molecular weight cryoprotectant mixtures were designated as the experimentally established mechanism of cytotoxicity reduction in combined cryoprotective media.

**Key words:** glycerol, oxyethylated derivatives, dimethylacetamide, cryoprotectants, mixtures, membranotropy, 3-hydroxy-4'-(N, N dimethylaminoflavone), fluorescence.

Створення нових та більш ефективних кріозахисних середовищ для низькотемпературного консервування біологічних об'єктів залишається однією із найважливіших і актуальних проблем сучасної кріобіології. Як свідчать експериментальні дані останніх років, перспективними напрямками кріобіології вважаються створення

The designing of novel and more efficient cryoprotective media for low temperature preservation of biological objects has still remained one of the crucial and topical issues in current cryobiology. As evidenced by recent experimental findings, the development of new efficient cryopreservatives via combining the cryoprotective agents within protec-

<sup>1</sup> Лабораторія кріопротекторів, 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

<sup>1</sup> Laboratory of Cryoprotectants, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup> Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-41-43, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: tdyubko@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 3734143, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: tdyubko@gmail.com

Надійшла 11.04.2019

Прийнята до друку 20.04.2021

Received April, 11, 2019

Accepted 20, April, 2021

© 2021 T.S. Dyubko, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

нових ефективних кріоконсервантів шляхом комбінацій кріопротекторів у захисних середовищах і дослідження механізмів дії останніх [3–5, 18, 20, 23]. Мета такого підходу – отримання кріозахисних середовищ із покращеними властивостями і, перш за все, зі зниженою цитотоксичністю [2–4], проявом якої на рівні біомембран є, зокрема, зменшення мембранотропності. В нашій роботі термін «мембранотропність» означає спричинену зовнішнім агентом будь-яку (пряму або непряму) модифікацію мембранних структур, яка призводить до порушення початкових властивостей мембран (структура ліпідного бішару, конформація мембранних білків та ліпідів, гідратація, транспорту речовин, тощо). Так, виявлена висока кріозахисна ефективність оксиетильних похідних гліцерину обумовлює можливість застосування цих сполук в якості непроникних кріопротекторів при розробці нових методів кріоконсервування еритроцитів людини, які не потребують відмивання перед трансфузією [3, 4]. При цьому на етапі тестування потенційної цитотоксичності сумішей кріопротекторів ефективним є підхід, який ґрунтується на аналізі сигналу флуоресцентного зонда, що знаходиться у водному розчині кріопротектора і завдяки особливостям своєї хімічної будови є чутливим індикатором мембранотропності розчину [1, 9, 12].

У якості флуоресцентного зонда був використаний 3-гідрокси-4'-(N, N диметиламінофлавонол) (ДМАФ), який належить до класу флуорофорів, здатних до внутрішньомолекулярного фотоперенесення протона (ESIPT). Результатом ESIPT є утворення в збудженому стані таутомерної T\*-форми, яка створює окрему смугу в спектрі флуоресценції, зміщену батохромно відносно положення смуги початкової N\*-форми. Відмінність у будові та взаємодії з молекулами оточення цих таутомерних форм обумовлює різницю їх спектральних властивостей і дозволяє за змінами у спектрах флуоресценції відслідковувати полярність середовища, а також його протонодонорні та протоноакцепторні характеристики. В спектрах флуоресценції вплив середовища віддзеркалюється у вигляді змін інтенсивності та загального або взаємного розташування максимумів смуг емісії [20–22]. У полярних розчинниках із високою нуклеофільністю або протонодонорністю, наприклад, у нижчих спиртах чи воді, кількість T\*-форми може бути мінімальною, і флуоресценція буде візуально односмужовою, проте з характерним положенням максимуму у кожному випадку [14]. Відзначені спектральні властивості ДМАФ, а також доволі висока ліпофільність обумовили його використання в якості ратиометричного зонда

тими медіями і вивченням механізмів дії останніх, були розглянуті як перспективні тенденції в кріобіології [2, 10, 13, 17, 18, 20, 21]. Цей підхід має на меті отримати кріопротективні медіями з покращеними властивостями і, переважно, з зниженою цитотоксичністю [16, 17, 20], особливою, що проявляється зменшенням мембранотропності на рівні біомембран. Поняття «мембранотропність» визначає тут будь-яку (безпосередню чи опосередковану) модифікацію мембранних структур, спричинену зовнішнім агентом, що призводить до порушення початкових властивостей мембран (структура ліпідного бішару, конформація мембранних білків та ліпідів, гідратація, транспорт речовин, тощо). Для прикладу, виявлена висока кріопротективна ефективність оксиетильних похідних гліцерину робить можливим використання цих сполук як непроникних кріопротективних медіями при розробці нових методів кріоконсервування еритроцитів людини, коли не потрібна процедура миття перед трансфузією [17, 20]. Тут, при тестуванні сумішей кріопротективних медіями на цитотоксичність, цей підхід, що включає аналіз флуоресцентного сигналу зонда, розчиненого в кріопротективній водній розчині, є чутливим індикатором мембранотропності завдяки особливостям його хімічної будови [3, 4, 11].

Як флуоресцентний зонд ми використали 3-гідрокси-4'-(N, N диметиламінофлавонол) (DMAF), що належить до класу флуорофорів, здатних до внутрішньомолекулярного фотоперенесення протона (ESIPT). Результатом ESIPT є утворення в збудженому стані таутомерної T\*-форми, яка створює окрему смугу в спектрі флуоресценції, зміщену батохромно відносно положення смуги початкової N\*-форми. Відмінність у будові та взаємодії з молекулами оточення цих таутомерних форм обумовлює різницю їх спектральних властивостей і дозволяє за змінами у спектрах флуоресценції відслідковувати полярність середовища, а також його протонодонорні та протоноакцепторні характеристики. В спектрах флуоресценції вплив середовища віддзеркалюється у вигляді змін інтенсивності та загального або взаємного розташування максимумів смуг емісії [20–22]. У полярних розчинниках із високою нуклеофільністю або протонодонорністю, наприклад, у нижчих спиртах чи воді, кількість T\*-форми може бути мінімальною, і флуоресценція буде візуально односмужовою, проте з характерним положенням максимуму у кожному випадку [14]. Відзначені спектральні властивості ДМАФ, а також доволі висока ліпофільність обумовили його використання в якості ратиометричного зонда



для вивчення поверхневої ділянки ліпідних мембран, як це було показано у дослідженнях фазових переходів мембран різного складу за допомогою ДМАФ [11, 12, 15]. Цю властивість ДМАФ було використано також для аналізу міцелярних структур та оцінки стану ліпідного бішару [21].

Наведені вище спектральні властивості ДМАФ, що дозволяють відслідковувати полярності, фазові переходи або зміну структури розчинів, пов'язані, в першу чергу, зі складом сольватної оболонки молекул зонда. Так, у сумішах більш гідрофобних речовин із водою даний зонд буде мати змішану сольватну оболонку, в якій можна буде відслідковувати кількість молекул води за орієнтацією положення двох смуг емісії або відношення їх інтенсивностей [21].

