

Исследование влияния некоторых проникающих криопротекторов на микросомы методом хемилюминесценции

Е.В. Онищенко, А.В. Зинченко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Effect of Some Permeable Cryoprotectants on Microsomes Using Chemiluminescence Method

E.V. ONISCHENKO, A.V. ZINCHENKO

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

Методом хемилюминесценции (ХЛ) изучали влияние замораживания и низкомолекулярных криопротекторов на интенсивность перекисных процессов в микросомах печени крыс. В качестве криопротекторов использовали растворы глицерина (Гл), 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и ДМСО, приготовленные на трис-буфере в диапазоне концентраций от 5 до 40 масс %. Отмечено, что значения спонтанной хемилюминесценции (СХЛ) амплитуды и светосуммы H_2O_2 и Fe^{2+} -индуцируемой ХЛ возрастают при содержании криопротекторов в суспензии микросом выше 30 масс %.

Ключевые слова: микросомы печени, криопротекторы, перекисное окисление липидов, свободнорадикальные процессы, хемилюминесценция.

Методом хемілюмінесценції вивчали вплив заморожування і низькомолекулярних криопротекторів на інтенсивність процесів ПОЛ у микросомах печінки щурів. Як криопротектори використовували розчини гліцерину, 1,2-пропандіолу і ДМСО, виготовлені на трис-буфері в діапазоні концентрацій від 5 до 40 мас %. Зазначено, що показники спонтанної хемілюмінесценції, амплітуди і світлосуми H_2O_2 та Fe^{2+} -індукованої хемілюмінесценції зростають при вмісті криопротекторів у суспензії микросом вище 30 мас %.

Ключові слова: микросоми печінки, криопротектори, перекисне окислення ліпідів, вільнорадикальні процеси, хемілюмінесценція.

The effect of freezing and low molecular cryoprotectants on the intensity of peroxidative processes in rat's liver microsomes have been studied using chemiluminescence (CL) method. As cryoprotectants (CP) we used solutions of glycerol (Gl), 1,2-propane diol (1,2-PD) and DMSO, prepared on Tris-buffer within the concentration range from 5 to 40% (w/w). The values of spontaneous chemiluminescence (SCL), amplitude, H_2O_2 light sum and Fe^{2+} -induced CL were noted to augment when the cryoprotectant content in microsome suspension was higher than 30% (w/w).

Key-words: liver microsomes, cryoprotectants, lipid peroxidation, free-radical processes, chemiluminescence.

Клеточные мембраны биологических объектов являются наиболее повреждающимися структурами под действием низких температур. Развитию низкотемпературной деструкции мембран способствует свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ). Гипоксия, действие гиперконцентраций солей, нарушение структурной интеграции мембраны, которые могут возникать в процессе замораживания-оттаивания, способствуют развитию процессов ПОЛ в мембранных структурах клетки [2]. Уровень ПОЛ является одним из важнейших тестов на степень повреждения биообъектов. Последствием изменения состояния липидного бислоя клеточных мембран может стать нарушение скорости липопероксидации. При цепных реакциях пероксидации липидов образуются токсичные продукты, влияющие на активность ферментов, которые обеспечивают оптимальное функционирование e^- -транспортной цепи гидроксиланой системы [9]. Процессы ПОЛ

Cell membranes of biological objects are the most impaired structures under low temperature effect. Free-radical lipid peroxidation (LPO) contributes to the development of low temperature destruction in membranes. Hypoxia, effect of salt hyperconcentrations, disorder in membrane structural integration, which can occur within the freeze-thawing process, contribute to the LPO process development in membrane structures of cell [2]. LPO level is one of the most important tests to determine the damage extent in bioobjects. The disorder in lipid peroxidation rate can be the consequence of a change in lipid bilayer state of cell membranes. During lipid peroxidation chain reactions the toxic products are formed. They affect the activity of enzymes, which provide an optimal functioning of e^- -transport chain of hydroxyl system [9]. The LPO processes are highly sensitive to the presence of such substances of exogenous origin as xenobiotics [7], cryoprotective substances [5] in biological systems. As the examples of spleen and

