

## Исследование влияния низкомолекулярных криопротекторов на дыхательную цепь митохондрий методом ЭПР спинового зонда

UDC 57.043:576.311.347:577.334

O.A. NARDID

### Study of Low-Molecular Effect of Cryoprotectants on Mitochondria Respiratory Chain by Spin Probe EPR

Методом ЭПР спиновых зондов изучено влияние низкомолекулярных криопротекторов глицерина, 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида с концентрациями до 30% на активность дыхательной цепи мембран митохондрий печени крыс. Установлено, что низкомолекулярные криозащитные вещества вызывают ингибирование дыхательной цепи изолированных органелл. Показано, что степень ингибирования восстановления спинового зонда и дыхания митохондрий в составе гепатоцитов при тех же концентрациях криопротекторов меньше, чем в изолированных митохондриях.

**Ключевые слова:** криопротекторы, митохондрии, электронный парамагнитный резонанс, восстановление спинового зонда, ингибирование дыхательной цепи.

Методом ЕПР спинових зондів вивчено вплив низкомолекулярних криопротекторів гліцерину, 1,2-пропандіолу й диметилсульфоксиду з концентраціями до 30% на активність дихального ланцюга мембран митохондрий печінки щурів. Установлено, що низкомолекулярні криозахисні речовини викликають інгібування дихального ланцюга ізольованих органел. Показано, що ступінь інгібування відновлення спинового зонда й дихання митохондрий у складі гепатоцитів при тих же концентраціях криопротекторів менше, ніж у ізольованих митохондріях.

**Ключові слова:** криопротектори, митохондрії, електронний парамагнітний резонанс, відновлення спинового зонда, інгібування дихального ланцюга.

Effect of low molecular cryoprotectants, glycerol, 1,2-propane diol and dimethylsulfoxide with concentrations up to 30% on activity of respiratory chain of rat liver mitochondria membranes has been studied by spin probe EPR. It has been established that low-molecular cryoprotective substances induce inhibition of isolated organelles' respiratory chain. It has been shown that inhibition rate of spin probe reduction and mitochondria respiration as a part of hepatocytes is lower at the same concentrations, if compared with isolated mitochondria.

**Key-words:** cryoprotectants, mitochondria, electron paramagnetic resonance, reduction of spin probe, inhibition of respiratory chain.

Повреждения при замораживании клеточных суспензий и тканей зачастую заключаются в нарушениях структуры мембран и ингибировании мембранно-связанных ферментов [3, 21]. При использовании в этом случае криопротекторов для возможной защиты биообъектов от эффектов замораживания важны данные по влиянию криопротекторов на функции клеток и субклеточных структур. Несмотря на то, что криопротекторы являются предметом многочисленных исследований во всем мире на протяжении более 50 лет, механизмы их действия и взаимодействия с различными биологическими структурами окончательно не выяснены. Среди наиболее вероятных механизмов защиты чаще всего отмечают: подавление возрастания концентрации солей в растворах [25], снижение повреждения клеток и клеточных мембран при дегидратации [3, 19, 21], уменьшение количества кристаллов образовавшегося льда

Damages during freezing of cell suspensions and tissues in many cases consist in defects of membrane structure and inhibition of membrane-bound enzymes [3, 21]. In this case when using cryoprotectants for potential protection of bioobjects from freezing effects the data of cryoprotectant influence on cell function and subcell structures are important. Even though cryoprotectants are the unit of many researches all over the world during more than 50 years, their protection mechanisms and interaction with various biological structures have not been completely elucidated. Among the most probable protection mechanisms, are the salt suppression of increasing concentrations in solutions [25], reduction of cell and cell membranes damage at dehydration [3, 19, 21], increasing of crystal number of formed ice inside the cell [4, 14] and others [1]. For cryoprotectants of intracellular action it is important to determine the period necessary for effective penetration of substance into cell after

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

внутри клетки [4, 14] и другие [1]. Для криопротекторов внутриклеточного действия важно определить отрезок времени после смешивания с клеточной суспензией, необходимый для эффективного проникновения вещества в клетку. Если время эквilibрации слишком велико, это приводит к токсическому действию криопротектора на клетки. Оптимальное время эквilibрации часто устанавливается эмпирически для каждого вида клеток [16, 18, 23, 27]. Причины повреждений клеточных суспензий и органелл после замораживания и последующего отогрева в полной мере все еще не изучены, не ясен до конца способ действия применяемых при этом криозащитных агентов [12, 20, 23, 24]. При этом известно, что криопротекторы, являясь далеко неиндифферентным веществом по отношению к биологическим структурам, в зависимости от температуры, концентрации и времени экспозиции могут приводить к росту гетерогенности липидного бислоя мембран, нарушению их барьерных свойств, ингибированию активности цитоплазматических и мембранных ферментных комплексов [3, 19, 21].

Для изучения влияния криопротекторов на структурно-функциональное состояние мембран клеток и органелл, обладающих окислительно-восстановительной функцией, можно использовать метод ЭПР спиновых зондов. Исследования таких параметров восстановления нитроксильных радикалов в биологических объектах, как константы скоростей, степень восстановления, зависимость от природы и состояния биологического материала, температуры и других определили возможность практического использования этого эффекта и спиновых зондов в качестве редокс-индикаторов и теста на жизнеспособность [10, 11]. Процесс восстановления спинового зонда во многом зависит как от доступности, так и от активности восстанавливающих центров в биологическом объекте, а денатурация инактивирует процессы, связанные с функционированием ферментов, участвующих в процессе восстановления спинового зонда, в результате чего восстановление не происходит совсем. Наличие в среде криопротекторов может оказывать влияние на факторы, определяющие степень восстановления спинового зонда.