Різниця в спектрах емісії ДМАФ є відповіддю на зміни у хімічному складі сольватної оболонки молекул зонда, яка, в свою чергу, залежить від сумарної енергії взаємодій (специфічного і неспецифічного типів) кожної молекули оточення з зондом. Встановлені зміни можуть бути використані не лише для детектування фазових переходів або аналізу складу сумішей органічних реагентів у воді, а також для оцінки гідрофобних властивостей останніх. Спектральні характеристики флуоресцентного зонда ДМАФ у присутності потенційного кріопротектора (КП) дозволяють зробити попередні висновки про цитотоксичність КП на мембранному рівні (мембранотропність) та ефективність його захисної дії.

Мета роботи – дослідження за допомогою флуоресцентного зонда впливу гліцерину та його оксиетильних похідних окремо і в суміші з диметилацетамідом на мембранотропну здатність кріопротекторного розчину.

### Матеріали та методи

У роботі використовували ОЕГ, похідні гліцерину 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), ОЕГ синтезований фірмою «Барва» (Україна) за технологією розробленою в ІПКіК НАН України [3]. Диметилацетамід (ДМАЦ) і гліцерин (ГЛ) фірми «Sigma Aldrich» (США).

Суміші (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 (рН7,2) у масовому співвідношенні 1:1. Концентрацію кріопротекторів виражали у масових процентах.

Зонд ДМАФ синтезували у Київському Національному університеті ім. Т. Г. Шевченка за методом І.В. Bakaltcheva [10, 12] і використовували у вигляді спиртового розчину. Кінцева концентрація зонда в зразках становила  $1,7 \times 10^{-6}$  М.

The mentioned above spectral properties of DMAF, enabling to track the polarities, phase transitions or change in solution structure, are primarily associated with the solvation shell composition of probe molecules. For example, in mixtures of more hydrophobic substances with water, this probe will have a mixed solvation shell, where the number of water molecules could be tracked by position orientation of two emission bands or the ratio of their intensities [14].

The difference in emission spectra of DMAF is a response to changes in chemical composition of solvation shell of probe molecules, which, in turn, depends on total energy of interaction (of specific and nonspecific types) of each molecule of environment with probe. The revealed changes can be used not only to detect the phase transitions or analyze the mixture composition of organic reagents in water, but to assess hydrophobic properties of the latter as well. Spectral characteristics of DMAF fluorescent probe in the presence of potential cryoprotectant (CP) allow drawing preliminary conclusions about CP cytotoxicity on membrane level (membranotropy) and its protective efficiency.

The purpose of this research was to study the impact of glycerol and its oxyethylated derivatives used alone and together with dimethylacetamide on membranotropic capacity of cryoprotective solution.

### Materials and methods

In this study, we used glycerol oxyethylated derivatives (OEG) with polymerization degree ( $n$ ) = 3, 25 and 30 (OEG <sub>$n=3$</sub> , OEG <sub>$n=25$</sub>  and OEG <sub>$n=30$</sub> , respectively). The OEG was synthesized by JSC Fine Organic Synthesis Plant 'Barva' (Ukraine) according to the protocol designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine [3]. Dimethylacetamide (DMAc) and glycerol (GL) were purchased from Sigma Aldrich (USA).

The mixtures (DMAc:GL, DMAc:OEG <sub>$n=3$</sub> , DMAc:OEG <sub>$n=25$</sub>  and DMAc:OEG <sub>$n=30$</sub> ) were prepared with double distilled water (pH 7.2) in mass ratio of 1:1. The cryoprotectant concentration was expressed as a weight percentage.

The DMAF probe was synthesized at the Taras Shevchenko National University of Kyiv by the method of I.B. Bakaltcheva [1, 3] and used as an alcohol solution. The probe final concentration in samples was  $1.7 \times 10^{-6}$  M.

Fluorescence spectra were recorded at room temperature (20°C) in  $1 \times 1 \times 3$  cm quartz cuvettes with Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer.





Спектри флуоресценції реєстрували за кімнатної температури (20°C) у кварцевих кюветках 1 × 1 × 3 см на спектрофлуориметрі «Varian Cary Eclipse», (США) з автоматичною корекцією. Ширина вхідної та вихідної щілин монохроматора становили 5 нм. Флуоресценцію ДМАФ збуджували світлом із 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 В. Г. Пивоваренко та співавт. [6]. Кожен експеримент повторювали 5 разів ( $n = 5$ ). Дані наводили як середнє значення ± стандартна помилка. Спектри кожного зразка реєстрували тричі, для аналізу використовували середні значення. Аналіз спектрів і статистичну обробку результатів виконували в програмі «Microcal Origin 8.0» («OriginLab Corporation» США).

### Результати та обговорення

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

Як видно з таблиці, «гідрофільний» ГЛ (коefficient розподілу *n*-октанол-вода  $K_p$  становить 0,005) порівняно з іншими КП найменше впливає на параметри флуоресценції ДМАФ. У досліджених концентраціях ГЛ практично не змінює форму і положення спектра, лише дещо підвищує його інтенсивність.

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

meter (USA) with automatic correction. The inlet and outlet slit width of monochromator was 5 nm. The DMAF fluorescence was excited by light with 405 nm wavelength. The optical density of samples did not exceed 0.05 to 0.1 units at the excitation wavelength of fluorescence.

To specify the position of bands that did not have a pronounced maximum, the DMAF fluorescence spectra were deconvoluted by the program of V.G. Pivovarenko *et al.* [22]. Each experiment was repeated 5 times ( $n = 5$ ). Data were reported as mean ± standard error. The spectra of each sample were recorded three times, by using the average values for analysis. The spectral analysis and statistical processing of the results obtained were performed with Microcal Origin 8.0 software (OriginLab Corporation, USA).

### Results and discussion

When analyzing the impact of cryoprotectants on DMAF probe fluorescence, they were found to change the spectral intensity ( $I_{\max}$ ), position ( $\lambda_{\max}$ ) and shape.

Table shows a ‘hydrophilic’ GL (the coefficient of distribution  $C_d$  of *n*-octanol-water is 0.005) to have the least impact on DMAF fluorescence parameters if compared with other CP. Within the studied concentrations, GL did not virtually alter the spectral shape and position, but slightly increased its intensity.