Адрес для корреспонденции: Зинченко А.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-61-41, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: alexazin@mail.ru

Address for correspondence: Zinchenko A.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 6141, fax: +380 57 772 0084, e-mail: alexazin@mail.ru

весьма чувствительны к присутствию в биологической системе таких веществ экзогенного происхождения, как ксенобиотики [7], криозащитные вещества [5]. Как было показано на примере фрагментов тканей селезенки и печени в присутствии ДМСО, глицерина, ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 [3,8], степень влияния экзогенных веществ на процессы ПОЛ зависит от концентрации криозащитных веществ и от времени экспозиции биообъектов в растворах криопротекторов. При этом охлаждение-нагрев оказывают дополнительное влияние на процессы липопероксидации. Эксперименты, проводимые на таких сложных биологических системах, как ткани, позволяют установить общую картину влияния различных факторов на процессы ПОЛ. Для понимания их механизмов действия можно использовать модельные системы, в частности, микросомальные мембраны.

Цель данной работы – исследование влияния глицерина, ДМСО, 1,2-ПД и низких температур на характер перекисных процессов в микросомальных мембранах печени крыс методом ХЛ.

Материалы и методы

В работе использовали крыс-самцов линии Вистар массой 180-200 г. Эксперименты проведены в соответствии с Общими принципами экспериментов на животных, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985). Микросомальную фракцию получали методом дифференциального ультрацентрифугирования [1]. Микросомы суспендировали в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,2). Содержание белка в суспензии, определяемое по методу Лоури в модификации Миллера [11], составляло 20-40 мг/мл. Конечная концентрация глицерина, ДМСО и 1,2-ПД в микросомальной суспензии изменялась от 5 до 40 масс %. Образцы охлаждали до -196°C погружением в жидкий азот с последующим нагревом на водяной бане при 37°C . Сохранность микросом оценивали по степени интенсификации в них процессов ПОЛ.

В кювету, содержащую 1 мл 50 мМ трис-НСl, добавляли 0,1 мл микросомальной суспензии и 50 мкл 3%-го раствора H_2O_2 или 50 мкл раствора, содержащего FeSO_4 . Конечная концентрация Fe^{2+} составляла 5 мМ. В суспензии микросомальной фракции определяли интенсивность СХЛ, интегрально отражающей состояние свободнорадикальных процессов, и кинетические характеристики

liver's tissue fragments in DMSO, glycerol, PEG-400 and PEG-1500 presence [3, 8] demonstrate, the extent of exogenous substances effect on LPO processes depends on the concentration of cryoprotective substances and exposure time of bioobjects in CP solutions. At the same time the cooling-heating causes an additional effect on lipid peroxidation processes. The experiments, performed in such complicated biological systems as tissues, allow to elucidate the general pattern of the effect of different factors on LPO processes. For understanding their active mechanisms we can use the model systems, and the microsomal membranes, in particular.

This work was aimed to study the effect of glycerol, DMSO, 1,2-PD and low temperatures on the character of peroxidation processes in rat's liver microsomal membranes with CL method.

Materials and methods

In the work we used 180-200 g Wistar male rats. The experiments were carried-out in accordance with General Principles of Experiments in animals, adopted by the 1st National Congress on Bioethics (Kiev, Ukraine, 2001) and coordinated with the Statement of European Convention on Vertebrate Protection, Used for Experimental and other Scientific Aims (Strasbourg, France, 1985). Microsomal fraction was obtained using the method of differential centrifugation [1]. Microsomes were suspended in the medium, containing 50 mM of Tris-HCl (pH 7.2). The protein content in a suspension, determined by Lowry method in Miller's modification [11] made 20-40 mg/ml. Final concentration of DMSO and 1,2-PD in microsomal suspension changed from 5 to 40% (w/w). The samples were cooled down to -196°C by immersing into liquid nitrogen with following heating on water bath at 37°C . Microsome integrity was evaluated by the intensification degree of LPO processes in them.

