

Влияние проникающих криопротекторов и низкой температуры на конформационное состояние микросомальных белков по данным УФ-спектрофотометрии

Е.В. Онищенко, Т.С. Дюбко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Penetrating Cryoprotectants and Low Temperature on Conformational State of Microsomal Proteins on UV-Spectrophotometry Data

E.V. ONISCHENKO, T.S. DYUBKO

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

Методом УФ-спектрофотометрии исследовали влияние низкомолекулярных проникающих криопротекторов (КП): глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и диметилсульфоксида (ДМСО), а также замораживания-отогрева в присутствии этих КП на конформационное состояние белков микросомальных мембран (БММ) из печени крыс. Показано, что эффективность взаимодействия КП с БММ зависит как от их концентрации, так и индивидуальных физико-химических свойств. Степень влияния КП на БММ во время цикла замораживания-отогрева значительно зависит от предварительной сенсibilизации микросомальных мембран на этапе их эквilibрации с КП. Исследованные КП по возрастанию пертурбирующего влияния на состояние БММ можно расположить в ряд: глицерин < ПД < ДМСО.

Ключевые слова: микросомы, белки, криопротекторы, глицерин, 1,2-пропандиол, диметилсульфоксид, замораживание, спектрофотометрия.

Методом УФ-спектрофотометрії досліджували вплив проникаючих низькомолекулярних криопротекторів (КП): гліцерину, 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) і диметилсульфоксиду (ДМСО), а також заморожування-відігрівання у присутності цих КП на конформаційний стан білків микросомальних мембран (БММ) із печінки щурів. Показано, що ефективність взаємодії КП із БММ залежить як від концентрації КП, так і від індивідуальних фізико-хімічних властивостей. Ступінь впливу КП на БММ під час заморожування-відігрівання в значній мірі залежить від попередньої сенсibilізації микросомальних мембран на етапі їх еквilibрації з КП. Досліджені КП по зростанню пертурбуючого впливу на стан БММ можна розташувати в ряд: гліцерин < 1,2-ПД < ДМСО.

Ключові слова: микросоми, білки, криопротектори, гліцерин, 1,2-пропандіол, диметилсульфоксид, заморожування, спектрофотометрія.

Effect of penetrating low molecular cryoprotectants (CPs): glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) as well the one of freeze-thawing with these cryoprotectants on conformational state of microsomal membrane proteins (MMP) derived from rats' liver have been studied with UV-spectrophotometry. The efficiency of CPs interaction with MMP has been shown to depend both on their concentration and individual physical and chemical properties. The degree of CPs effect on MMP during freeze-thawing in greater extent depends on pre-sensibilization of microsomal membranes at the stage of their equilibration with CPs. Examined CPs on ascending of perturbing effect on MMP state could be disposed in the row: glycerol < 1,2 PD < DMSO.

Key-words: microsomes, proteins, cryoprotectants, glycerol, 1,2- propane diol, dimethylsulfoxide, freezing, spectrophotometry.

Воздействие низких температур приводит к нарушению липид-белковых и липид-липидных взаимодействий в одних из наиболее криолабильных структур клетки – их мембранах [5, 16]. Инициированные понижением температуры структурные перестройки общих и аннулярных липидов, эффекты, связанные с дегидратацией, гиперконцентрацией солей, кристаллизацией [7], могут вызывать пространственное перераспределение белков, нарушение их третичной и четвертичной структур [16], агрегации с образованием S–S сшивок [24], диссоциации липопротеиновых комплексов [25]. Таким образом,

Low-temperature effect results in the disorder of lipid-protein and lipid-lipid interactions in ones of the most cryolabile structures of a cell: their membranes [5, 16]. Temperature reduction-initiated structural rearrangements of general and annular lipids, the effects associated with dehydration, hyperconcentrations of salts, crystallization [7] may cause a spatial redistribution of proteins, the impairment of their tertiary and quaternary structures [16], aggregation with the formation of S-S cross-linking [24], dissociation of lipoprotein complexes [25]. Thus preservation of native structure of membrane proteins and protein-lipid interaction in membranes is decisive factor not only in

Адрес для корреспонденции: Онищенко Е.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Onischenko E.V., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

сохранение нативной структуры мембранных белков и белок-липидных взаимодействий в мембранах является решающим фактором не только в поддержании интегративной целостности клеток, но и в обеспечении их функциональной полноценности в процессе криоконсервирования.