Цель работы – изучение методом ЭПР спиновых зондов влияния низкомолекулярных криопротекторов – глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и диметилсульфоксида (ДМСО) на процесс восстановления спинового зонда в суспензиях гепатоцитов и митохондрий печени крыс для оценки структурно-функционального состояния их мембран.

### Материалы и методы

Гепатоциты выделяли из печени белых крыс-самцов неферментативным методом [13] с исполь-

mixing with cell suspension. If time of equilibration is too long it results, as a rule, in a toxic effect of cryoprotectant on cells. Optimal time of equilibration is often found empirically for each type of cells [16, 18, 23, 27]. Causes of cell suspensions and organelles' damages after freezing and following thawing have not been studied completely and the way of action of used cryoprotective agents is not quite clear [12, 20, 23, 24]. But it is known that cryoprotectants being non-indifferent substance in relation to biological structures depending on temperature, concentration and exposure time may result in growth of heterogeneity of membrane lipid bilayer, defect of their barrier properties, inhibition of activity of cytoplasm and membrane enzyme complexes [3, 19, 21].

For studying the cryoprotectant effect on structure-functional state of cell membranes and organelles, having a redox function, one may use the EPR method of spin probes. Studies of such reduction parameters of nitroxyl radicals in biological objects as rate constants, reduction degree, dependence on nature and state of biological material, temperature and other determined possibility of practical application of this effect and spin probes as redox-indicators and viability test [10, 11]. Reduction process depends mostly on both accessibility and activity of reductive centers in biological object, and denaturation inactivates the processes, associated with functioning of enzymes, taking part in spin probe reduction, resulting in an incomplete reduction. The presence of cryoprotectants in medium may affect the factors, determining spin probe reduction degree.

The research aim is to study by spin probe EPR method of the effect of low-molecular cryoprotectants such as glycerol, 1,2-propane diol (1,2-PD) and dimethylsulfoxide (DMSO) on process of spin probe reduction in suspensions of rat liver hepatocytes and mitochondria for estimation of structure-functional state of their membranes.

### Materials and methods

Hepatocytes were derived from liver of white male rats with non-enzymatic method [13] with the perfusion medium, containing 2 mM EDTA. Mitochondria were obtained by differential centrifugation according to the described in [9] method with insignificant modification. Hepatocytes and mitochondria were provided for these study by Department of Cryobiochemistry of the IPC&C.

As low-molecular cryoprotectants glycerol, 1,2-PD and DMSO were used under 10, 20, 30% final concentrations. The solutions of cryoprotectants were prepared using the suspending media for mitochondria and hepatocytes and introduced dropwise with continuous mixing of the suspensions at 0°C.

Redox activity of hepatocyte and mitochondria biological suspensions was investigated by EPR method

зованием перфузионной среды, содержащей 2 мМ ЭДТА. Митохондрии выделяли при помощи дифференциального центрифугирования с незначительной модификацией метода, описанного в [9]. Гепатоциты и митохондрии для данных исследований были предоставлены отделом криобиохимии ИПКиК НАН Украины.

В качестве низкомолекулярных криопротекторов использовали глицерин, 1,2-ПД и ДМСО в конечных концентрациях 10, 20 и 30 масс. %. Растворы криопротекторов готовили на средах суспендирования митохондрий и гепатоцитов и вносили в суспензии гепатоцитов и митохондрий по капельно при постоянном перемешивании суспензий при температуре 0°C.

Окислительно-восстановительную активность биологических суспензий гепатоцитов и митохондрий исследовали методом ЭПР спиновых зондов [5, 6] с использованием водорастворимого слабо-связанного зонда ТЕМПОН (2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил; "Aldrich", США). Данный иминоксильный радикал хорошо растворим в воде и других полярных растворителях. Конечная концентрация зонда в образцах составляла  $0,8 \times 10^{-4}$  М. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре "Брукер" ER 100D (Германия) со стандартной термоприставкой. Развертка магнитного поля составляла 100 Гс. Постоянная времени была равна 0,5 с. Время развертки – 100 с. В исследованиях использовали молибденовые стеклянные капилляры с внутренним диаметром 500 нм и объемом 0,1 мл. Контрольные опыты показали, что при описанных условиях не происходит искажения спектров ЭПР в результате перемодуляции или инерционных эффектов.

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

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

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программ "Statistica v 5.0" (StatSoft, США) и "Origin 6.1" (OriginLab Corporation, США). Для линейных зависимостей типичное значение коэффициента корреляции  $r$  составляло 0,996–0,998. Применяли методы параметрического и непараметрического анализа. Результаты исследований были обработаны статистически с использованием  $t$ -критерия Стьюдента-Фишера при параметрическом анализе и критерия Вилкоксона – при непараметрическом. Достоверно различавшиеся считали результаты при  $p < 0,05$ .

of spin probes [5, 6] 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  $0,8 \times 10^{-4}$  M. The EPR spectra 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 the studies the molybdene 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 overmodulation or inertial effects.