We added 0.1 ml of microsomal suspension and 50 μl of FeSO_4 -contained solution into the flask with 1 ml of 50 mM Tris-HCl. The final concentration of Fe^{2+} made 5 mM. In suspension of microsomal fraction we determined the SCL intensity, integrally reflecting the state of free-radical processes and kinetic characteristics (flash amplitude and light sum) of Fe^{2+} and H_2O_2 - induced CL, by which we judged about the intensity of LPO processes and content of lipid hydroperoxides, antiradical and antioxidant activity [6]. The investigations were carried-out with chemiluminometer AK-01 [10]. All chemiluminescent indices were calculated in pulse/sec \times mg of protein.

The data obtained were processed with methods of variation statistics by applying parametric and non-parametric criteria [4].

(амплитуда вспышки и светосумма) ХЛ, индуцированной Fe^{2+} и H_2O_2 , по которым судили об интенсивности процессов липопероксидации и содержании гидроперекисей липидов, антирадикальной и антиоксидантной активности [6]. Исследования проводили на хемилюминометре АК-01 [10]. Все хемилюминесцентные показатели пересчитывали в имп/с×мг белка.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с применением параметрических и непараметрических критериев [4].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные об изменении СХЛ микросомальной суспензии до и после замораживания в присутствии КП в концентрациях 5-40 масс %. Полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление от 5 до 40 масс % глицерина, 1,2-ПД и ДМСО в микросомальную суспензию практически не влияет на интенсивность СХЛ (отличия незначительны).

Охлаждение суспензий микросом до $-196^{\circ}C$ и последующий их нагрев до $37^{\circ}C$ приводят к незначительному увеличению интенсивности СХЛ. Достоверное увеличение СХЛ микросомальной фракции наблюдается в присутствии КП, начиная от 30 масс % после охлаждения-нагрева, что свидетельствует о том, что КП в этих концентрациях вызывают усиление процессов ПОЛ, вероятно, в результате дестабилизирующего действия на микросомальные мембраны. Следует отметить, что этот эффект более выражен при использовании в качестве криопротектора ДМСО.

Аналогичное влияние ДМСО наблюдалось также и на кинетических параметрах ХЛ, индуцированной Fe^{2+} (рис. 2). Известно, что амплитуда вспышки Fe^{2+} -индуцированной ХЛ пропорциональна количеству гидроперекисей в биообъекте. Замораживание микросомальных мембран не приводит к значительному увеличению интенсивности свечения (рис.2, а). Достоверные отличия данного показателя наблюдаются в микросомальной фракции в присутствии ДМСО в диапазоне концентраций от 30 до 40 масс %, что говорит о возрастании количества гидроперекисей в микросомальной суспензии. В присутствии 1,2-ПД и глицерина в концентрациях 5 и 30 масс % после низкотемпературного воздействия отмечается снижение показателя амплитуды Fe^{2+} -индуцируемой ХЛ, что указывает на снижение количества гидроперекисей в суспензии микросом.

Показатель светосуммы Fe^{2+} -индуцируемой ХЛ микросом, подвергавшихся воздействию низких температур, возрастает в 2 раза по сравнению с контролем, что свидетельствует о выраженном уменьшении устойчивости микросом-

