

Исследование методом ЭПР влияния замораживания на структурно-функциональное состояние мембран митохондрий

UDC 57.043:576.311.347:577.334

O.A. NARDID

EPR Study of Freezing Effect on Structural-Functional State of Mitochondrial Membrane

Методом ЭПР спиновых зондов изучены структура и электронтранспортная функция мембран митохондрий печени крыс. Установлено, что при однократном быстром замораживании органелл до температуры -196°C увеличивается рыхлость мембраны митохондрий без структурных изменений, затрагивающих состояние белков цепи переноса электронов. Двукратное быстрое замораживание суспензии митохондрий приводит к значительному нарушению структурной организации мембран, вызывая исчезновение термотропного структурного перехода в области 10°C .

Ключевые слова: замораживание-отогрев, митохондрии, электронный парамагнитный резонанс, восстановление спинового зонда, структурные перестройки.

Методом ЕПР спинових зондів вивчені структура і електронтранспортна функція мембран митохондрій печінки шурів. Установлено, що однократне швидке заморожування органел до температури -196°C приводить до зміни рихлості мембрани митохондрій без структурних змін у ній, які порушують стан білків ланцюга переносу електронів. Двукратне швидке заморожування суспензії митохондрій призводить до значного порушення структурної організації мембран, викликаючи зникнення термотропного структурного переходу в зоні 10°C .

Ключові слова: заморожування-відігрів, митохондрії, електронний парамагнітний резонанс, відновлення спинових зонда, структурні перебудови.

Structure and electron transport function of rat liver mitochondria membranes have been studied by EPR method of spin probes. It is established that at single rapid freezing of organelles down to -196°C there is an increase in the looseness of membranes of mitochondria without its structural changes, affecting the condition of proteins of electron transfer chain. Two-fold rapid freezing of suspension of mitochondria results in significant damage of membrane structural organization, inducing the disappearing of thermotropic structural transition in the range of 10°C .

Keywords: freeze-thawing, mitochondria, electron paramagnetic resonance, spin probe reduction, structure reorganization.

Митохондрии представляют собой достаточно удобную модель для изучения криповреждений [1, 4, 24], поскольку имеют структурированную мембрану, в которой сосредоточены каталитические системы дыхания и окислительного фосфорилирования [9, 22]. Это позволяет одновременно регистрировать взаимозависимость структурных и функциональных изменений при понижении температуры и замораживании органелл [2, 15, 19]. Известно, что при замораживании и последующем отогреве митохондриальной фракции клеток печени крыс происходит повреждение органелл [25]. Поскольку дыхательные переносчики и ферменты, регулирующие энерготранспортные процессы, расположены на внутренней мембране митохондрий, основные криобиологические исследования этих органелл были сфокусированы главным образом на структурных изменениях внутренней мембраны. Наружная же мембрана при обычных

Mitochondria are quite convenient model for the studying of cryodamage [1, 4, 24], as having the structured membrane with the enzymatic respiratory oxidative phosphorylation systems [9, 22]. It enables to register at the same time the correlation of structural and functional changes at temperature decrease and freezing of organelles [2, 15, 19]. It has been known, that during freezing and following thawing of mitochondrial fraction of rats' liver cells the damage of organelle occurs [25]. As respiratory mediators and enzymes regulating the energy-transport processes are situated in internal membrane of mitochondria, major cryobiological research of these organelles was focused mainly to structural changes of internal membrane. But external membrane under standard conditions is permeable for biomolecules, having the molecular mass of several thousands of dalton. Protein components of mitochondrial membranes have a significant role in low-temperature resistance of organelles, because lateral

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

*Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

*Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

условиях проницаема для биомолекул с молекулярной массой в несколько тысяч дальтон. Белковые компоненты мембран митохондрий играют, по видимому, существенную роль в холодоустойчивости органелл, поскольку латеральная и трансмембранная подвижность липидов в мембране зависит от состояния мембранных белков, которые снижают энергию взаимодействия компонентов мембраны и изменяют температуру фазовых переходов [16, 20]. Однако до конца не выяснено, каким образом модификация структуры мембраны под влиянием фазовых переходов связана с нарушением основных функций мембраны при охлаждении. Следует полагать, что причинами изменений являются нарушение транспорта ионов, активация перекисного окисления липидов, мембрановстроенных фосфолипаз и т.д. Не исключено, что охлаждение приводит к изменению активности ферментов не только под влиянием неспецифических факторов (например изменения проницаемости и активации фосфолипаз), но и в результате нарушения структуры микроокружения ферментов.

Учитывая, что термотропные структурные перестройки мембран митохондрий оказывают влияние на процесс восстановления спиновых зондов цепью дыхания субклеточных структур (излом на зависимости Аррениуса [10]), интересно использовать этот подход для изучения структурно-функционального состояния мембран митохондрий после замораживания и последующего отогрева.

Цель работы – изучение влияния замораживания и последующего отогрева суспензии митохондрий на процесс восстановления спинового зонда в суспензии в температурном диапазоне, при котором происходят структурные перестройки мембран клеточных органелл, для оценки состояния дыхательной функции мембран органелл в этих условиях.

Материалы и методы

Митохондрии клеток печени крыс выделяли при помощи дифференциального центрифугирования, используя незначительную модификацию метода [11].