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

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

The results were statistically processed with "Statistica v5.0" (StatSoft, США) and "Origin 6.1" (OriginLab Corporation, USA) software. For rectilinear dependencies the typical  $r$  value of correlation coefficient was 0.996–0.998. The methods of parametric and nonparametric analysis were used. The research results were statistically processed with Student's Fisher  $t$ -criterion at parametric analysis, and Wilcoxon's criterion at non-parametric analysis. The results were considered as having a significant difference at  $p > 0.05$ .

## Results and discussion

In fresh hepatocyte, mitochondria, submitochondrial particle suspensions and other biological objects, having a redox activity the rapid reduction of iminoxyl radicals takes place [6, 7, 10]. Herein the role of redox systems of bioobjects is manifested and it is confirmed with the fact that reduction ability *e. g.* for mitochondria, subjected to the destruction was lower than in whole mitochondria and heat denaturation of enzymes completely damages the processes, related to electron transfer and probe reduction does not occur [6, 10]. The hypotheses concerning certain mechanisms of nitroxyl reduction were made and many of them were experimentally confirmed [5]. Herewith the presence of organic additives, which include the majority of contemporary cryoprotectants, may result in damages of redox processes and the change of spin probe reduction extent. For the protection of isolated cells under low temperature effect it is necessary to use cryoprotective substances, mainly of endocellular type [8, 15, 21]. The cryoprotectants, which can penetrate through the cytoplasm and mitochondrial membranes, have more expressed effect on oxidative reactions of

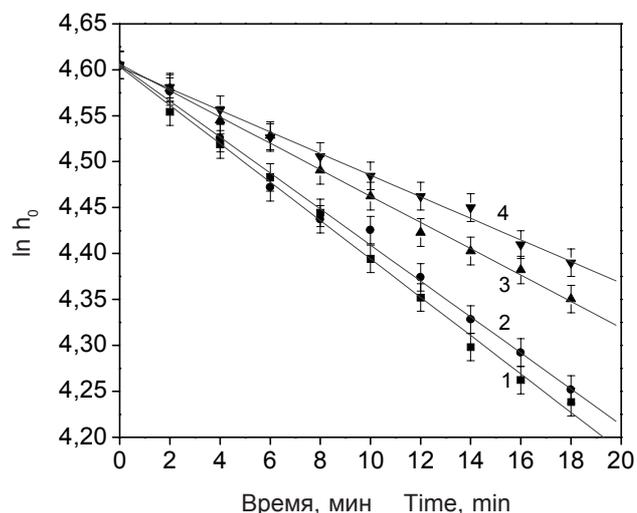
## Результаты и обсуждение

В свежеприготовленных препаратах гепатоцитов, митохондрий, субмитохондриальных частиц и других биообъектов, обладающих редокс-активностью, происходит быстрое восстановление иминоксильных радикалов [6, 7, 10]. Именно в этом проявляется роль окислительно-восстановительных систем биообъектов и это подтверждается тем, что восстанавливающая способность, например митохондрий, подвергнутых деструкции, оказалась меньше, чем у целых митохондрий, а тепловая денатурация ферментов полностью нарушает процессы, связанные с переносом электронов, и зонд не восстанавливается [6, 10]. Относительно конкретных механизмов восстановления нитроксидов высказывали предположения, многие из них подтверждены экспериментально [5]. При этом наличие в среде органических добавок, к которым относится и большинство современных криопротекторов, может приводить к нарушениям окислительно-восстановительных процессов и к изменению степени восстановления спинового зонда. Для защиты изолированных клеток в условиях действия низких температур необходимо использовать криозащитные вещества, чаще эндоцеллюлярного типа [8, 15, 21]. Криопротекторы, способные проникать через цитоплазматические и митохондриальные мембраны, оказывают более выраженное влияние на окислительные реакции цепи дыхания митохондрий [2]. В связи с этим исследовалось влияние глицерина, 1,2-ПД и ДМСО на процесс восстановления спинового зонда в суспензиях гепатоцитов и митохондрий. Эксперименты показали (рис. 1), что наличие в среде инкубации митохондрий исследованных криопротекторов вызывает ингибирование процесса восстановления спинового зонда. На рис. 2 приведены изменения констант скоростей восстановления зонда в суспензиях митохондрий, вычисленные по тангенсу угла наклона соответствующих полулогарифмических анаморфоз (см. рис. 1). Результаты свидетельствуют, что добавление в суспензию митохондрий изучаемых криопротекторов нарушает дыхательную цепь органелл, проявляющееся в уменьшении активности работы переносчиков электронов и протонов, окислительно-восстановительных реакций цепи и соответственно восстановления спинового зонда. По эффективности ингибирования исследованные криопротекторы располагаются в ряд глицерин < 1,2-ПД < ДМСО.