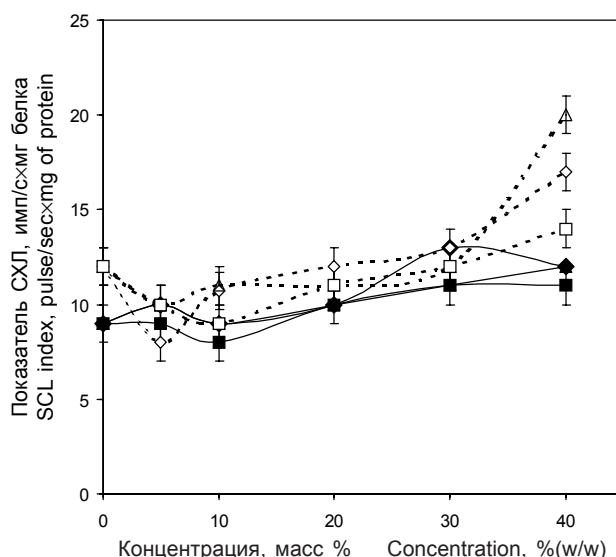


Рис.1. Зависимость СХЛ микросом от концентрации КП до и после замораживания. ◆ – микросомы + 1,2-ПД; ◇ – микросомы + 1,2-ПД (замороженные-оттаянные); ▲ – микросомы + ДМСО; △ – микросомы + ДМСО (замороженные-оттаянные); ■ – микросомы + Гл; □ – микросомы + Гл (замороженные-оттаянные).

Fig. 1. Dependency of microsomes SCL on CP concentration before and after freezing. ◆ – microsome + 1,2-PD; ◇ – microsome + 1,2 PD (frozen-thawed); ▲ – microsome + DMSO; △ – microsome + DMSO (frozen-thawed); ■ – microsome + Gl; □ – microsome + Gl (frozen-thawed).

Results and discussion

The Fig. 1 presents the data about a change in SCL of microsomal suspension before and after freezing at CP presence under 5-40% (w/w) concentrations. The obtained results testify to the fact, that the addition of 5-40% (w/w) of glycerol, 1,2-PD and DMSO into a microsomal suspension does not practically affect the SCL intensity (differences are not statistically significant).

The cooling of microsome suspensions down to $-196^{\circ}C$ and their following heating up to $37^{\circ}C$ result in a slight increase in SCL intensity. A statistically significant augmentation of microsomal fraction SCL is observed at the presence of CP, starting from 30% (w/w) after cooling-heating, that testifies to the fact, that CP under these concentrations cause the strengthening of LPO processes, probably, as a result of a destabilising effect on microsomal membranes. It should be noted, that this effect is more manifested when using DMSO as a cryoprotectant.

The same DMSO effect was also observed on kinetic parameters of Fe^{2+} -induced CL (Fig. 2). The flash amplitude of Fe^{2+} -induced CL is known to be proportional to the number of hydroperoxides in a bioobject. The freezing of microsomal membranes does not result in a considerable increase of glow intensity (Fig. 2, a). Statistically significant differences of this index are observed in microsomal fraction at DMSO