Одним из путей решения этой проблемы является использование искусственных криозащитных веществ – криопротекторов (некоторые одноатомные спирты, полиолы, сахара и высокомолекулярные соединения) [3, 21]. Установлено, что наряду с модификацией свойств растворителя (воды), приводящей к ослаблению влияния на клетки кристаллизации и гиперконцентрации солей (коллигативные свойства), КП могут оказывать защитный эффект в отношении клеточных мембран и их компонент сглаживанием, сдвигом в область низких температур или устранением фазовых переходов мембранных липидов [18]. Криопротекторы способны стабилизировать конформацию водорастворимых белков путем сорбции на их поверхности и частичного замещения гидратной воды [1, 13], а также влиять на термостабильность мембранных белков [10]. В то же время о механизмах влияния КП на состояние белков в составе биомембран на различных этапах низкотемпературного консервирования, включающего эквilibрацию с КП и собственно процедуру замораживания-отогрева, известно немного.

Цель данной работы – изучение влияния глицерина, 1,2-ПД и ДМСО на белки природных мембран на этапе эквilibрации с КП, а также в сочетании с действием низкотемпературного фактора (замораживания-отогрева) методом УФ-спектрофотометрии [8]. Моделью для проведения исследований выбраны мембраны, образованные эндоплазматическим ретикуломом печени крыс (микросомы) [2].

Материалы и методы

Микросомальную фракцию из гомогената печени крыс получали методом дифференциального центрифугирования при 105 000 г в течение 60 мин в среде, содержащей 1,15% KCl и 0,5 мМ ЭДТА, рН 7,4 [2]. Препараты микросом использовали непосредственно после получения. Эксперименты проводили на 5 независимо полученных препаратах с содержанием белка 0,1-0,75 мг/мл. Осадок ресуспендировали в 50 мМ трис-буфере, рН 7,4. Содержание белка в суспензии микросом определяли методом Лоури [26].

В работе применяли 1,2-ПД (ПО “Химпром”, Кемерово) марки “х.ч.”, ДМСО и глицерин “ч.д.а.” (“Реакхим”, Москва), ЭДТА и KCl квалификации “ч.д.а.” (“Sigma”, США). Перед использованием глицерин дополнительно очищали вакуумной

keeping integrity of cells, but also in providing their functional integrity during cryopreservation.

One of the ways to solve this problem is the usage of artificial cryoprotective substances: cryoprotectants (some monoatomic alcohols, polyols, sugars and highly molecular compounds) [3, 21]. It has been established that together with modification of solvent (water) properties, resulting in weakening of the effect on cells, crystallization and hyperconcentration of salts (colligative properties), CPs may render protective effect in respect of cell membranes and their components by smoothing, shifting towards low temperature region or eliminating phase transitions of membrane lipids [18]. Cryoprotectants are able to stabilize the conformation of water-soluble proteins by sorption on their surface or partial substitution of hydrate water [1, 13] as well as affect thermostability of membrane proteins [10]. At the same time there is poor knowledge about the mechanisms of CPs effect on the state of proteins in biomembrane composition at different stages of low temperature preservation, including equilibration with CPs and freeze-thawing itself.

The research aim is to study the effect of glycerol, 1,2-PD and DMSO on proteins of natural membranes at equilibration stage with CP and also in combination with the effect of low temperature factor (freeze-thawing) by UV-spectrophotometry [8]. Membranes formed by rats' liver endoplasmatic reticulum (microsomes) were chosen as the research models [2].

Materials and methods

Microsomal fraction derived from rats' liver homogenate was obtained by differential centrifugation at 105 000g for 60 min in the medium containing 1.15% KCL and 0.5 mM EDTA, pH 7.4 [2]. Preparations of microsomes were used right after obtaining. Experiments were performed in 5 independently obtained preparations with protein content of 0.1-0.75 mg/ml. Sediment was re-suspended in 50 mM tris-buffer, pH 7.4. Protein content in suspension of microsomes was examined with Lowry method [26].

In research there were used 1,2-PD (“Khimprom”, Russia) of “chemically pure” grade, DMSO and glycerol of “pure for analysis” grade (“Reakhim”, Moscow, Russia), EDTA and KCl of “pure for analysis” grade (“Sigma”, USA). Before being used glycerol was additionally purified by vacuum distillation, 1,2-PD and DMSO was done with preliminary absorption with activated carbon or aluminum oxide with following vacuum distillation. CPs solutions were prepared with twice distilled water using weighting and concentration was expressed in w/w percentage.