In contrast, DMAc as one of the most ‘hydrophobic’ cryoprotectants (*n*-octanol-water  $C_d$  is equal to 0.233), significantly affected the position

Параметри спектрів флуоресценції зонда ДМАФ у водних розчинах кріопротекторів  
Parameters of DMAF probe fluorescence spectra in aqueous solutions of cryoprotectants

Середовище Medium	$I_{\max}$ , ум.од. $I_{\max}$ , arb. units.	$\lambda_{\max}$ , нм $\lambda_{\max}$ , nm
Вода дистильована, pH 7,2 Distilled water, pH 7.2	10 ± 1	559 ± 0,5
5 % ГЛ 5% GL	12 ± 1	559 ± 0,5
5 % ДМАЦ 5% DMAc	34 ± 2	552 ± 0,5
5 % ОЕГ <sub>n=3</sub> 5% OEG <sub>n=3</sub>	39 ± 2	558 ± 0,5
5 % ОЕГ <sub>n=25</sub> 5% OEG <sub>n=25</sub>	69 ± 1	546 ± 0,5
5 % ОЕГ <sub>n=30</sub> 5% OEG <sub>n=30</sub>	132 ± 3 (плече) 132 ± 3 (arm)	509 ± 2,0



Цікаво, що у присутності 5% ОЕГ<sub>n=3</sub> інтенсивність спектра флуоресценції ДМАФ зростає у 3–9 рази без суттєвої зміни його положення та форми. Збільшення інтенсивності пов'язане з підвищенням в'язкості оточення зонда. При цьому зменшення кількості молекул води в оточенні незначне, оскільки в такому разі максимум флуоресценції зміщується у короткохвильовий бік внаслідок зменшення полярності оточення [24–26].

У присутності 5% ОЕГ<sub>n=25</sub> інтенсивність спектра флуоресценції ДМАФ зростає майже в 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 зміни кількості молекул води у сольватній оболонці зонда.

Деконволюція спектрів флуоресценції зонда в розчинах ОЕГ<sub>n=3</sub> і ОЕГ<sub>n=25</sub> показала, що в їх 5%-х водних розчинах присутня короткохвильова складова флуоресценції ДМАФ, але її внесок невеликий (не більше 3–5%) і суттєво не впливає на форму спектрів. У той самий час за присутності 5% ОЕГ<sub>n=30</sub> поряд із 20-разовим зростанням інтенсивності та зсувом максимуму спектра на 4 нм у короткохвильовий бік помітно змінюється і його форма (з'являється плече при 509 нм). Цей ефект є результатом значної кількості молекул ОЕГ у сольватній оболонці зонда. Поява плеча є ознакою зростання флуоресценції зонда нормальної форми у малополярному оточенні. Подібні спектральні зміни можуть свідчити про формування у водному розчині за присутності ОЕГ асоціатів молекул КП, внутрішні ділянки яких містять невелику кількість води. Утворені асоціати вбудовують у свої внутрішні ділянки молекули ДМАФ.

Отже, незважаючи на те, що у спектрах ДМАФ добре виражені обидві смуги емісії малополярних розчинників [13, 18] у воді та водних розчинах низькомолекулярних КП фотоперенесення протона (ESIPT) переважно блокується водою, і спектр стає односмуговим, що є ознакою високої концентрації молекул води в оточенні зонда. Однак кількість води зменшується у випадку більш високомолекулярного ОЕГ<sub>n=30</sub>. Значення коефіцієнта розподілу в системі *n*-октанол-вода для ОЕГ<sub>n=30</sub> наближається до нуля [3]. Оксигетильований гліцерин слід віднести до таких розчинників, які однаково добре сольватуються водою і октанолом, що можливе лише за утворення міцних сольватів із цими розчинниками. Враховуючи велику молекулярну масу та будову молекули ОЕГ<sub>n=30</sub> слід припустити, що його сольвати мають міцелярну природу.

and intensity of DMAF spectrum, resulting in 3–4 times rise of fluorescence intensity and a shift of band maximum towards the short wavelength side by 7 nm. Dimethylaminoflavone is a relatively small molecule ( $M = 281.3$  g/mol), able to simulate the lipophilicity and molecule-to-molecule interactions on an outer surface of lipid membrane (all the types of nonspecific interactions and hydrogen bonds). The joint usage of cryoprotectants and DMAF in aqueous solutions will testify to their interaction with lipid membrane surface, since the number of points of molecule-to-molecule interactions of specific and nonspecific origin with a cryoprotectant increases, and the energy of their interaction changes as well.

Of interest is to note, that in the presence of 5% ОЕГ<sub>n=3</sub>, the intensity of DMAF fluorescence spectrum increased 3–9 times with no significant change in its position and shape. The intensity enhancement was associated with an increased viscosity of probe environment. Herewith, a decrease in water molecule number in the environment was insignificant, because in this case the fluorescence maximum was shifted to the short-wave side due to a decrease in environment polarity [19, 25, 26].

In the presence of 5% ОЕГ<sub>n=25</sub>, the intensity of DMAF fluorescence spectrum increased almost 7 times, and the maximum position was shifted to the shortwave side by 13 nm without any significant changes in spectral shape. This shift testified to a significant decrease in the medium polarity as a result of a change in water molecule number in solvation shell of the probe.

The deconvolution of fluorescence spectra of the probe in ОЕГ<sub>n=3</sub> and ОЕГ<sub>n=25</sub> solutions showed the presence of a short-wavelength component of DMAF fluorescence in their 5% aqueous solutions, but its contribution was slight (not more than 3–5%) and caused no significant effect on spectral shape. At the same time, in the presence of 5% ОЕГ<sub>n=30</sub>, along with a 20-fold increase in the intensity and a shift of spectral maximum by 4 nm to a short-wave side, its shape was much changed as well (an arm appeared at 509 nm). This effect was the result of a significant number of ОЕГ molecules in solvation shell of the probe. The arm appearance testified to the fluorescence enhancement of normal shape probe in a low-polar environment. In aqueous solution in ОЕГ presence, the similar spectral changes may suggest the appearance of CP molecule associates with a small amount of water in their inner sites. The formed associates incorporate DMAF molecules into their internal sites.

Thus, despite the fact that in DMAF spectra both bands of emission of low-polar solvents [5, 10] are



При цьому отримані результати спектральної поведінки зонда ДМАФ підтверджують утворення надмолекулярних структур молекулами ОЕГ<sub>n=30</sub>, найпростішими з яких є міцели з високим рівнем гідратації, оскільки така міцела має достатній розмір, щоб молекула ДМАФ мала здатність у неї вбудовуватись. Після потрапляння міцели в середину ДМАФ дає смугу флуоресценції з максимумом 509 нм.

Нами було досліджено концентраційні залежності впливу ГЛ і ОЕГ з  $n = 3, 25$  і  $30$  на спектральні характеристики зонда ДМАФ у водному розчині окремо і в присутності ДМАЦ. Зміни положення максимуму флуоресценції при додаванні різних концентрацій кріопротекторів наведено на рис. 1.

Як можна бачити на рис. 1, А, підвищення концентрації ГЛ у водному розчині до 25% приводить до зниження інтенсивності ( $I_{\max}$ ) флуоресценції ДМАФ, яке супроводжується короткохвильовим зсувом максимуму спектра ( $\lambda_{\max}$ ) на  $(1,5 \pm 0,5)$  нм. Це може бути пояснено присутністю молекул ДМАФ у водно-гліцеринових асоціатах, які знаходяться в розчині. Дещо більший короткохвильовий зсув на  $(3,5 \pm 0,5)$  нм спектрів флуоресценції зонда спостерігається за концентрацій ГЛ у розчині понад 25%. Отриманий зсув може вказувати на перебудову структури водно-гліцеринових асоціатів у мікрооточенні молекул зонда.