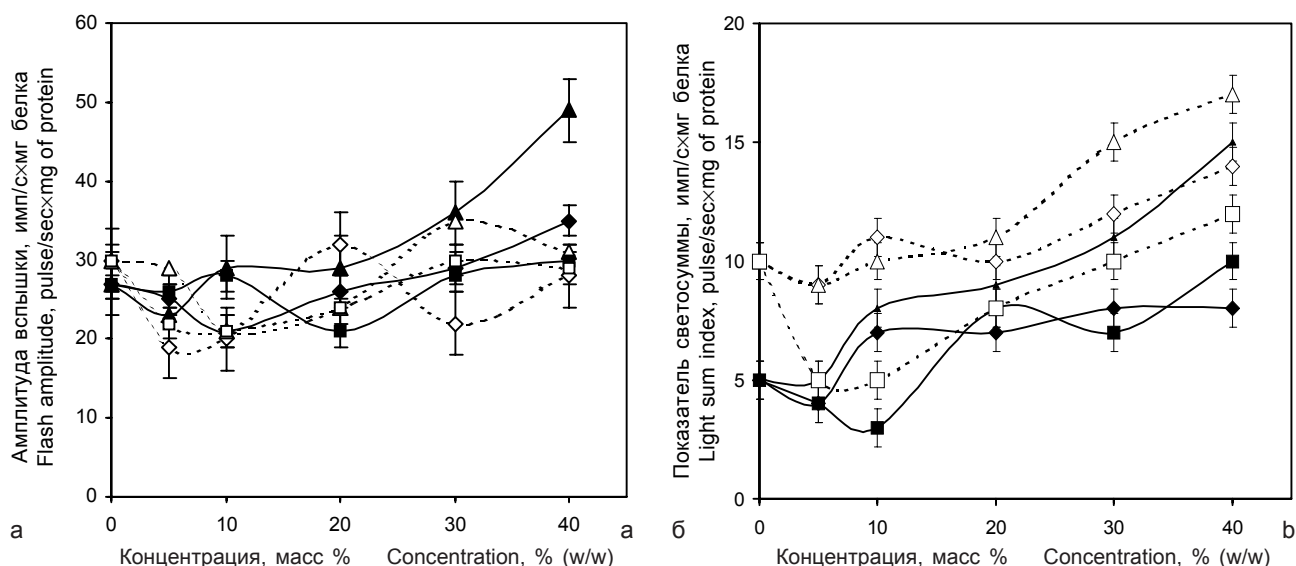


Рис. 2. Зависимость амплитуды вспышки (а) и светосуммы (б) Fe^{2+} -индуцируемой ХЛ микросом от концентрации КП до и после замораживания. ◆ – микросомы+1,2-ПД; ◇ – микросомы + 1,2-ПД (замороженные-оттаянные); ▲ – микросомы + ДМСО; △ – микросомы + ДМСО (замороженные-оттаянные); ■ – микросомы + Гл; □ – микросомы + Гл (замороженные-оттаянные).

Fig. 2. Dependency of flash amplitude (a) and of light-sum (b) of Fe^{2+} -induced CL of microsomes on CP concentration before and after freezing. ◆ – microsome + 1,2-PD; ◇ – microsome + 1,2-PD (frozen); ▲ – microsome+ DMSO; △ – microsome + DMSO (frozen); ■ – microsome + Gl; □ – microsome + Gl (frozen).

мальных мембран к перекисному окислению вследствие ускорения процессов липопероксидации и параллельного замедления окисления продуктов ПОЛ. Глицерин в концентрациях 5 и 10 масс % в суспензиях микросом, подвергнутых низкотемпературному воздействию, проявляет свойства антиоксиданта, на что указывает падение светосуммы Fe^{2+} -индуцируемой ХЛ (рис.2, б). Присутствие в растворе микросом ДМСО и глицерина в конечных концентрациях 40 масс % вызывает увеличение показателя светосуммы. ДМСО в концентрациях 30-40 масс % – значительный рост данного показателя после низкотемпературного воздействия на систему микросомы+ДМСО. Из этого следует, что эффект низкотемпературного воздействия и высоких концентраций ДМСО суммируется.

Об активности системы антиоксидантной защиты судили по амплитуде вспышки и светосумме свечения, индуцируемой H_2O_2 , что интегрально отражает количество антиоксидантов в суспензии микросом. Для микросом печени крыс в растворах в присутствии глицерина, 1,2-ПД и ДМСО в концентрациях 5-40 масс % наблюдается монотонный рост показателей амплитуды вспышки. В данном случае можно говорить об изменении интенсивности свободнорадикальных процессов, ПОЛ и антирадикальной активности в микросомах печени крыс. Под действием низких температур происходит рост показателя амплитуды в суспензиях микросом почти в 2 раза, в то время как в

presence within the concentration range from 30 to 40% (w/w), that testifies to the augmentation of hydroperoxide number in microsomal suspension. At the presence of 1,2-PD and glycerol under 5 and 30% (w/w) concentrations after low temperature effect there is observed a decrease in amplitude index of Fe^{2+} -induced CL, that indicates to the reduction of hydroperoxide number in microsome suspension.

The light-sum index of Fe^{2+} -induced CL of microsomes, underwent the effect of low temperatures, increases twice in comparison with the control, that testifies to a manifested decrease in microsomal membrane resistance to peroxidation due to the acceleration of lipid peroxidation processes and a parallel slowing down of LPO product oxidation. Glycerol under 5 and 10% (w/w) concentrations in microsome suspensions, subjected to low temperature effect, manifests the properties of antioxidant, that is testified by a sharp decrease of light-sum index (Fig. 2, b). The presence in the solution of DMSO and glycerol microsomes in 40% (w/w) final concentrations causes an increase in light-sum index, that of DMSO under 30-40% (w/w) concentrations does a considerable growth of this index after low temperature effect on microsomes +DMSO system. Following that the effect of low temperatures and that of high concentrations of DMSO is summarised.