Полученные результаты подтверждают более ранние исследования [2] по изучению влияния криопротекторов на дыхание митохондрий, было показано, что криопротекторы могут ингибировать, как  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, так и НАД-Н – дегидрогеназное звено процесса

митохондриальной дыхательной цепи [2]. Для того же вопроса эффект глицерина, 1,2-ПД и ДМСО на восстановление спинового зонда изучался в суспензиях гепатоцитов и митохондрий. Эксперименты показали, что присутствие митохондрий в среде инкубации изучаемых криопротекторов ингибирует восстановление спинового зонда. Рис. 2 показывает изменения констант скоростей восстановления зонда в суспензиях митохондрий, вычисленные по тангенсу угла наклона соответствующих полулогарифмических анаморфоз (рис. 1). Результаты свидетельствуют о том, что добавление изучаемых криопротекторов в суспензию митохондрий повреждает органеллу дыхательной цепи, *т. е.* уменьшает активность переносчиков электронов и протонов, окислительно-восстановительных реакций цепи и восстановления спинового зонда, соответственно. Изучаемые криопротекторы располагаются в ряд глицерин < 1,2-ПД < ДМСО в соответствии с их ингибирующей эффективностью.

Полученные результаты подтверждают недавние исследования [2] о влиянии криопротекторов на митохондриальную дыхательную цепь, обнаруживая, что криопротекторы могут ингибировать как  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, так и НАДН-дегидрогеназный комплекс аэробного дыхания. Однако наблюдаемое относительно низкое окисление эндогенного НАДН митохондрий в ответ на добавление АДФ позволило заключить, что криопротекторы оказывают ингибирующее действие только на НАДН-дегидрогеназный комплекс. Результаты анализа ингибирования митохондриальной дыхательной цепи показали, что спиновый зонд принимает электроны на дыхательной цепи между участками действия ротенона и антимицина А, поэтому можно сказать, что ферменты, восстанавливающие зонд, локализованы в

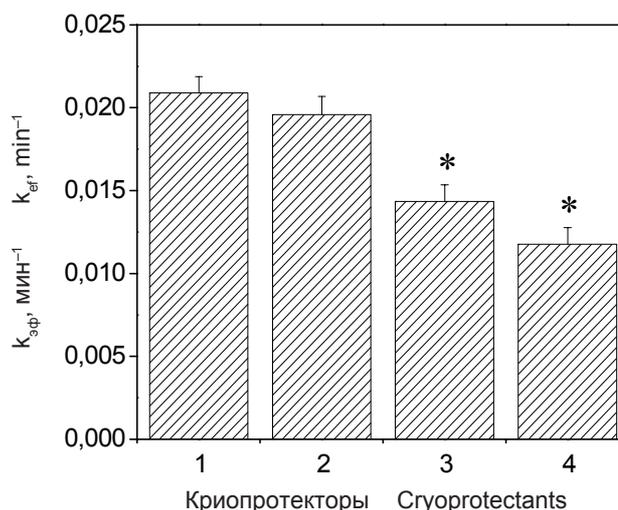


**Рис. 1.** Влияние криопротекторов на восстановление спинового зонда ТЕМПОН во времени в суспензии интактных митохондрий (1) и содержащей 10% криопротекторов: глицерин (2); 1,2-пропандиол (3); ДМСО (4).

**Fig. 1.** Effect of cryoprotectants on TEMPO spin probe reduction in time in suspension of intact mitochondria (1) and the in the presence of 10% glycerol (2), 1,2-propane diol (3), and DMSO (4) cryoprotectants.

аэробного дыхания. Однако наблюдаемое сравнительно медленное окисление эндогенного НАД-Н митохондрий в ответ на добавление АДФ позволило сделать вывод, что криопротекторы оказывают тормозящее влияние именно на НАД-Н-деhydroгеназный комплекс. Если принять во внимание результаты ингибиторного анализа дыхания митохондрий [17, 26], показавшие, что спиновый зонд принимает электроны на участке дыхательной цепи между местами действия ротенона и антимицина А, то можно утверждать, что восстанавливающие зонд ферменты локализованы в области электронтранспортной цепи между первым флавопротеином и цитохромом b. Поэтому ингибирование криопротекторами уже самого начального звена цепи дыхания естественным образом приводит к наблюдаемому уменьшению редокс-активности ферментного комплекса переноса электронов, регистрируемому по восстановлению зонда при взаимодействии с коэнзимом Q (компонентом 2-го комплекса дыхательной цепи).

Таким образом, свободный доступ низкомолекулярных криопротекторов к локализованной на внутренней мембране дыхательной цепи митохондрий приводит к ощутимому ингибированию ее работы, проявляющемуся в уменьшении скорости восстановления спинового зонда. Необходимо обратить внимание на то, что метод ЭПР дает возможность наблюдать за функционированием электронтранспортной цепи митохондрий не только в субмитохондриальных частицах или изолированных митохондриях, но и в составе неразрушенных гепатоцитов. Интересно в связи с этим было сравнить степень восстановления спинового зонда в присутствии тех же криопротекторов в суспензии гепатоцитов. На рис. 3 представлены изменения констант скоростей восстановления спинового зонда ТЕМПОН в суспензиях гепатоцитов при разных концентрациях исследованных криопротекторов. Добавление исследованных криопротекторов в тех же концентрациях в среду инкубации гепатоцитов приводит к уменьшению ингибирования восстановления спинового зонда для 1,2-ПД и ДМСО. Следовательно, цитоплазматическая мембрана определенным образом препятствует непосредственному взаимодействию молекул криопротекторов с ферментным ансамблем дыхательной цепи митохондрий и ингибированию клеточного дыхания. Однако с ростом концентрации криопротекторов такая защитная функция цитоплазматической мембраны гепатоцитов уменьшается, и уже при 30 масс. % эффективность процесса восстановления спинового зонда уменьшается почти в 2 раза по сравнению с соответствующим контролем для всех исследованных криопротекторов. Следует также отметить, что цитоплазматическая