Окислительно-восстановительную активность биологических суспензий исследовали методом ЭПР спиновых зондов [5, 7] с помощью водорастворимого зонда ТЕМПОН (2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил) фирмы “Aldrich”. Данный иминоксильный радикал хорошо растворим в воде и других полярных растворителях. Конечная концентрация зонда в образцах составляла $0,8 \times 10^{-4} \text{M}$. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре “Брукер” ER 100D (Германия) со стандартной термоприставкой. Развертка магнитного поля составляла 100 Гс, постоянная времени – 0,5 с, время

and transmembrane motility of lipids in membrane depends on state of membrane proteins, decreasing the energy of membrane components interaction and changing temperature of phase transitions [16, 20]. However it was not cleared completely, how the modification of membrane structure under effect of phase transitions was associated with the damages of basic functions of membrane during cooling. One should suppose that these changes are caused by disorders of ion transport, activation of lipid peroxidation and membrane phospholipases etc. It is possible that cooling changes the enzymatic activity not only through non-specific factors (*e. g.* changes in permeability and phospholipase activity), but also as the result of damage of enzyme microenvironment structure.

Considering that the thermotropic transformation of mitochondrial membranes affects the process of spin probe reduction by the respiratory chain of subcellular structures (kink on the Arrhenius' dependence [10]), it is interesting to use this method for studying the structure-functional state of mitochondria membranes after freezing and following thawing.

The research aim was to study the effect of freezing and following thawing of mitochondria suspension on reduction process of spin probe in suspension within temperature range, wherein the restructuring of cell membranes of organelles takes place, to evaluate the state respiratory function of organelle membranes under these conditions.

Materials and methods

Rat liver cell mitochondria were isolated with differential centrifugation, using insignificant modification of the method [11].

Redox activity of biological suspensions was studied by spin probes EPR method [5, 7] with water-soluble TEMPON probe (2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidine-1-oxyl, Aldrich, USA). This iminoxyl radical is highly soluble in water and other polar solvents. The final concentration of probe in the samples was $0.8 \times 10^{-4} \text{M}$. The spectra of EPR were recorded with “Bruker” ER 100D spectrometer (Germany) with standard thermo-attachment. Sweep of magnetic field was 100 Gs, response time was 0.5 sec, sweep time was 100 sec. In experiments the glass capillaries with inner diameter of 500 nm and 0.1 ml volume were used. The control experiments showed that under described conditions the spectra were not distorted due to over-modulation or inertial effects.

For standardization of experimental conditions the EPR signal of the standard crystal with chrome inclusions was recorded at the same time with EPR probe signal.

As a kinetic parameter of spin probe reduction the relative time changes of mean field component amplitude of probe EPR spectra (h_0) were used.

развертки – 100 с. В исследованиях использовали стеклянные капилляры с внутренним диаметром 500 нм и объемом 0,1 мл. Контрольные опыты показали, что при описанных условиях спектры не искажаются в результате перемодуляции или инерционных эффектов.

Для стандартизации условий эксперимента одновременно с сигналом ЭПР зонда регистрировали сигнал ЭПР стандарта, представляющий собой кристалл с вкраплениями хрома.

В качестве параметра кинетики восстановления спиновых зондов использовали относительные изменения амплитуды среднеполюсного компонента спектра ЭПР зонда (h_0) во времени.

Суспензию митохондрий замораживали в полимерных ампулах объемом 0,7 мл со скоростью 300–400°C/мин до температуры –196°C, отогревали на водяной бане при 36°C.

Тепловую денатурацию митохондрий осуществляли нагреванием суспензии митохондрий до 100°C.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения “Statistica v. 5.0” и “Origin 6.1”. Использовали методы параметрического (t-критерий Стьюдента) и непараметрического (критерий Вилкоксона) анализов.

Результаты и обсуждение

Исследования свежеприготовленных препаратов митохондрий и субмитохондриальных частиц методом спиновых зондов демонстрируют быстрое восстановление иминоксильных радикалов [7, 8, 13]. Считается, что в этом проявляется роль окислительно-восстановительных систем органелл, в частности их дыхательной цепи. Подтверждением роли окислительно-восстановительной функции митохондрий в восстановлении спиновых зондов является меньшая восстанавливающая способность митохондрий, подвергнутых деструкции, чем целых митохондрий [7]. Кроме того, тепловая денатурация ферментов полностью нарушает процессы, связанные с переносом электронов, и зонд при этом не восстанавливается [7, 13]. Существует предположение о восстановлении нитроксидов в основном за счет взаимодействия с семихинонами, в частности коэнзимом Q [5]. Ингибиторный анализ дыхания митохондрий показал, что спиновый зонд принимает электроны на участке дыхательной цепи между местами действия ротенона и антимицина А [14, 23]. Полученные данные свидетельствуют о локализации восстанавливающих ферментов в области электронтранспортной цепи между флавином и цитохромом B_5 . Поэтому процесс восстановления спиновых зондов митохондриями можно использовать как для оцен-

Suspension of mitochondria was frozen in 0.7 ml polymer tubes at 300–400°C/min rate down to –196°C, thawed on water bath at 36°C.

Thermal denaturation of mitochondria was performed by heating of mitochondrial suspension up to 100°C.

Obtained results were statistically processed using Statistica v. 5.0. and Origin 6.1 software. Parametric (Student's t-criterion) and non-parametric (Wilcoxon's criterion) methods of analysis were used.