У присутності аміду ДМАЦ, який має більш виражені гідрофобні властивості ( $K_p = 0,233$ ), у дослідженому діапазоні концентрацій спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції зонда ДМАФ до 45% за одночасного зсуву  $\lambda_{\max}$  у короткохвильовий бік на 11 нм (рис. 1, В). Це свідчить про взаємодію КП із ДМАФ, яка супроводжується утворенням навкруги молекул зонда сольватної оболонки, що складається з молекул ДМАЦ і води.

У суміші ГЛ:ДМАЦ зміни спектральних параметрів зонда ( $I_{\max}$  і  $\lambda_{\max}$ ) дещо менші, ніж розчину чистого ДМАЦ (рис. 1, С). Наприклад, зсув положення максимуму спектрів ДМАФ  $I_{\max}$  на 2–4 нм менше. Це є доказом зниження здатності ДМАЦ до сольватації зонда за присутності молекул ГЛ у суміші ГЛ та ДМАЦ, що свідчить про зменшення мембранотропності ДМАЦ.

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

Як видно з рис. 1, D, підвищення концентрації ОЕГ<sub>n=3</sub> у водному розчині до 4,8% призводить до різкого зростання інтенсивності флуоресценції ДМАФ, яке уповільнюється за більших концентраціях ОЕГ<sub>n=3</sub>. При цьому положення максимуму

well manifested in water and aqueous solutions of low molecular CP, the ESIPT is mostly blocked by water, and the spectrum becomes single-band, testifying to a high concentration of water molecules in probe environment. However, the amount of water decreases in case of higher molecular weight OEG<sub>n=30</sub>. The coefficient of distribution in the *n*-octanol-water system for OEG<sub>n=30</sub> is close to zero [17]. Oxyethylated glycerol should be referred to the solutions, which are equally well solvated with water and octanol, that is only possible when these solvents form strong solvates. Taking into account a high molecular weight and structure of OEG<sub>n=30</sub> molecule, we can assume its solvates to have a micellar nature. Herewith, our findings on spectral behavior of DMAF probe confirmed the formation of supramolecular structures by OEG<sub>n=30</sub> molecules, the simplest of which are the micelles with a high hydration level, since such a micelle is large enough for DMAF molecule incorporation into it. When the micelle comes inside, DMAF exhibits a fluorescence band with 509 nm maximum.

Concentration dependences of GL and OEG with  $n = 3, 25$  and  $30$  impact on spectral characteristics of DMAF probe in aqueous solution used alone and in DMAc presence, have been studied. Fig. 1 shows the changes in position of fluorescence maximum when adding cryoprotectants of various concentrations.

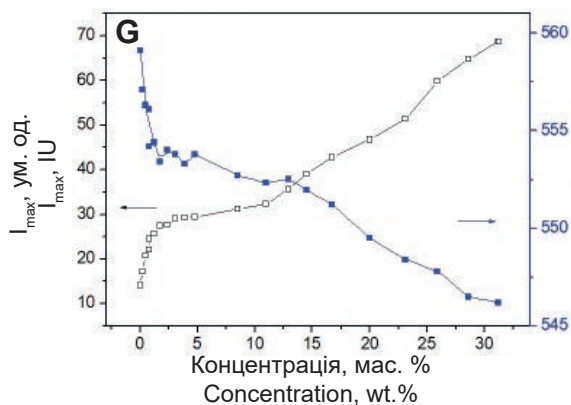
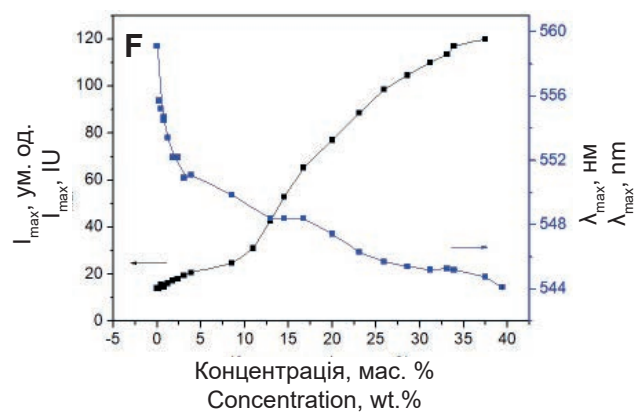
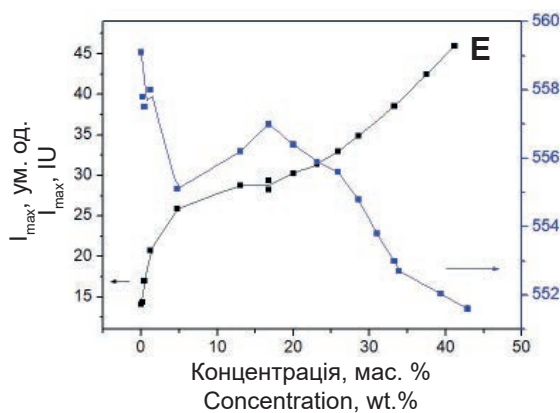
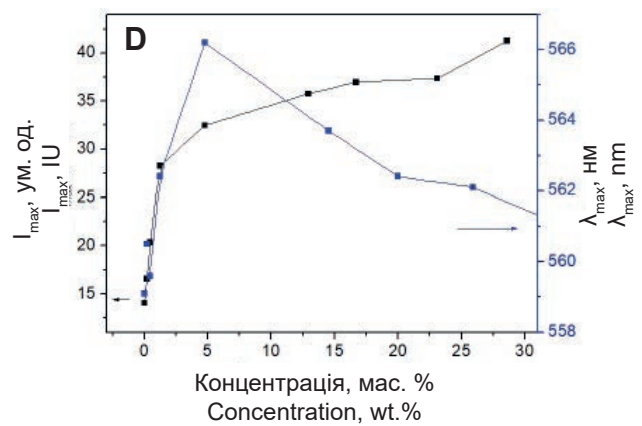
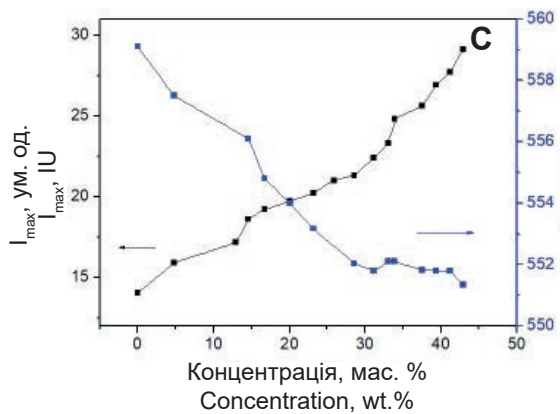
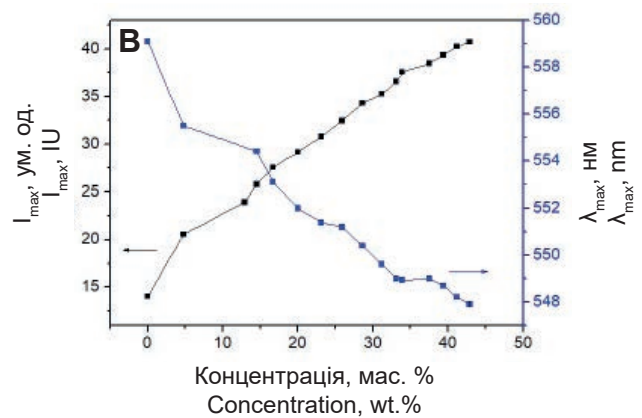
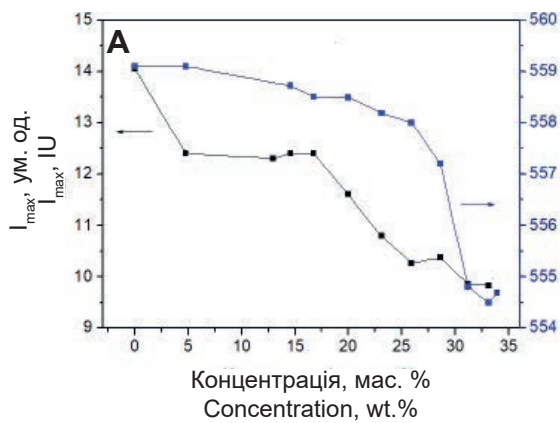
As shown in Fig. 1A, an increase in GL concentration in aqueous solution up to 25% resulted in a decrease in DMAF fluorescence intensity ( $I_{\max}$ ), accompanied by a short-wavelength shift of spectral maximum ( $\lambda_{\max}$ ) by  $(1.5 \pm 0.5)$  nm. This can be interpreted by the presence of DMAF molecules in water-glycerol associates within a solution. A slightly larger short-wavelength shift by  $(3.5 \pm 0.5)$  nm of the probe fluorescence spectra was observed when GL concentrations in solution exceeded 25%. The resulted shift may indicate a structural rearrangement of water-glycerol associates in probe molecule microenvironment.