About the activity of antioxidant protection system we judged upon the flash amplitude and H_2O_2 -induced light sum of glow, that integrally reflects the number of antioxidants in microsome suspension. For rat's liver

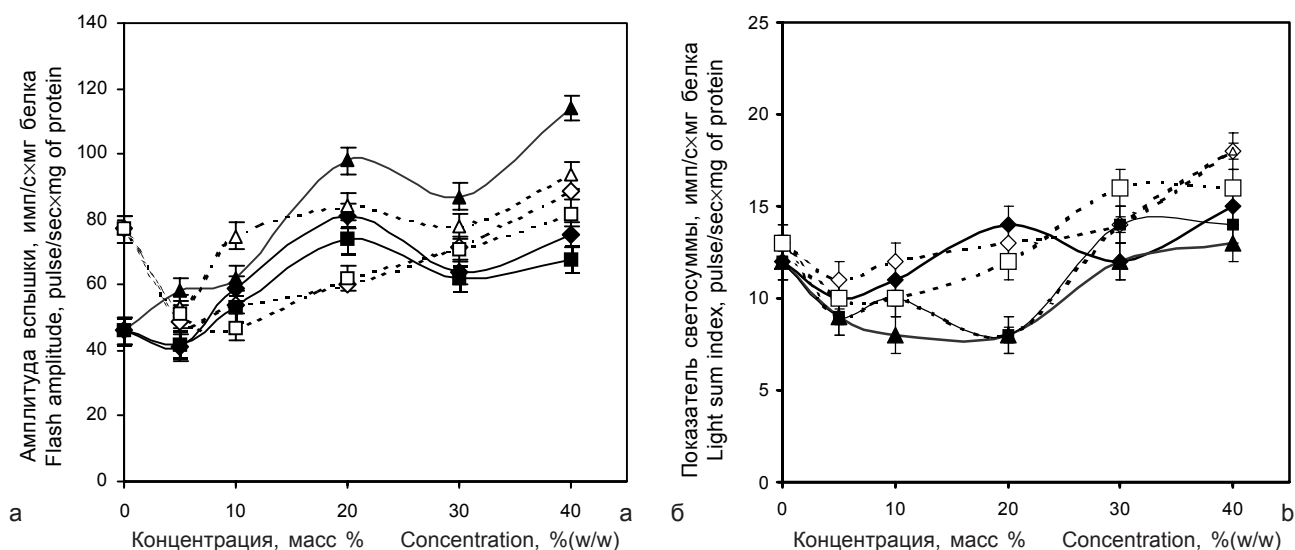


Рис. 3. Зависимость амплитуды вспышки (а) и светосуммы (б) H_2O_2 -индуцируемой ХЛ микросом от концентрации КП до и после замораживания. \blacklozenge – микросомы + 1,2-ПД; \diamond – микросомы + 1,2-ПД (замороженные-оттаянные); \blacktriangle – микросомы + ДМСО; \triangle – микросомы + ДМСО (замороженные-оттаянные); \blacksquare – микросомы + Гл; \square – микросомы + Гл (замороженные-оттаянные).

Fig. 3. Dependency of flash amplitude (a) and of light-sum (b) of H_2O_2 -induced CL of microsomes on CP concentration before and after freezing. \blacklozenge – microsome + 1,2-PD; \diamond – microsome + 1,2 PD (frozen-thawed); \blacktriangle – microsome+DMSO; \triangle – microsome + DMSO (frozen-thawed); \blacksquare – microsome + Gl; \square – microsome + Gl (frozen-thawed).

присутствии КП изменения этого показателя носят более сложный характер (рис.3, а). Начиная с концентрации 30 масс % для 1,2-ПД, глицерина и ДМСО, отмечается рост амплитуды H_2O_2 -индуцированной ХЛ, что может быть вызвано как нарушениями структуры мембраны, так и потерей антиоксидантов, встроенных в мембрану.