Results and discussion

The studies of freshly isolated mitochondria and sub-mitochondrial particles by spin probe method show rapid reduction of aminoxyl radicals [7, 8, 13]. It is assumed that the role of redox systems of organelles is manifested in such a manner, particularly, of their respiratory chain. Confirmation of role of mitochondria redox function in reduction of spin probes lies in lower reduction ability of destructed mitochondria, when compared to the undamaged mitochondria [7]. In addition, thermal denaturation of enzymes completely breaks the processes, associated with electron transfer, and the probe reduction does not occur here. There is a suggestion that reduction of nitroxyls is a result of interaction with semiquinones, particularly, coenzyme Q [5]. Inhibitory test of mitochondria respiration has shown that the spin probe accepts the electrons on the respiratory chain between the action sites of rotenon and antimycin A [14, 23]. Obtained data testify to localization of reductive enzymes in the region of electron transport chain between flavin and cytochrome B_5 . Therefore the spin probe reduction process by mitochondria may be used for evaluation of both inhibition mechanism of mitochondria aerobic respiration, and disruption of structural organization of organelle membranes in a whole caused by effect of different agents. This approach was applied in this investigation to study the effect on mitochondria of freezing and following thawing.

In biological systems the component of spin probe reduction reaction being the electron donor is not spent, proton concentration in medium is high, therefore one may conclude that only iminoxyl and herewith hydroxylamin concentrations change during reaction process. Herewith the time dependence of iminoxyl concentration in reaction of spin probes reduction is a exponent, and in $\ln c$ vs. t coordinates it represents a direct line (semilogarithmic anamorphosis), where tangent of the slope angle is equal to effective constant of reaction rate (k_{eff}) [8, 13].

Kinetics of spin probe reduction must depend on quantity and activity of reductive centers as well as on their availability for radical. To confirm the dependence of reduction on quantity of reductive centers this process was studied in mitochondrial suspensions with

ки ингибирования механизма их аэробного дыхания, так и нарушений структурной организации мембран органелл в целом под воздействием различных факторов. Этот подход и был применен в представленной работе для исследования влияния на митохондрии замораживания и последующего отогрева.

В биологических системах не расходуется компонент реакции восстановления спиновых зондов, являющийся донором электронов; концентрация протонов в среде велика, поэтому можно заключить, что в процессе реакции изменяются только концентрации иминоксила и гидроксилamina. При этом зависимость концентрации иминоксила от времени в реакции восстановления спиновых зондов представляет собой экспоненту, а в координатах $\ln c, t$ – прямую линию (полулогарифмическая анаморфоза), тангенс угла наклона которой равен эффективной константе скорости реакции ($k_{эф}$) [8, 13].

Кинетика восстановления спинового зонда должна зависеть от количества, активности восстанавливающих центров и их доступности для радикала. Для подтверждения зависимости восстановления от количества восстанавливающих центров был исследован этот процесс в суспензиях митохондрий с разными концентрациями органелл. Такие эксперименты проводили по следующей схеме: имеющуюся суспензию органелл с исходной концентрацией общего белка $C = 30$ мг/мл развели средой инкубации в 1,2; 1,5; 2 раза с соответствующим уменьшением концентрации общего белка. Предполагается, что количество органелл в суспензии пропорционально концентрации общего белка в каждом конкретном случае. При этом считали также, что в каждой конкретной митохондрии количество восстанавливающих центров одинаково и постоянно, а изменение количества органелл приводит к пропорциональному изменению количества восстанавливающих центров. Из рис. 1 видно, что скорость восстановления спинового зонда уменьшается со снижением концентрации органелл в суспензии. Тепловая же инактивация ферментов нарушает процессы, связанные с переносом электронов, и зонд не восстанавливается (рис. 1, зависимость 5). Из приведенных на рис. 1 полулогарифмических анаморфоз по тангенсам угла наклона соответствующих зависимостей определены константы скорости восстановления спинового зонда в суспензиях с разной концентрацией восстанавливающих центров: при $C = 30$ мг/мл, $k_{эф} = 0,048 \pm 0,005$ мин⁻¹; $C = 25$, $k_{эф} = 0,037 \pm 0,004$; $C = 20$, $k_{эф} = 0,021 \pm 0,003$, $C = 15$, $k_{эф} = 0,014 \pm 0,003$.

Ранее были выявлены особенности температурных зависимостей процесса восстановления спинового зонда в митохондриях [12]. Установлено, что зависимости Аррениуса восстановления спино-

different concentrations of the organelles. These experiments were carried-out on following scheme: the present organelle suspension with total initial protein concentration of $C = 30$ mg/ml was diluted with incubation medium in 1.2, 1.5 and 2 times with corresponding decrease of total protein concentration. It is assumed that organelle quantity in suspension is proportional to total protein concentration in each particular case. It was suggested also that in each particular mitochondrion the number of reductive centers was equal and constant, and changing organelles number results in proportional change of reductive centers. It has been shown in Fig. 1 that regeneration rate of spin probe decreases with the reducing of organelle concentration in suspension. But thermal inactivation of enzymes (Fig. 1, dependence 5) disturbs the processes, associated with electron transfer and reduction of the probe does not occur. With the presented in Fig. 1 semi-logarithmic anamorphoses for tangent of the slope angle of corresponding dependencies the constants of spin probe reduction rate in suspensions with different concentrations of reductive centers are as follows: at $C = 30$ mg/ml, $k_{eff} = 0.048 \pm 0.005$ min⁻¹; $C = 25$, $k_{eff} = 0.037 \pm 0.004$; $C = 20$, $k_{eff} = 0.021 \pm 0.003$; $C = 15$, $k_{eff} = 0.014 \pm 0.003$.