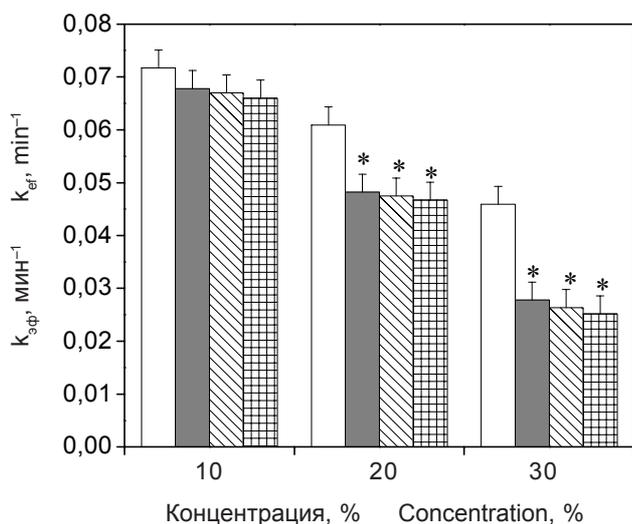


**Рис. 2.** Изменения констант скоростей восстановления зонда ТЕМПОН в суспензии интактных митохондрий (1) и содержащей 10% криопротекторов: глицерин (2); 1,2-пропандиол (3); ДМСО (4); \* – достоверные отличия по сравнению с интактными митохондриями,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

**Fig. 2.** Changes of constants of TEMPO probe recovery rates in suspension of intact mitochondria (1) and the one, containing 10% glycerol (2), 1,2-propane diol (3), and DMSO (4) cryoprotectants; \* – significant differences if compared with intact mitochondria,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

area of electron transport chain between the first flavoprotein and cytochrome B. Therefore, the inhibition with cryoprotectants even of initial link of respiratory chain naturally results in the observed reduction of redox activity of electron transfer enzyme complex, recorded by probe reduction during the interaction with coenzyme Q (component of 2<sup>nd</sup> complex of respiratory chain).

Thus, free access of low molecular cryoprotectants to the respiratory chain localized on mitochondria internal membrane results in notable inhibition of its action, manifested in decrease of the rate of spin probe reduction. It is necessary to turn the attention to the fact that EPR method enables the observing of functioning of mitochondria electron transport chain not only in submitochondrial particles or isolated mitochondria, but also as a part of whole hepatocytes. Herewith it was interesting to compare the spin probe reduction degree in the presence of the same cryoprotectants in suspension of hepatocytes. In Fig. 3 the changes of rate constants of TEMPO spin probe reduction in hepatocyte suspensions under different concentrations of the studied cryoprotectants are presented. Adding the studied cryoprotectants into hepatocyte incubation medium results in decreasing of inhibition of spin probe reduction in the presence of 1,2-PD and DMSO. Therefore cytoplasm membrane in a certain manner inhibits a direct interaction of cryoprotectant molecules with enzymatic group of mitochondria respiratory chain and inhibition of cell respiration. However with the rise in



**Рис. 3.** Изменения констант скоростей восстановления зонда ТЕМПОН в суспензиях intact hepatocytes (□) и содержащих криопротекторы (ДМСО (■); 1,2-пропандиол (▨); глицерин (▩)); \* – достоверные отличия по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

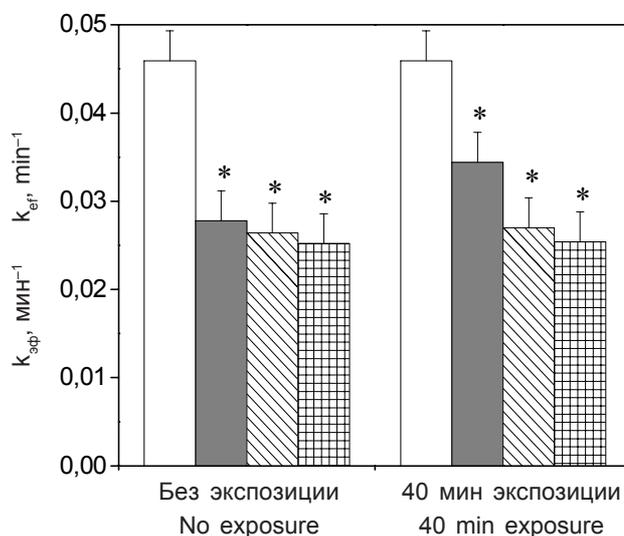
**Fig. 3.** Changes of constants of TEMPON probe reduction rates in suspensions of intact hepatocytes (□) and in the presence of glycerol (▩), 1,2-propane diol (▨), DMSO (■) cryoprotectants; \* – significant differences if compared with control,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$

мембрана гепатоцитов нивелирует наблюдаемые для суспензии митохондрий отличия ингибирующего действия различных криопротекторов. Способность восстанавливать спиновый зонд в суспензии гепатоцитов практически одинакова для равных концентраций исследованных криопротекторов. При этом тенденция степени ингибирования глицерин < 1,2-ПД < ДМСО, установленная в суспензиях митохондрий, сохраняется.