In presence of DMAc, which has more pronounced hydrophobic properties ( $C_d = 0.233$ ) within the studied concentration range, we observed an increase in fluorescence intensity of DMAF probe up to 45% with a simultaneous shift of  $\lambda_{\max}$  to a short-wave side by 11 nm (Fig. 1B). This testified to the interaction of CP with DMAF, accompanied by forming around the probe molecules of solvation shell, consisting of DMAc and water molecules.

In the GL:DMAc mixture, the changes in probe spectral parameters ( $I_{\max}$  and  $\lambda_{\max}$ ) were slightly lower than for pure DMAc solutions (Fig. 1C).







**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: **A** – гліцерин; **B** – ДМАЦ; **C** – ДМАЦ + гліцерин; **D** – ОЕГ<sub>n=3</sub>; **E** – ДМАЦ + ОЕГ<sub>n=3</sub>; **F** – ОЕГ<sub>n=25</sub>; **G** – ДМАЦ + ОЕГ<sub>n=25</sub>.

**Fig. 1.** Impact of cryoprotectants and their mixtures (1:1, wt.%) on intensity ( $I_{\max}$ ) and maximum position ( $\lambda_{\max}$ ) of DMAF probe fluorescence spectra in aqueous solution, pH 7.2: **A** – glycerol; **B** – DMAc; **C** – DMAc + glycerol; **D** – OEG<sub>n=3</sub>; **E** – DMAc + OEG<sub>n=3</sub>; **F** – OEG<sub>n=25</sub>; **G** – DMAc + OEG<sub>n=25</sub>.

спектрів флуоресценції ДМАФ має різну направленість: за концентрації ОЕГ<sub>n=3</sub> у розчині до 4,8% параметр  $\lambda_{\max}$  зсувається у довгохвильовий бік на  $(8 \pm 0,5)$  нм, а за збільшення концентрації ОЕГ<sub>n=3</sub> до 30% – у короткохвильовий бік на  $(5 \pm 0,5)$  нм.

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

Отримані результати вказують на складний концентраційно-залежний характер взаємодії компонентів у системі ОЕГ<sub>n=3</sub> та ДМАЦ. Зростання інтенсивності флуоресценції зонда без змін форми спектра, як правило, пов'язують зі збільшенням в'язкості його мікрооточення [25, 26].

Такий ефект може виникати внаслідок оточення зонда великорозмірними агрегатами ліпофільних молекул. При цьому молекули води вилучаються з його гідратної оболонки. Оскільки оксиетильовані похідні ГЛ – гідрофільні молекули ( $K_p$  для ОЕГ знаходиться в межах 0–0,03) [3], то збільшення параметра  $I_{\max}$  є результатом взаємодії ОЕГ із ДМАЦ і наступного проникнення зонда в утворені асоціати, у яких він сольватується переважно більш ліпофільним компонентом – ДМАЦ. Можна припустити, що ОЕГ<sub>n=3</sub> (має невелику ліпофільність) вже при концентрації 4,8% здатний ефективно взаємодіяти з поверхнею біомембран із заміщенням у ній молекули води. При більш високих концентраціях КП цей процес інтенсифікується.

Можна переконатися, що присутність ДМАЦ подібним чином впливає на спектри зонда в розчинах ОЕГ<sub>n=25</sub> зменшенням довгохвильового зсуву максимуму флуоресценції (рис. 1, F і G). Проте, на відміну від ОЕГ<sub>n=3</sub>, у розчинах ОЕГ<sub>n=25</sub> за низьких концентрацій кріопротекторів у суміші (до 5%) спостерігається кооперативний ефект – у присутності ДМАЦ суттєво зростає інтенсивність флуоресценції порівняно з монорозчинами ОЕГ<sub>n=25</sub>. Цей ефект свідчить про агрегацію ОЕГ із ДМАЦ і наступну сольватацію зонда в агрегаті переважно більш ліпофільним компонентом (ДМАЦ) зі значним зменшенням вмісту води в сольватній оболонці зонда. Вочевидь, ДМАЦ ініціює перебудову гідратної оболонки молекул ОЕГ<sub>n=25</sub>. Слід зазначити, що поєднання у захисному середовищі ОЕГ<sub>n=25</sub> і ДМАЦ сприяє значному підвищенню осмотичної стійкості розморожених еритроцитів [4].

Відома здатність ОЕГ до міцелоутворення [8, 9]. При цьому підвищення ступеня полімеризації від 5 до 25 призводить до росту критич-

For example, a shift of DMAF spectral maximum  $I_{\max}$  was 2–4 nm smaller, that proved a decrease in DMAc ability of probe solvation in presence of GL molecules within GL and DMAc mixture, thus testifying to DMAc membranotropy reduction.