Previously the peculiarities of temperature dependencies of spin probe reduction process in mitochondria was revealed [12]. It has been established that Arrhenius' dependencies of TEMPON spin probe reduction manifest the clearly expressed kink in the range of

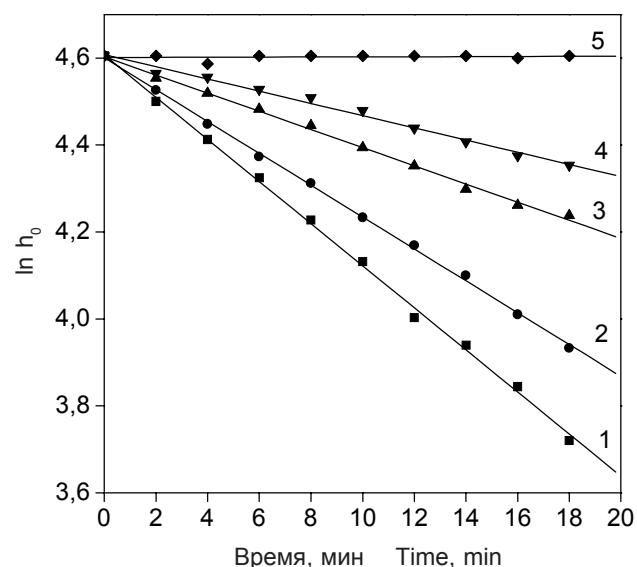


Рис. 1. Восстановление спинового зонда TEMPON во времени в суспензии митохондрий при различном разведении: 1 – контроль; 2, 3, 4 – разведение в 1,2; 1,5; 2 раза соответственно; 5 – денатурированные митохондрии.

Fig. 1. Recovery of TEMPON spin probe in time in suspension of mitochondria at different dilution: 1 – control; 2, 3, 4 – dilution on 1.2, 1.5, 2 times, respectively 5 – denaturated mitochondria.

вого зонда ТЕМПОН проявляют явно выраженный излом в области 10°C, что свидетельствует о наличии термического структурного перехода в мембранах органелл, инициаторами которого выступают белковые структуры, в частности ферментный комплекс цепи переноса электрона, сосредоточенный во внутренней мембране митохондрий. Этот же переход при 10°C проявляется в зависимости Аррениуса частоты вращения спинового зонда [12]. Аналогичные этому переходу термотропные структурные переходы наблюдали в разных температурных диапазонах и на других природных мембранах [1, 3, 10, 17]. Такие переходы являются своеобразным показателем физиологической активности для большинства нативных мембран. При этом деструктурирующие влияния на мембранные структуры приводят к исчезновению термотропных переходов или их смещению по температурному диапазону [1, 18, 21].

На основании вышеизложенного было изучено влияние замораживания и последующего отогрева на восстанавливающие свойства мембран митохондрий по отношению к спиновому зонду ТЕМПОН. Установлено, что одно- и двукратное быстрое замораживание суспензий митохондрий до температуры жидкого азота приводит к увеличению скорости восстановления спинового зонда в размороженных суспензиях (рис. 2). Такие изменения могут свидетельствовать об улучшении доступности к ферментам цепи переноса электрона органелл для спинового зонда. При этом степень влияния замораживания митохондрий на структурное состояние их мембран можно определить по анализу состояния термотропного структурного перехода в мембранах органелл после низкотемпературного воздействия. Из результатов проведенных экспериментов следует, что структурный переход, который имеет место в мембранах интактных митохондрий, сохраняется и в случае однократного быстрого замораживания органелл до температуры -196°C и последующего их отогрева (рис. 3, зависимость 2). Однако уже двукратное быстрое замораживание приводит к исчезновению термотропного структурного перехода (рис. 4).

Приведенные на рис. 3 зависимости Аррениуса параметра вращательной диффузии спинового зонда в суспензиях митохондрий после однократного быстрого замораживания органелл до температуры -196°C и интактных органелл свидетельствуют не только о сохранении термотропного перехода при таком температурном воздействии, но и о совпадении на участке температур 0...10°C даже наклонов зависимостей для опытных и контрольных образцов. Энергия активации вращательной диффузии на этих участках равна 0,59 и 0,60 ккал/моль соответственно. При температурах

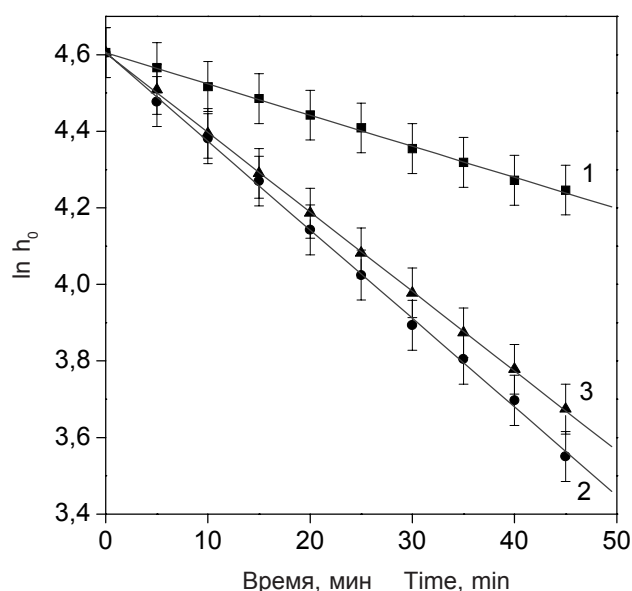


Рис. 2. Восстановление спинового зонда ТЕМПОН во времени в суспензии митохондрий: 1 – контроль; 2, 3 – после одно- и двукратного быстрого замораживания до температуры -196°C соответственно.