Результаты исследований (рис. 4) показали, что временная экспозиция гепатоцитов в гипертонической среде исследованных криопротекторов до 40 мин не оказывает существенного влияния на степень ингибирования восстановления спинового зонда. Такой характер изменений вполне ожидаем. При добавлении в суспензию гепатоцитов гипертонических растворов проникающих криопротекторов обычно наблюдается традиционная для таких соединений двухфазная реакция клеток [8]. Вначале происходит процесс быстрого обезвоживания, а затем восстановление исходного объема клеток, при котором часть внутриклеточной воды замещается молекулами криопротекторов. Фаза быстрого проникновения молекул криопротекторов в гепатоциты чаще всего завершается уже на первой минуте экспозиции клеток в растворах криопротекторов [8]. После этого происходит более медленное восстановление осмотического равновесия на клеточной мембране. Наблюдаемая тенденция к уменьшению ингибирования восстановления спи-

cryoprotectant concentration this protective function of cytoplasm membrane of hepatocytes is decreased and at 30% w/w the efficiency of spin probe reduction is decreased twice if compared with the corresponding control for all the studied cryoprotectants. It should be noted that cytoplasm membrane of hepatocytes neutralizes the observed for mitochondria suspensions differences of inhibiting effect of different cryoprotectants. The ability for reduction of the spin probe in hepatocyte suspension is practically similar to equal concentrations of studied cryoprotectants. At this the tendency of glycerol < 1,2-PD < DMSO row inhibition degree, established in mitochondria suspensions is preserved.

The research results (Fig. 4) show that temporary exposure of hepatocytes in hypertonic medium of the studied cryoprotectants up to 40 min does not significantly affect spin probe reduction inhibition degree. This character of changes is fully expected. When adding into hepatocyte suspension of hypertonic solutions of penetrating cryoprotectants the traditional two-phase reaction of cells is usually observed [8]. First of all, the process of rapid dehydration takes place, then the recovery of initial volume of cells occurs, wherein a part of intracellular water is replaced by cryoprotectant molecules. Afterwards slower recovery of osmotic equilibration on cell membrane is present. The observed tendency to the decrease in the inhibition of spin probe reduction in hepatocyte suspension after



**Рис. 4.** Изменения констант скоростей восстановления зонда ТЕМПОН в суспензиях intact hepatocytes (□) и в присутствии криопротекторов (ДМСО (■); 1,2-пропандиол (▨); глицерин (▩)) при экспозиции клеток в 30%-х растворах веществ; \* – достоверные отличия по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

**Fig. 4.** Changes of constants of TEMPON probe reduction rates in intact (□) hepatocyte suspensions and in presence of cryoprotectants (DMSO (■), 1,2-propanediol (▨); glycerol (▩)) at the exposure of cells in 30% solutions of the substances; \* – significant differences if compared with control,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ .

нового зонда в суспензии гепатоцитов после 40-минутной экспозиции в растворах криопротекторов может быть следствием частичного выхода молекул криопротекторов из клеток и уменьшения их внутриклеточной концентрации в процессе восстановления осмотического равновесия. Из данных, представленных на рис. 4, видно, что более медленно этот процесс протекает в растворах глицерина и более быстро – в суспензиях гепатоцитов, содержащих ДМСО.

### Выводы

С использованием спинового зонда ТЕМПОН методом ЭПР проведены исследования влияния низкомолекулярных криопротекторов глицерина, 1,2-пропандиола и ДМСО на активность дыхательной цепи мембран митохондрий. Изученные низкомолекулярные криозащитные вещества ингибируют восстановление спинового зонда в суспензиях митохондрий. Это происходит из-за уменьшения активности переносчиков электронов и протонов внутренней мембраны митохондрий и окислительно-восстановительных процессов дыхательной цепи, что свидетельствует об ингибировании исследованными криопротекторами дыхания органелл. Степень ингибирования нарастает в ряду глицерин < 1,2-ПД < ДМСО. Исследования влияния эндоцеллюлярных криопротекторов на активность дыхания митохондрий в составе гепатоцитов показали, что цитоплазматическая мембрана препятствует непосредственному взаимодействию молекул криопротекторов с ферментным ансамблем дыхательной цепи митохондрий, что приводит к несколько меньшему ингибированию восстановления спинового зонда, особенно для ДМСО. С ростом концентрации криопротекторов такая защитная функция цитоплазматической мембраны гепатоцитов уменьшается. Установлено также, что временная экспозиция гепатоцитов в гипертонических средах исследованных криопротекторов до 40 мин не оказывает существенного влияния на степень ингибирования восстановления спинового зонда.

### Литература

1. Бауст Дж.Г., Бауст Дж.М., Шнайдер К. и др. Биосохранение – уменьшение отрицательных последствий консервирования на молекулярном уровне // Пробл. криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 163.
2. Білоус А.М., Мойсєєв В.О., Бондаренко В.А., Нардід О.А. Про механізм дії поліетиленоксидів на біологічні системи // Вісник АН УРСР. – 1978. – №3. – С. 25–36.
3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 432 с.
4. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 144 с.