The Fig. 1D and E display changes in DMAF fluorescence parameters ( $I_{\max}$  and  $\lambda_{\max}$ ) in presence of OEG<sub>n=3</sub> and its mixture with DMAc.

As shown in Fig. 1D, an increase in OEG<sub>n=3</sub> concentration in aqueous solution up to 4.8% entailed a sharp augmentation of DMAF fluorescence intensity, slowing down at higher concentrations of OEG<sub>n=3</sub>. Herewith, the position of DMAF fluorescence spectral maximum had a different orientation: when the OEG<sub>n=3</sub> concentration in solution was up to 4.8%, the  $\lambda_{\max}$  parameter was shifted to a long-wavelength side by  $(8 \pm 0.5)$  nm, but when increasing up to 30%, the shift was to a short-wavelength side by  $(5 \pm 0.5)$  nm.

The DMAc presence affected the nature of spectral changes in OEG<sub>n=3</sub> within the entire studied range of concentrations, thus reflecting in the increased total short-wavelength shift of spectra and acceleration of their intensity if compared with OEG<sub>n=3</sub> monosolutions (Fig. 1E).

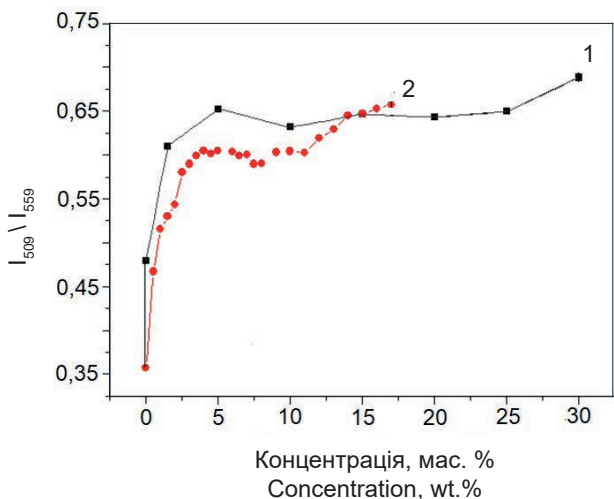
Our findings demonstrated the complex concentration-dependent interaction patterns between components within the OEG<sub>n=3</sub> and DMAc system. An enhanced fluorescent intensity of the probe without any changes in spectral shape was usually associated with increased viscosity of its microenvironment [25, 26].

This effect may occur when the probe is surrounded by large size aggregates of lipophilic molecules. Herewith, the water molecules are removed from its hydrate shell. Since the oxyethylated derivatives of GL are hydrophilic molecules ( $C_d$  for OEG is within 0–0.03) [17], an increase in  $I_{\max}$  parameter is the result of OEG interaction with DMAc and further penetration of the probe into formed associates, where it is mostly solvated by more lipophilic component, *i. e.* DMAc. We may assume OEG<sub>n=3</sub> (it has low lipophilicity), even at 4.8% concentration to be able of efficient interaction with biomembrane surface by displacing water molecules in it. This process may be intensified at higher concentrations of CP.

We can see that the DMAc presence similarly affects the probe spectra in OEG<sub>n=25</sub> solutions by reducing a long-wavelength shift of fluorescence maximum (Fig. 1F and G). However, in contrast to OEG<sub>n=3</sub>, in the OEG<sub>n=25</sub> solutions at low cryoprotectant concentrations in the mixture (up to 5%) we observed a cooperative effect, *i. e.* in DMAc presence there was a significant rise of fluorescence intensity







**Рис. 2.** Криві відношення інтенсивностей нормальної (N<sup>\*</sup>-) і таутомерної (T<sup>\*</sup>-) форм зонда ДМАФ у водному розчині OEG<sub>n=30</sub> (1) і суміші (1 : 1) ДМАЦ : OEG<sub>n=30</sub> (2).

**Fig. 2.** Curves of intensity ratio of normal (N<sup>\*</sup>-) and tautomeric (T<sup>\*</sup>-) DMAF probe forms in aqueous solution of OEG<sub>n=30</sub> (1) and DMAc: OEG<sub>n=30</sub> mixture (1:1) (2).

ної концентрації міцелоутворення (ККМ), яка для OEG<sub>n=25</sub> становить 2,5%. Такі зміни пов'язують із підвищенням впливу гідрофільної частини в молекулі OEG<sub>n=25</sub>. Додавання ДМАЦ зменшує величину ККМ. Зокрема показано, що після змішування OEG<sub>n=25</sub> із ДМАЦ ККМ зменшується з 2,5 до 0,25%. Даний ефект вважають результатом утворення змішаних міцел [9, 19].

З рис. 2 (крива 1) видно, що за вмісту OEG<sub>n=30</sub> у розчині більш 1% на кривій спостерігається злам відношення інтенсивності N<sup>\*</sup>-форми й T<sup>\*</sup>-форми зонда ДМАФ, який свідчить про різку зміну полярності його мікрооточення. Можна припустити, що за вищезазначеної концентрації відбувається перебудова асоціатів, які у розчині утворює OEG<sub>n=30</sub>. При цьому присутність ДМАЦ практично не впливає на положення точки зламу (рис. 2, крива 2). Вочевидь, останнє спостереження пояснює більш низьку захисну ефективність OEG<sub>n=30</sub> у процесі кріоконсервування клітин крові порівняно з OEG<sub>n=25</sub> [2, 4, 5]. Показано, що більш стабільні міцелярні структури OEG<sub>n=30</sub> гірше зв'язуються з ліпідною мембраною, ніж OEG<sub>n=25</sub>. На більшу стабільність міцелярних структур OEG<sub>n=30</sub> також вказує подібність кривої OEG<sub>n=25</sub> та ДМАЦ (див. рис. 1, G) з кривими OEG<sub>n=30</sub> (рис. 2) без та в присутності ДМАЦ. Оскільки міцелоутворення розчинів OEG<sub>n=25</sub> вже є вивченим [9], таке порівняння додатково підтверджує факт міцелоутворення для водних розчинів OEG<sub>n=30</sub>.

Таким чином, усі дослідженні оксиетильні похідні ГЛ більшою мірою, ніж початкова сполука (ГЛ), впливають на спектральні парамет-

if compared with OEG<sub>n=25</sub> monosolutions. This effect testified that the aggregation of OEG with DMAc and further probe solvation in aggregate mostly occurred by more lipophilic component, *i. e.* DMAc, when the water content in the probe solvation shell was significantly decreased. Obviously, DMAc initiated the rearrangement of hydration shell of OEG<sub>n=25</sub> molecules. It should be noted that combining OEG<sub>n=25</sub> and DMAc in protective medium ensured a significant increase in osmotic resistance of post-thaw erythrocytes [20].