Fig. 2. Reconstruction of TEMPO spin probe at time in suspension: 1 – control; 2, 3 – after single and two-fold rapid freezing down to -196°C, correspondingly.

10°C, that testify to thermal structural transition in organelles' membranes, initiated by protein structures, particularly enzymatic complex of electron transfer chain, located in mitochondrial inner membrane. At 10°C the same transition manifests in Arrhenius' dependence of spin probe rotational frequency [12]. Thermotropic structural transitions similar to this one were observed at different temperatures and in different natural membranes [1, 3, 10, 17]. These transitions are specific index of physiological activity for most native membranes. Herewith disturbant effects on membrane structures result in the disappearing of thermotropic transitions or their shift along the temperature range [1, 18, 21].

Based on the above mentioned the effect of freezing and following thawing on reductive properties of mitochondria membranes in relation to TEMPO spin probe was studied. It has been established that single and two-fold rapid freezing of mitochondrial suspensions down to liquid nitrogen temperature results in the increasing of spin probe reduction rate in thawed suspensions (Fig. 2). These changes may testify to improving accessibility to enzymes of electron transfer chain of organelles for the spin probe. Herewith the extent of the effect of mitochondria freezing on structural condition of their membranes may be determined by analysis of the condition of thermotropic structural transition in organelle membranes after low temperature effect. From the results of carried-out experiments follows that structural transition, which occurs in

выше 10°C значения энергии активации вращательной диффузии спинового зонда для контрольных и опытных образцов отличаются. Так, для митохондрий, подвергнутых однократному быстрому замораживанию, значение энергии активации составляет 1,51 ккал/моль, а для контрольных митохондрий – 1,98 ккал/моль. Такие отличия в значениях энергии активации свидетельствуют о том, что однократное замораживание органелл приводит к изменению текучести мембраны, что, в свою очередь, вызывает доступность белков цепи переноса электронов для спинового зонда.

Таким образом, однократное быстрое замораживание суспензии митохондрий до температуры –196°C и последующий отогрев приводят к незначительным изменениям мембран митохондрий, которые не влияют на основные ее структурные свойства, сохраняя термотропный структурный переход, и заключаются в основном в изменении текучести мембраны, в итоге – улучшается доступность спинового зонда к белковым структурам цепи переноса электрона органелл. Нарушения мембран митохондрий усугубляются в случае двукратного быстрого замораживания, что проявляется не только в увеличенной доступности зонда к центрам восстановления, но и в исчезновении характерного для органелл термотропного структурного перехода (рис. 4). Энергия активации вращательной диффузии спинового зонда при этом во

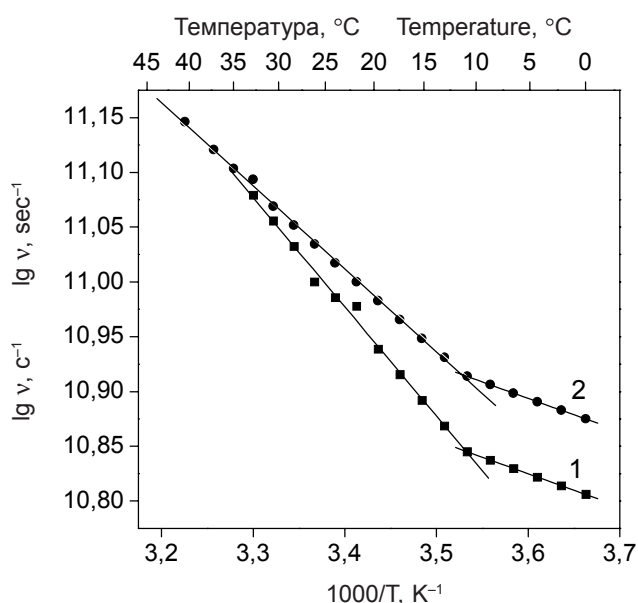


Рис. 3. Зависимость Аррениуса параметра вращательной диффузии спинового зонда ТЕМПОН в суспензии митохондрий: 1 – контроль; 2 – после однократного быстрого замораживания органелл до температуры –196°C.

Fig. 3. Arrhenius' dependence of rotational diffusion parameter of TEMPON spin probe in mitochondria suspension: 1 – control; 2 – after single rapid freezing of organelles down to –196°C.