40 mins exposure in solutions of cryoprotectants may be a result of partial release of cryoprotectant molecules from the cells and their intracellular concentration fall at osmotic equilibration recovery. The data in Fig. 4 show that this process was more slowly in the solutions of glycerol and faster in the suspensions of hepatocytes, containing DMSO.

### Conclusions

The investigations of the effect of glycerol, 1,2-propane diol and DMSO low molecular cryoprotectants on activity of mitochondria membrane respiratory chain were carried out with TEMPON spin probe by EPR method. The used low molecular cryoprotective substances inhibit the spin probe reduction in suspensions of mitochondria. It occurs because of the decrease of activity of electron and proton transfer agents mitochondria internal membrane and redox processes of respiratory chain, that testify to the inhibition of organelle respiration by the studied cryoprotectants. The degree of inhibition increases at glycerol < 1,2-PD < DMSO row. The studies of endocellular cryoprotectant effect on activity of mitochondria respiration as a part of whole hepatocytes have shown that cytoplasm membrane prevents direct interaction of cryoprotectant molecules with enzyme group of mitochondria respiratory chain, resulting in lower inhibition of spin probe reduction, especially in the case of DMSO. This protective function decreased with the rise in cryoprotectant concentration. It has been established that temporary exposure of hepatocytes in hypertonic media of the studied cryoprotectants up to 40 min does not affect inhibition extent of spin probe reduction.

### References

1. Baust J.G., Baust J.M., Shnyder K. et al. Biopreservation – molecular-based mitigation of the preservation challenges // Problems of Cryobiology. – 2008. – Vol. 18, N2. – P. 163.
2. Belous A.M., Moiseev V.O., Bondarenko V.A., Nardid O.A. About mechanism of polyethylene oxide activity on biological systems // Visnyk AN UkrSSR. – 1978. – N3. – P. 25–36.
3. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 432 p.
4. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 144 p.
5. Zhdanov R.I. Paramagnetic models of bioactive compounds. – Moscow: Nauka, 1981. – 280 p.
6. Koltover V.K. Studying of electron-transporting biological membranes by molecular probes method: Abstract of the Thesis of Cand. Phys.-Math. Sci. – Moscow, 1971. – 15 p.
7. Kravtsov Yu.V. Researches by spin probe method of some structure and functional characteristics of biological systems: Abstract of the Thesis of Cand. Biol. Sci. – Moscow, 1977. – 23 p.
8. Kuleshova I.G. Mechanism of posthypertonic lysis of isolated rat's hepatocytes during rehydration // Problems of Cryobiology. – 2006. – N4. – P. 351–362.