The ability of OEG to micelle formation is well known [24, 4]. Herewith, an increase in degree of polymerization from 5 to 25 results in a rise of critical concentration of micelle formation (CCMF), which for OEG<sub>n=25</sub> makes 2.5%. These changes are associated with an increased impact of hydrophilic part in OEG<sub>n=25</sub> molecule. The DMAc supplement reduces the CCMF value. In particular, mixing OEG<sub>n=25</sub> with DMAc was shown to decrease CCMF from 2.5 down to 0.25%. This effect is considered as a result of the mixed micelle formation [4, 12].

Fig. 2 (curve 1) demonstrates a break in the intensity ratio of N<sup>\*</sup>- and T<sup>\*</sup>- form of DMAF probe, if OEG<sub>n=30</sub> content in solution exceeds 1%, thus testifying to a sharp change in polarity of probe microenvironment. The above concentration may be assumed to cause a rearrangement of associates, formed by OEG<sub>n=30</sub> in a solution. Herewith, the DMAc presence had almost no impact on breakpoint position (Fig. 2, curve 2). Obviously, the lower protective efficiency of OEG<sub>n=30</sub> as compared with OEG<sub>n=25</sub> during blood cell cryopreservation may be explained by the latter observation [16, 20, 21]. More stable micellar structures of OEG<sub>n=30</sub> were shown to bind worse to lipid membrane than OEG<sub>n=25</sub>. The higher stability of micellar structures OEG<sub>n=30</sub> was also indicated by the similarity of curve OEG<sub>n=25</sub> and DMAc (see Fig. 1G) with those of OEG<sub>n=30</sub> (Fig. 2) with and without DMAc. Since the micelle formation of OEG<sub>n=25</sub> solutions is already clear [4], this comparison further confirms the fact of micelle formation for OEG<sub>n=30</sub> aqueous solutions.

Thus, all the studied oxyethylated derivatives of GL affected the spectral parameters of DMAF probe to a greater extent than the initial compound (GL), thus reflecting in the intensity rise, change in maximum position and spectral shape of the latter. In OEG<sub>n=30</sub> solutions, along with an increased intensity of probe fluorescence by more than ten times, the spectral shape was also transformed, and became two-band (Table 1). The revealed changes exhibited both the viscosity increase and me-



ри зонда ДМАФ, що відображається у зростанні інтенсивності, зміні положення максимуму та форми спектра останнього. В розчинах ОЕГ<sub>n=30</sub>, поряд із зростанням більш ніж на порядок інтенсивності флуоресценції зонда, також перетворюється форма спектра, який стає дво-смуговим (таблиця). Встановлені зміни свідчать як про збільшення в'язкості, так і про зневоднення середовища в оточенні зонда. Присутність ДМАЦ у розчині посилює спектральні ефекти збільшення в'язкості та зневоднення середовища в оточенні зонда. На підставі даного факту можна стверджувати про утворення спільних міцелярних агрегатів ОЕГ та ДМАЦ. Як і поліетиленгліколі ОЕГ у присутності ліпідних біомембран утворює зв'язки з їх поверхнею, витісняючи звідти значну кількість молекул води [16, 17]. Високомолекулярні ОЕГ мають вищу енергію агрегації з мембранами внаслідок збільшення кількості точок міжмолекулярних взаємодій специфічної та неспецифічної природи.

Отримані дані перспективні для вивчення цитотоксичності та кріозахисної дії багатокомпонентних середовищ на основі комбінацій гліцерину та його оксиетильних похідних при заморожуванні клітинних суспензій.

### Висновки

Методом флуоресцентного зондування встановлено, що комбінація ГЛ і його оксиетильних похідних із ДМАЦ знижує потенційні мембранотропні властивості окремих кріопротекторів, що входять до складу суміші. Комбінація як ГЛ, так і його низькомолекулярного похідного ОЕГ<sub>n=3</sub> із ДМАЦ знижує потенційні мембранотропні властивості ДМАЦ. У той самий час комбінація високомолекулярних похідних (ОЕГ<sub>n=25</sub> та ОЕГ<sub>n=30</sub>) із 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 із поверхневою і біляповерхневою зонами біомембран.

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

dium dehydration around the probe. The DMAc presence in the solution enhanced the spectral effects of viscosity increase and medium dehydration around the probe. Proceeding from this fact we may state about the formation of joint micellar aggregates of OEG and DMAc. Like other types of polyethylene glycols, OEG in the presence of lipid biomembranes forms bonds with their surface, by displacing a significant number of water molecules [8, 9]. High molecular weight OEGs have higher aggregation energy with membranes due to an increase in point number of molecule-to-molecule interactions of specific and nonspecific nature.

Our findings are promising to study the cytotoxicity and cryoprotective effect of multicomponent media based on combining glycerol and its oxyethylated derivatives during cell suspension freezing.

### Conclusions

Using the fluorescence probe method, the combination of GL and its oxyethylated derivatives with DMAc was revealed to reduce the potential membranotropic properties of certain cryoprotectants within a mixture. The combination of both GL and its low molecular weight derivative OEG<sub>n=3</sub> with DMAc decreased the potential membranotropic properties of DMAc. Herewith, the combination of high molecular weight derivatives (OEG<sub>n=25</sub> and OEG<sub>n=30</sub>) with DMAc reduced the potential membranotropic properties of OEG or their ability to non-polar interaction with membranes. The OEG<sub>n=30</sub> at concentrations above 1 wt.% was found to form the micelle-type structures or micelle aggregates in an aqueous solution. This fact suggests a membranotropic ability of high molecular weight OEG associates to be stipulated by a possible interaction of their segments with a surface and near-surface regions of biomembranes.

Thus, the structural rearrangement of molecular associates in solutions of mixtures of low- and high-molecular weight cryoprotectants can be considered as one of the mechanisms of experimentally established reduction of cytotoxicity in combined cryoprotective media.

### References

1. Bakaltcheva IB, Odeyale CO, Spargo BJ. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 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.