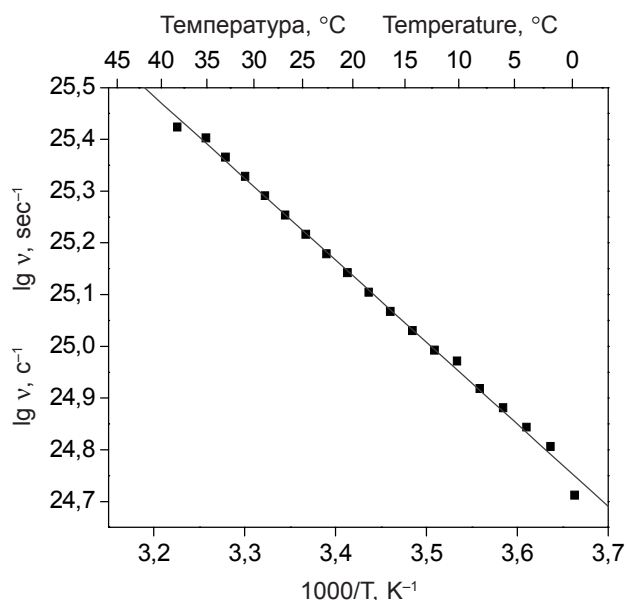


Рис. 4. Зависимость Аррениуса параметра вращательной диффузии спинового зонда ТЕМПОН в суспензии митохондрий после двукратного быстрого замораживания органелл до температуры –196°C.

Fig. 4. Arrhenius' dependence of rotational diffusion parameter of TEMPON spin probe in mitochondria suspension after two-fold rapid freezing of organelles down to –196°C.

membranes of intact mitochondria is preserved both at a single rapid freezing of organelles down to –196°C and after their following thawing (Fig. 3, dependence 2). But the two-fold rapid freezing results in the disappearing of thermotropic structural transition (Fig. 4).

The presented in Fig. 3 Arrhenius' dependencies of rotational diffusion parameter of spin probe in mitochondrial suspensions after single rapid freezing of organelles down to –196°C and intact organelles testify not only to preservation of thermotropic transition at this temperature effect, but even to the coincidence of dependencies' slopes for experimental and control samples on temperature range of 0...10°C. Values of activation energy of rotational diffusion in these ranges are 0.59 and 0.60 kcal/mol, accordingly. At temperatures over 10°C the activation energies of spin probe rotational diffusion for experimental and control samples are different. So, for mitochondria, exposed to single rapid freezing, the value of activation energy makes 1.51 kcal/mol, and 1.98 kcal/mol for the control mitochondria. These differences in activation energy values testify to the fact that a single freezing of organelles results in the change of membrane fluidity that in its turn triggers the accessibility of proteins of electron transfer chain for the spin probe.

Thus, single rapid freezing of mitochondria suspension down to –196°C and following thawing result in non-significant changes of mitochondrial membranes with no effect on its basic structural properties, and with preserving thermotropic structural transition and

всем исследованном диапазоне температур имеет значение 1,41 ккал/моль, близкое к значению энергии активации для высокотемпературного интервала при однократном замораживании. Показано, что после двух циклов быстрого замораживания и последующего отогрева митохондрий полностью нарушалась и проницаемость их мембран [6], что согласуется с приведенными результатами экспериментов.

Выводы

В представленной работе описаны подходы к использованию метода ЭПР слабосвязанных спиновых зондов для изучения электронпереносных мембран митохондрий и применение этого метода для изучения воздействия на биомембраны низких температур. Изучено влияние замораживания и последующего отогрева на процесс восстановления спинового зонда в суспензии митохондрий и структурный переход в мембранах органелл. В работе показано, что одно- и двукратное быстрое замораживание суспензий митохондрий до температуры жидкого азота приводит к увеличению скорости восстановления спинового зонда в размороженных суспензиях, что свидетельствует об улучшении доступности к ферментам цепи переноса электрона органелл для спинового зонда. При этом установлено, что однократное быстрое замораживание и последующий отогрев не приводят к исчезновению наблюдаемого в норме термотропного перехода. В то же время отмечается уменьшение энергии активации вращательной диффузии спинового зонда при температуре выше 10°C для однократно замороженных митохондрий. Следовательно, однократное быстрое замораживание приводит к изменению текучести мембраны митохондрий, не вызывая значительных структурных изменений в ней, включая и состояние белков цепи переноса электронов. Однако при повторном быстром замораживании суспензии митохондрий исчезает характерный для органелл термотропный структурный переход, что наряду с данными о полном нарушении проницаемости митохондрий подтверждает значительное нарушение структурной организации мембран.

Автор выражает искреннюю благодарность зав. отделом биохимии ИПКиК НАН Украины д.б.н., профессору А.Ю. Петренко и аспиранту отдела Е.Н. Ткачевой за предоставление митохондрий для проведения данной работы.

Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1982.— 256 с.

generally consist in changing of membrane fluidity, and finally the access of spin probe to the protein structures of organelle electron transfer chain improves. Disturbances of mitochondria membranes are getting worse at two-fold rapid freezing, that manifests not only in high accessibility of probe to reductive centers, but in disappearing of specific for the organelles thermotropic structure transition (Fig. 4). Activation energy of rotational diffusion of spin probe in a whole studied temperature range has the value of 1.41 kcal/mol and is close to the value of activation energy for high temperature interval at single freezing. It has been shown that after two cycles of rapid freezing and following thawing of mitochondria their membrane penetration was completely impaired [6], that agree with the presented results of experiments.