На рис. 3, б представлена зависимость светосуммы H_2O_2 -индуцированной ХЛ микросом от концентрации КП до и после замораживания. Видно, что показатель светосуммы после замораживания суспензий микросом увеличивается незначительно. В зависимости от термической обработки и вида криопротектора в диапазоне концентраций от 0 до 20-30 масс % заметна тенденция к снижению показателя светосуммы H_2O_2 -индуцированной ХЛ в суспензиях микросом. При содержании КП, начиная с 30 масс % и выше, в суспензии микросом, подвергнутых низкотемпературному воздействию, увеличивается показатель светосуммы H_2O_2 -индуцированной ХЛ. Это указывает на то, что при концентрации не выше 20-30 масс %, вероятно, наблюдается стабилизация микросомальных мембран, в то время как повышение концентрации КП приводит к уменьшению устойчивости к перекисному окислению микросомальных мембран, что может быть обусловлено нарушением их структуры.

Выводы

1. Низкотемпературное воздействие приводит к некоторому уменьшению устойчивости микро-

microsomes in solutions at the presence of 1,2-PD and DMSO under 5-40% (w/w) concentrations a monotonous growth of flash amplitude indices is observed. In this case we can speak about the change in the intensity of free radical processes, LPO and antiradical activity in rat's liver microsomes. Under low temperature effect nearly double growth of amplitude index in microsome suspensions occurs, meanwhile at CP presence the changes in this index are of more complicated character (Fig. 3, a). Starting from 30% (w/w) concentration for 1,2-PD, glycerol and DMSO a growth in amplitude of H_2O_2 -induced CL is noted, that can be caused by both disorders in membrane structure and loss of antioxidants, built into membrane.

The Fig. 3, b presents the dependency of light sum of H_2O_2 -induced CL of microsomes on CP concentration before and after freezing. The light sum index after microsome suspension freezing is seen as slightly increased. Depending on heat treatment and a kind of CP within the concentration range from 0 to 20-30% (w/w) the tendency to a decrease in light sum index of H_2O_2 -induced CL in microsome suspensions is marked. Under CP content, starting from 30% (w/w) and higher in microsome suspension, underwent the low temperature effect, there is an increase in light sum index of H_2O_2 -induced CL. This indicates to the fact, that under concentration not higher than 20-30% (w/w) the stabilisation of microsomal membranes is probably observed, meanwhile an increase in CP concentration results in a decrease of resistance to lipid peroxidation of microsomal membranes, that can be stipulated by the disorder in their structure.

сомальных мембран к перекисному окислению вследствие ускорения процессов липопероксидации и параллельного замедления окисления продуктов ПОЛ.

2. Глицерин в концентрациях 5 и 10 масс % в суспензиях микросом, подвергнутых низкотемпературному воздействию, проявляет свойства антиоксиданта, о чем свидетельствует падение показателя светосуммы Fe²⁺-индуцируемой ХЛ.

3. Присутствие ДМСО, 1,2-ПД, глицерина в концентрациях 30-40 масс % приводит к уменьшению устойчивости к перекисному окислению микросомальных мембран, что может быть обусловлено нарушением их структуры.

4. По дестабилизирующему действию на микросомальные мембраны КП можно расположить в ряд ДМСО>1,2-ПД>Гл.