5. *Жданов Р.И.* Парамитохондриальные модели биологически активных соединений.— М.: Наука, 1981.— 280 с.
6. *Кольтовер В.К.* Исследование электронпереноса биологических мембран методом молекулярных зондов: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.— М., 1971.— 15 с.
7. *Кравцов Ю.В.* Исследования методом спинового зонда некоторых структурных и функциональных характеристик биологических систем: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1977.— 23 с.
8. *Кулешова Л.Г.* Механизм постгипертонического лизиса изолированных гепатоцитов крысы при регидратации // Пробл. криобиологии.— 2006.— Т. 16, №4.— С. 351–362.
9. *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.
10. *Нардид О.А.* Відновлення спінового зонда в оцінці життєздатності біологічних об'єктів // Фізика живого.— 2008.— Т. 16, №1.— С. 44–49.
11. *Нардид О.А.* Особливості температурних залежностей відновлення спінового зонда в суспензії мітохондрій // Фізика живого.— 2008.— Т. 16, №1.— С. 50–55.
12. *Осецкий А.И., Гурина Т.М., Кирилюк А.Л., Репин Н.В.* О механизме защиты криоконсервируемых биообъектов с помощью многокомпонентных криопротекторных растворов // Пробл. криобиологии.— 2008.— Т. 18, №2.— С. 231.
13. *Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д. и др.* Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активность // Биохимия.— 1991.— Т. 56, №9.— С. 1647–1651.
14. *Розанов Л.Ф.* Кінетика реакцій клітин на дію факторів криоконсервування: Автореф. дис. ... д-ра. біол. наук.— Харків, 1995.— 35 с.
15. *Семенченко О.А., Кравченко Л.П., Загноймо В.И., Андриченко А.Н.* Метаболическая активность криоконсервированных гепатоцитов // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем: Сб. науч. трудов.— Харьков, 1989.— С. 109–112.
16. *Смолянинова Е.И., Пишко О.В., Лисина Е.Г. и др.* Анализ влияния различных этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши // Пробл. криобиологии.— 2007.— Т. 17, №4.— С. 385–393.
17. *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.
18. *Патент України №30888А МПК 6А01N1/02.* Спосіб консервування еритроцитів / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, С. Суміда, В.А. Бондаренко, Н.Г. Землянських, Т.П. Бондаренко. Заявлено 16.06.98; Опубл. 15.12.2000.— Бюл. №7.
19. *Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H.* Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // Cryobiology.— 1987.—Vol. 24, N4.— P. 324–331.
20. *Bickis I. J., Kazaks K., Finn J.J., Henderson I.W.* Permeation kinetics of glycerol and dimethyl sulfoxide in Novikoff hepatoma ascites cells // Cryobiology.—1967.— Vol. 4, N1.— P. 1–10.
21. *Heber U.* Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing // Cryobiology.— 1968.— Vol. 5, N3.— P. 188–201.
22. *Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K.* Poly(ethylenemazur glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // Biophys. J.— 1995.— Vol. 68, N2.— P. 525–535.
23. *Mosolova I.M., Gorskaya A.I., Sholts K.F. et al.* Isolation of intact mitochondria from rats' liver // In: Methods of Current Biochemistry.— Moscow: Nauka, 1975.— P. 45–47.
24. *Nardid O.A.* Regeneration of spin probe at evaluation of biological objects viability // Fyzyka Zhyvogo.— 2008.— Vol. 16, N1.— P. 44–49.
25. *Nardid O.A.* Specificity of temperature dependencies of spin probe regeneration in suspension of mitochondria // Fyzyka Zhyvogo.— 2008.— Vol. 16, N1.— P. 50–55.
26. *Osetsky A.I., Gurina T.M., Kirilyuk A.L., Repin N.V.* About mechanism of cryopreserved bioobject protection with multi-component cryoprotectant solutions // Problems of Cryobiology.— 2008.— Vol. 18, N2.— 231 p.
27. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Roslyakov A.D. et al.* Deriving of rat's hepatocytes by non-enzyme method the detoxification and respiratory activity // Biokhimiya.— 1991.— Vol. 56, N9.— P. 1647–1651.
28. *Rozanov L.F.* Kinetics of cell reactions on effect of cryopreservation factors: Abstract of the Thesis of Doc. Biol. Sci.— Kharkov, 1995.— 35 p.
29. *Semenchenko O.A., Kravchenko L.P., Zagnoyko V.I., Andrienko A.N.* Metabolic activity of cryopreserved hepatocytes: Coll. Of Sci. Reports "Biochemical aspects of cryodamage and cryoprotection of cell systems".— Kharkov, 1989.— P. 109–112.
30. *Smolyaninova Ye.I., Pishko O.V., Lisina E.G., et al.* Analysis of effect of different steps of vitrification protocol for cryopreservation with ethylene glycol-sucrose medium on 2-cell murine embryo viability // Problems of Cryobiology.— 2007.— Vol. 17, N4.— P. 385–393.
31. *Yaguzhinskiy L.S., Chumakov V.M., Ivanov V.P. et al.* Interaction of iminoxyl spin-label with system of electron transport in mitochondria // Doklady of Academy of Sciences of the USSR.— 1971.— Vol. 197, N4.— P. 969–972.
32. *Patent N30888A IPC 6A01N1/02.* Cryopreservation method of erythrocytes / L.O. Babiychuk, V.I. Grischenko, S. Sumida, V.A. Bondarenko, N.G. Zemlyanskikh, T.P. Bondarenko. Applied 16.06.98 Publ. 15.12.2000.— Bul. N7.
33. *Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H.* Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // Cryobiology.— 1987.—Vol. 24, N4.— P. 324–331.
34. *Bickis I. J., Kazaks K., Finn J.J., Henderson I.W.* Permeation kinetics of glycerol and dimethyl sulfoxide in Novikoff hepatoma ascites cells // Cryobiology.—1967.— Vol. 4, N1.— P. 1–10.
35. *Heber U.* Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing // Cryobiology.— 1968.— Vol. 5, N3.— P. 188–201.
36. *Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K.* Poly(ethylenemazur glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // Biophys. J.— 1995.— Vol. 68, N2.— P. 525–535.
37. *Lovelock J. E., Bishop M. W.* Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide // Nature.— 1959.— Vol. 183, N4672.— P. 1394–1395.
38. *Mazur P., Farrant J., Leibo S. P., Chu E. H.* Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing. Interactions between protective solutes and cooling and warming rates // Cryobiology.— 1969.— Vol. 6, N1.— P. 1–9.
39. *Moiseyev V.A., Nardid O.A., Belous A.M.* On a possible mechanism of the protective action of cryoprotectants // Cryo-Letters.— 1982.— Vol. 3, N1.— P. 17–26.
40. *Quintanilha A.T., Racker L.* Surface localization of sites of reduction of nitroxide spin-labeled molecules in mitochondria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74, N2.— P. 570–574.

23. *Lovelock J. E., Bishop M. W.* Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide // *Nature*.– 1959.– Vol. 183, N4672.– P. 1394–1395.
24. *Mazur P., Farrant J., Leibo S. P., Chu E. H.* Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing. Interactions between protective solutes and cooling and warming rates // *Cryobiology*.– 1969.– Vol. 6, N1.– P. 1–9.
25. *Moiseyev V.A., Nardid O.A., Belous A.M.* On a possible mechanism of the protective action of cryoprotectants // *Cryo-Letters*.– 1982.– Vol. 3, N1.– P. 17–26.
26. *Quintanilha A.T., Racker L.* Surface localization of sites of reduction of nitroxide spin-labeled molecules in mitochondria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.– 1977.– Vol. 74, N2.– P. 570–574.
27. *Simione F.P.* Cryopreservation manual.– Nalge Europe Ltd, 1992.– 9 p.

*Accepted in 24.03.2009*

*Поступила 24.03.2009  
Рецензент Д.В. Черкашина*