Conclusions

In presented research there are described the approaches of using the EPR method for weakly bound spin probes to study electron-transferring membranes of mitochondria and application of this method to investigate the effect of low temperatures on biomembranes. The effect of freezing and following thawing on spin probe reduction process in mitochondrial suspension as well as on structural transition in organelle membranes has been studied. It has been shown in the research that single and two-fold rapid freezing of mitochondrial suspensions down to liquid nitrogen temperature results in the increase of the spin probe reduction rate in frozen-thawed suspensions that testify to the improvement of accessibility of the spin probe to enzymes of organelle electron transfer chain. Herewith it has been established that a single rapid freezing and following thawing do not result in the disappearing of observing thermotropic transition. At the same time the reducing of activation energy of spin probe rotational diffusion at temperature over 10°C for single frozen mitochondria is noted. Therefore the single rapid freezing results in changing the mitochondria membranes fluidity, causing no significant structure changes in it, including the state of proteins of electron transfer chain. However a repeated rapid freezing of mitochondrial suspensions cause the disappearing of the thermotropic structural transfer specific for the organelles, that together with the data of complete impairment of mitochondria penetration properties confirms a significant disturbance of structure organization of membranes.

The author acknowledges the Head of Biochemistry Department of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, doctor of biological sciences, Professor Petrenko A.Yu. and postgraduate student of the department Tkacheva E.N. for providing the mitochondria for this investigation.

2. Білоус А. М., Лемешко В. В., Луговий В. Й. та інш. Проблеми кріобіохімії // Вісник АН УРСР.– 1976.– №2.– С. 38–48.
3. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.– М.: Наука, 1980.– 320 с.
4. Дмитриева Е. В., Мошков Д. А., Гахова Э. Н. Ультраструктурные изменения нейрона МПЗ моллюска *Lymnaea stagnalis* после криоконсервации изолированного мозга // Цитология.– 2006.– Т. 48, №6.– С. 480–485.
5. Жданов Р. И. Парамагнитные модели биологически активных соединений.– М.: Наука, 1981.– 280 с.
6. Загнойко В. И., Нардид О. А., Луговой В. И. Влияние проницаемости мембран лизосом и митохондрий на способность их криоэкстрактов ингибировать белоксинтезирующую активность бесклеточной системы // Укр. биохимический журнал.– 1985.– Т. 57, №1.– С. 16–20.
7. Кольтовер В. К. Исследование электронпереносящих биологических мембран методом молекулярных зондов: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.– М., 1971.– 15 с.
8. Кравцов Ю. В. Исследования методом спинового зонда некоторых структурных и функциональных характеристик биологических систем: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– М., 1977.– 23 с.
9. Ленинджер А. Митохондрия.– М.: Мир, 1966.– 236 с.
10. Мажуль В. М., Галец И. В. Внутримолекулярная динамика белков в составе биологических мембран и клеток // Материалы IV съезда фотобиологов России.– Саратов, 2005.– С. 118–120.
11. Мосолова И. М., Горская А. И., Шольц К. Ф. и др. Выделение интактных митохондрий из печени крыс // В кн.: Методы современной биохимии.– М.: Наука, 1975.– С. 45–47.
12. Нардид О. А. Особливості температурних залежностей відновлення спигового зонда в суспензії митохондрий // Фізика живого.– 2008.– Т. 16, №1.– С. 50–55.
13. Нардид О. А. Відновлення спигового зонда в оцінці життєздатності біологічних об'єктів // Фізика живого.– 2008.– Т. 16, №1.– С. 44–49.
14. Ягужинский Л. С., Чумаков В. М., Иванов В. П. и др. Взаимодействие иминоксильной спин-метки с системой транспорта электронов в митохондриях // Докл. АН СССР.– 1971.– Т. 197, №4.– С. 969–972.
15. Araki T. Inactivation of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex as a result of phospholipid degradation induced by freeze-thawing // Biochim. Biophys. Acta.– 1977.– Vol. 496, N2.– P. 532–546.
16. Brown L., Bradbury J. H., Austin K., Stewart P. R. Comparison of membrane organization in mitochondria from yeast and rat liver by nuclear magnetic resonance spectroscopy // J. Membrane Biol.– 1975.– Vol. 24, N1.– P. 35–54.
17. Forte T., Leto T. L., Minetti M., Marchesi V. T. Protein 4.1 is involved in a structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by a spin-labeled stearic acid // Biochemistry.– 1985.– Vol. 24, N27.– P. 7876–7880.
18. Gornicki A., Gutsze A. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: an EPR study // Acta Biochimica Polonica.– 2000.– Vol. 47, N4.– P. 963–971.
19. Hochli M., Hackenbrock C. R. Thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles in the inner mitochondrial membrane and its inhibition by artificial peripheral proteins // J. Cell Biol.– 1977.– Vol. 72, N2.– P. 278–291.
20. Masson W. T., Abrahamson E. W. Phase transition in vertebrate and invertebrate photoreceptor membranes // J. Membrane Biol.– 1974.– Vol. 15, N4.– P. 383–392.
21. Minetti M., Di Stasi A. M. Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines // Biochemistry.– 1987.– Vol. 26, N25.– P. 8133–8137.
22. Mitchell P. Protonmotive chemiosmotic mechanism in oxidative and photosynthetic phosphorylation // Trends Biochem. Sci.– 1978.– Vol. 31, N3.– P. 60–61.