Литература

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление.— М.: "Наука", 1975.— 327 с.
2. Белоус А.М. Проблемы криобиохимии мембранных структур // Пробл. криобиологии.— 1997.— №1-2.— С. 19-23.
3. Гальченко С.Е., Мамонтова А.В., Сандомирский Б.П. Влияние режимов криоконсервирования фрагментов селезенки свиньи на интенсивность перекисных процессов // Пробл. криобиологии.— 1998.— №1.— С. 58-61.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. Ю.А.Данилова.— М.: Практика, 1998.— 459 с.
5. Гордиенко А.Д., Кудокотцева Е.В. Изучение функционального состояния митохондрий в клеточных суспензиях, экспонированных в растворе криопротектора // Криобиология и криомедицина.— 1980.— Вып. 7.— С. 32-34.
6. Журавлев А.И. Спонтанная биоchemiluminescence животных тканей // Биохемилуминесценция.— М., 1983.— С. 3-30.
7. Зенков Н.К., Меншикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи современной биологии.— 1993.— №3.— С. 286-296.
8. Сандомирский Б.П., Гальченко С.Е., Тыныныка Л.Н. Сохранность фрагментов печени половозрелых свиней и новорожденных поросят при различных условиях криоконсервирования // Пробл. криобиологии.— 2003.— №4.— С. 77-84.
9. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимирова, О.А.Азизова, А.И.Деев и др. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика.— 1991.— Т. 29.— С. 78-83.
10. Пат. 52464А UA, МПК⁷ G01N21/76. Пристрій для хемілюмінесцентних досліджень / Ф.А. Колодуб, В.М. Абашин(UA); Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського АМН України (UA).— №2002064693; Заявлено 07.06.2002; Опубл.16.12.2002, Бюл.№12.—С.3.
11. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Analyt. Chem.— 1959.— Vol. 31, N5.— P. 964-966.

Поступила 23.11.2004

Conclusions

1. Low temperature effect results in some reduction of microsomal membrane resistance to lipid peroxidation due to its process' acceleration of lipid peroxidation processes and a parallel slowing down of oxidation of LPO products.

2. Glycerol under 5 and 10% (w/w) concentrations in microsome suspensions, subjected to low temperature effect manifests the properties of antioxidant, that is confirmed by the fall of light sum of Fe²⁺-induced CL.

3. The presence of DMSO, 1,2-PD and glycerol under 30-40% (w/w) concentrations results in a reduction of resistance to lipid peroxidation of microsomal membranes, that can be stipulated by the disorder in their structure.

4. According to a destabilising effect on microsomal membrane we can dispose CP in the following line: DMSO>1,2-PD>Gl.

References

1. Archakov A.I. Microsomal oxidation.— Moscow: Nauka, 1975.— 327 p.
2. Belous A.M. Problems of cryobiology of membrane structures // Problems of Cryobiology.— 1997.— N1-2.— P. 19-23.
3. Galchenko S.E., Mamontova A.V., Sandomirsky B.P. Effect of cryopreservation regimens of pig's spleen fragments on the intensity of peroxide processes // Problems of Cryobiology.— 1998.— N1.— P. 58-61.
4. Glants S. Medical and biological statistics / Trans. from English by Yu.A. Danilov.— Moscow: Praktika, 1998.— 459 p.
5. Gordienko A.D., Kudokotseva E.V. Study of functional state of mitochondria in cell suspensions, exposed in cryoprotectant solution // Kriobiologiya i kriomeditsina.— 1980.— Issue 7.— P. 32-34.
6. Zhuravlev A.I. Spontaneous biochemiluminescence of animal tissue // Biochemiluminescence.— Moscow, 1983.— P. 3-30.
7. Zenkov N.K., Menshikova E.B. Activated oxygen metabolites in biological systems // Uspekhii sovremennoy biologii.— 1993.— N3.— P. 286-296.
8. Sandomirsky B.P., Galchenko S.E., Tynynyka L.N. Integrity of adult pig and newborn piglets liver fragments under different cryopreservation conditions // Problems of Cryobiology.— 2003.— N4.— P. 77-84.
9. Free radicals in living systems / Yu.A. Vladimirov, O.A. Azizova, A.I. Deyev et al. // Itogi nauki i tekhniki. Section of Biophysics.— 1991.— Vol. 29.— P. 78-83.
10. Patent 52464A UA, IPC⁷ G01N21/76. Device for chemiluminescent research / F.A. Kolodub, V.M. Abashin (UA); V.Ya. Danilevsky Institute for Problems of Endocrine Pathology of Academy of Medical Sciences of Ukraine (UA).— N2002064693; Applied 07.06.2002; Issued 16.12.2002, Bull. N12.— P. 3.
11. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Analyt. Chem.— 1959.— Vol. 31, N5.— P. 964-966.

Accepted in 23.11.2004