## Література

1. Грищенко ВІ, Дюбко ТС, Пивоваренко ВГ, Лінник ТП, винахідники; Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб визначення мембранотропної активності криопротектора. Патент України на корисну модель №13838. 17.04.2006.
2. Компанієць АМ, Ніколенко ОВ, Чеканова ВВ, та ін. Криозахисна ефективність середовищ на основі оксиетильних похідних поліолів при заморожуванні еритроцитів людини. *Проблеми криобіології*. 2008; 18(3): 299 – 301.
3. Компанієць АМ, Чеканова ВВ, Ніколенко АВ, и др. Синтез, физико-химические свойства оксиетильных производных глицерина. Криозащитные среды на основе комбинаций криопротекторов для замораживания биологических объектов. В: Гольцев АН, редактор. *Актуальные проблемы криобіології и криомедицины*. Харьков; 2012. С. 26–73.
4. Пахомова ЮС, Чеканова ВВ, Компанієць АМ. Криозащитные свойства растворов на основе непроникающего ОЭГ<sub>n=25</sub> в комбинации с проникающими криопротекторами при замораживании эритроцитов человека. *Проблеми криобіології и криомедицины*. 2013; 23(1): 26–39.
5. Пахомова ЮС, Кулешова ЛГ, Компанієць АМ. Трансформация эритроцитов на этапах криоконсервирования в криозащитных средах на основе оксиэтилированных производных глицерина со степенью полимеризации  $n=25$  и  $n=30$ . *Проблеми криобіології и криомедицины*. 2016; 26(4): 349–60.
6. Пивоваренко ВГ. Дизайн флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксихромонів та їх аналогів. *Ukrainica Bioorganica Acta*. 2002; 1(1): 40–9.
7. Рошаль АД, Дюбко ТС, Лінник ТП. 4'-диметиламинофлавонол – новый флуоресцентный зонд для оценки криопротекторных свойств органических веществ в водных растворах. *Биофизический вестник ХНУ им. В.Н. Каразина*. 2005; (16): 106–11.
8. Русанов АИ. *Мицеллообразование в растворах ПАВ*. Санкт-Петербург: Химия; 1992. 528 с.
9. Чеканова ВВ, Пахомова ЮС, Компанієць АМ. Мицеллообразование в растворах оксиэтилированных глицеринов и комбинированных средах на их основе. *Вестник университета ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия «Химия»*. 2016; 26: 40–4.
10. Bakaltcheva IB, Odeyale CO, Spargo BJ. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1280 (1): 73–80.
11. 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.
12. Chattoraj S, Chowdhury R, Ghosh S, Bhattacharyya K. Heterogeneity in binary mixtures of dimethyl sulfoxide and glycerol: fluorescence correlation spectroscopy. *J Chem Phys [Internet]*. 2013 Jun 07 [cited 2019 Feb 12]; 138(21): 214507. 11 Available from: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4808217>.
13. 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. *J Polish Chem*. 2002; 76(9): 1287–99.
14. Douhal A, Roshal AD, Organero JA. Stepwise interactions, sodium ion photoejection and proton-transfer inhibition in a crown-ether and proton-transfer dye. *Chemical Physics Letters*. 2003; 381(3–4): 519–25.
15. 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): 196–200.
16. Duthel D, Underhaug Gjerde A, Petit-Paris I, et al. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection. *J Chem Biol*. 2009, 2(1), 39–49.
17. Ercelen S, Klymchenko AS, Demchenko AP. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities. *Anal Chim Acta*. 2002; 464(2): 273–87.
18. 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. *J Polish Chem*. 2002; 76(9): 1287–99.
19. Douhal A, Roshal AD, Organero JA. Stepwise interactions, sodium ion photoejection and proton-transfer inhibition in a crown-ether and proton-transfer dye. *Chemical Physics Letters*. 2003; 381(3–4): 519–25.
20. 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): 196–200.
21. Duthel D, Underhaug Gjerde A, Petit-Paris I, et al. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection. *J Chem Biol*. 2009, 2(1), 39–49.
22. Ercelen S, Klymchenko AS, Demchenko AP. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities. *Anal Chim Acta*. 2002; 464(2): 273–87.
23. Chattoraj S, Chowdhury R, Ghosh S, Bhattacharyya K. Heterogeneity in binary mixtures of dimethyl sulfoxide and glycerol: fluorescence correlation spectroscopy. *J Chem Phys [Internet]*. 2013 Jun 07 [cited 2019 Feb 12]; 138(21): 214507. 11 Available from: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4808217>.
24. 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: 40–4. Russian.
25. 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.
26. Douhal A, Roshal AD, Organero JA. Stepwise interactions, sodium ion photoejection and proton-transfer inhibition in a crown-ether and proton-transfer dye. *Chemical Physics Letters* 2003; 381(3–4): 519–25.
27. 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): 196–200.
28. Duthel D, Underhaug Gjerde A, Petit-Paris I, et al. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection. *J Chem Biol*. 2009, 2(1), 39–49.
29. Ercelen S, Klymchenko AS, Demchenko AP. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities. *Anal Chim Acta* 2002; 464(2): 273–87.
30. Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* 2010; 60(3): 45–53.
31. 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.
32. Holmberg K. *Surfactants and polymers in aqueous solutions*. Chichester: John Wiley and Sons; 2002. 545 p.
33. 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.
34. Klymchenko AS, Duportail G, Turan O, et. Novel two-band ratiometric fluorescence probes with different location and orientation in phospholipid membranes. *Chem Biol*. 2002; 9(11): 1199–208.
35. 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.
36. 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 Cryomed*. 2008; 18(3): 299–301.
37. Kompaniets AM, Chekanova VV, Nikolenko AV, et al. [Synthesis, physico-chemical properties of hydroxyethyl glycerol derivatives. Cryoprotective environments based on combination of cryoprotectants for freezing biological objects]. In: Goltsev AN, editor [Actual problems of cryobiology and cryomedicine]. Kharkiv; 2012. P. 26–73. Russian
38. 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.
39. 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.
40. Pakhomova YuS, Chekanova VV, Kompaniets AM. Cryoprotective properties of solutions based on non-penetrative





18. Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*. 2010; 60(3): 545–53.
19. Holmberg K. Surfactants and polymers in aqueous solutions. Chichester: John Wiley and Sons; 2002. 545 p.
20. 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; 120(43): 11214–28.
21. 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.
22. Klymchenko AS, Mely Y, Demchenko AP, et al. Simultaneous probing of hydration and polarity of lipid bilayers with 3-hydroxyflavone fluorescent dyes. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*. 2004; 1665(1-2): 6–19.
23. 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.
24. 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.
25. Smith MA, Neumann RM, Webb RA. A modification of the Algar-Flynn-Oyamada preparation of flavonols. *J Heteroc Chem*. 1968; 5(3): 425–6.
26. Yushchenko DA, Shvadchak VV, Klymchenko AS, et al. Modulation of excited-state intramolecular proton transfer by viscosity in protic media. *The J Phys Chem A*. 2007; 111(42); 10435–8.
- OEG n=25 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. Pivovarenko VG [Design of fluorescent probes based on 3-hydroxychromones and analogs.] *Ukrainica Bioorganica Acta*. 2002; 1 (1); 40–49. Ukrainian.
23. Roshal AD, Dyubko TS, Linnik TP. [4'-dimethylaminoflavone – 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; (16): 106–11. Russian.
24. Rusanov AI. [Micelle formation in surfactant solutions]. St.-Petersburg: Khimia; 1992. 528 p. Russian.
25. Smith MA, Neumann RM, Webb RA. A modification of the Algar-Flynn-Oyamada preparation of flavonols. *J Heteroc Chem* 1968; 5(3): 425–6.
26. Yushchenko DA, Shvadchak VV, Klymchenko AS, et al. Modulation of excited-state intramolecular proton transfer by viscosity in protic media. *The J Phys Chem A*. 2007; 111(42); 10435–8.