References

1. Belous A. M., Bondarenko V. A. Structural changes of biological membranes during cooling.– Kiev: Naukova Dumka, 1982.– 258 p.
2. Belous A. M., Lemeshko V. V., Lugovoy V. I. et al. Problems of cryobiochemistry // Visnyk AN UkrSSR.– 1976.– N2.– P. 38–48.
3. Vladimirov Yu. A., Dobretsov G. E. Fluorescent probes in studying of biological membranes.– Moscow: Nauka, 1980.– 320 p.
4. Dmitrieva E. V., Moshkov D. A., Gakhova E. N. Ultrastructural changes of MP3 neuron of *Lymnaea stagnalis* shellfish after cryopreservation of isolated brain // Tsytiologiya.– 2006.– Vol. 48, N6.– P. 480–485.
5. Zhdanov R. I. Paramagnetic models of bioactive compounds.– Moscow: Nauka, 1981.– 280 p.
6. Zagnoyko V. I., Nardid O. A., Lugovoy V. I. Penetrating effect of membranes of lysosome and mitochondria on their cryoextracts viability to inhibit protein-synthesizing activity of cell free system // Ukr. Biokhim. Zh.– 1985.– Vol. 57, N1.– P. 16–20.
7. Koltover V. K. Studying of electron-transporting biological membranes by molecular probes method: Author's abstract of thesis of candidate of physical and mathematical sciences.– Moscow, 1971.– 15 p.
8. Kravtsov Yu. V. Studies of some structural and functional characteristics of biological systems by spin probe method: Author's abstract of thesis of cand. of biol. sci.– Moscow, 1977.– 23 p.
9. Lehninger A. Mitochondria.– Moscow: Mir, 1966.– 236 p.
10. Mazhul V. M., Galets I. V. Intramolecular dynamics of proteins in content of biological membranes and cells // Materials of the IV of Russian Photobiologists.– Saratov, 2005.– P. 118–120.
11. Mosolova I. M., Gorskaya A. I., Sholts K. F. et al. Isolation of intact mitochondria out of rats' liver // In: Methods of Current Biochemistry.– Moscow: Nauka, 1975.– P. 45–47.
12. Nardid O. A. Peculiarities in temperature dependencies of spin probe reduction in mitochondrial suspension // Fizyka Zhyvogo.– 2008.– Vol. 16, N1.– P. 50–55.
13. Nardid O. A. Reduction of spin probe in evaluation of biological objects viability // Fizyka Zhyvogo.– 2008.– Vol. 16, N1.– P. 44–49.
14. Yaguzhinskiy L. S., Chumakov V. M., Ivanov V. P. et al. Interaction of iminoxyl spin-label with system of electron transport in mitochondria // Doklady Akademii Nauk SSSR.– 1971.– Vol. 197, N4.– P. 969–972.
15. Araki T. Inactivation of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex as a result of phospholipid degradation induced by freeze-thawing // Biochim. Biophys. Acta.– 1977.– Vol. 496, N2.– P. 532–546.
16. Brown L., Bradbury J. H., Austin K., Stewart P. R. Comparison of membrane organization in mitochondria from yeast and rat liver by nuclear magnetic resonance spectroscopy // J. Membrane Biol.– 1975.– Vol. 24, N1.– P. 35–54.
17. Forte T., Leto T. L., Minetti M., Marchesi V. T. Protein 4.1 is involved in a structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by a spin-labeled stearic acid // Biochemistry.– 1985.– Vol. 24, N27.– P. 7876–7880.
18. Gornicki A., Gutsze A. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: an EPR study // Acta Biochimica Polonica.– 2000.– Vol. 47, N4.– P. 963–971.
19. Hochli M., Hackenbrock C. R. Thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles in the inner mitochondrial membrane and its inhibition by artificial peripheral proteins // J. Cell Biol.– 1977.– Vol. 72, N2.– P. 278–291.
20. Masson W. T., Abrahamson E. W. Phase transition in vertebrate and invertebrate photoreceptor membranes // J. Membrane Biol.– 1974.– Vol. 15, N4.– P. 383–392.

23. *Quintanilha A.T., Racker L.* Surface localization of sites of reduction of nitroxide spin-labeled molecules in mitochondria // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1977.– Vol. 74, N2.– P. 570–574.
24. *Sheleg S., Hixon H., Cohen B. et al.* Cardiac mitochondrial membrane stability after deep hypothermia using a xenon clathrate cryostasis protocol – an electron microscopy study // Int. J. Clin. Exp. Pathol.– 2008.– Vol. 1, N5.– P. 440–447.
25. *Steichman L., Avi-Dor I.* The effect of osmotic shock on swelling pattern and respiratory control of rat liver mitochondria // Biochem. J.– 1967.– Vol. 104, N1.– P. 71–77.
21. *Minetti M., Di Stasi A.M.* Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines // Biochemistry.– 1987.– Vol. 26, N25.– P. 8133–8137.
22. *Mitchell P.* Protonmotive chemiosmotic mechanism in oxidative and photosynthetic phosphorylation // Trends Biochem. Sci.– 1978.– Vol. 31, N3.– P. 60–61.
23. *Quintanilha A.T., Racker L.* Surface localization of sites of reduction of nitroxide spin-labeled molecules in mitochondria // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1977.– Vol. 74, N2.– P. 570–574.
24. *Sheleg S., Hixon H., Cohen B. et al.* Cardiac mitochondrial membrane stability after deep hypothermia using a xenon clathrate cryostasis protocol – an electron microscopy study // Int. J. Clin. Exp. Pathol.– 2008.– Vol. 1, N5.– P. 440–447.
25. *Steichman L., Avi-Dor I.* The effect of osmotic shock on swelling pattern and respiratory control of rat liver mitochondria // Biochem. J.– 1967.– Vol. 104, N1.– P. 71–77.

Поступила 13.01.2009
Рецензент Е.А. Гордиенко

Accepted in 13.01.2009