Microsome incubation in CPs solutions was performed at 20°C for 10 min. To investigate low temperature effect on MMP there was chosen less

дистилляцией, 1,2-ПД и ДМСО – предварительной адсорбцией на активированном угле или окиси алюминия с последующей вакуумной дистилляцией. Растворы КП готовили на дважды дистиллированной воде методом взвешивания и выражали концентрацию в массовых процентах (масс. %).

Инкубацию микросом в растворах КП производили при 20°C в течение 10 мин. Для изучения влияния низкой температуры на БММ был выбран наименее повреждающий режим, позволяющий свести к минимуму эффекты, сопутствующие снижению температуры [12, 22]. Для этого образцы в полистироловых ампулах объемом 3,0 мл погружали в жидкий азот (-196°C) (средняя скорость замораживания составляла около 200°C/мин) и после окончания кристаллизации отогревали на водяной бане до 37°C при перемешивании.

Спектры поглощения белков микросомальных мембран в области 200–400 нм регистрировали на спектрофотометре Hitachi U-3210 (Япония). Спектральные измерения выполнялись при комнатной температуре (20°C) в стандартных кварцевых кюветках 1x1x3 см.

Спектры обрабатывали в программе Microcal Origin 6.0. Анализировали первые производные спектров поглощения (1ПСР) белков микросомальных мембран, а также их дифференциальные сольвентно-пертурбационные спектры поглощения (СПДС), полученные в присутствии органических добавок [23]. Положение спектров поглощения БММ определяли по точке обращения в ноль 1ПСР. Графики СПДС строили как зависимость от концентрации КП отношения разности в максимумах спектров поглощения (при 270 нм) “микросомы+КП” – “микросомы” (ΔA_{270}) к максимуму спектра поглощения микросом при отсутствии КП (A_{270}). Величину светорассеяния суспензией микросом определяли при отсутствии собственного поглощения белков (650 нм).

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001 г.) и согласованными с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента [11] с использованием программного пакета “Statgraph”.

Результаты и обсуждение

Спектры поглощения белков микросомальных мембран регистрируются в УФ-области, характерной для белковых хромофоров (200–350 нм), однако их анализ затруднен из-за значительного

damaging regimen, enable minimizing the effects accompanying temperature reduction [12, 22]. With this aim the samples in 3.0 ml polystyrol ampoules were immersed into liquid nitrogen (-196°C) (an average freezing rate made about 200°C/min) and after finishing crystallization they were thawed up to 37°C with mixing on water bath.

Absorption spectra of microsomal membranes within the range of 200-400 nm were recorded with Hitachi spectrophotometer (Japan).

Spectral changes were carried-out at room temperature (20°C) in 1x1x3 cm standard quartz cuvettes.

Spectra were processed with Microcal Origin 6.0 software. First derivatives of absorption spectra (1DAS) of microsomal membrane proteins were analyzed, as well as their differential solvent-perturbing absorption spectra (SPAS), obtained with the presence of organic additives [23]. Location of MMP adsorption spectra were found using zero crossing point for 1DAS. SPAS diagrams were plotted as the dependence on CPs concentration of the ratio of the differences in absorption spectra maximums (at 270 nm) “microsomes+CPs” – “microsomes” (ΔA_{270}) to the maximum of absorption spectra of microsomes with no CPs (A_{270}). The value of light dispersion by microsome suspension was found with no own absorption of proteins (650 nm).

The experiments were performed with keeping “General principles of experiments in animals”, adopted by the First National Congress on Bioethics (20.09.01, Kiev, Ukraine) and coordinated with the statements of “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

The results were statistically processed with Student’s method [11] using “Statgraph” software.

Results and discussion

Absorption spectra of microsomal membrane proteins were observed in UV-region, characteristic for protein chromophores (200-350 nm), but their analysis was complicated due to considerable effect of dispersed light, caused both by suspension of native membranes and the change in aggregate state of vesicles after freeze-thawing (Fig. 1,a). In contrast to initial CPs their derivatives contain more useful spectral information and practically free of the effect of dispersed light [8]. Therefore in our research we analyzed 1DAS, use of those significantly reduced the effect of turbidity on MMP CPs (Fig. 1, b).

Analysis of MMP 1DAS demonstrated that they had main negative maximum in the range of 285-295 nm, within which two peaks are resolved: at 286 and 292-294 nm as well as negative peaks at 278, 272, 266 nm. In some cases there is found a shoulder at

влияния рассеянного света, вызванного как суспензией нативных мембран, так и изменением агрегатного состояния везикул после замораживания-отогрева (рис. 1, а). В отличие от исходных СП их производные содержат больше полезной спектральной информации и практически свободны от влияния рассеянного света [8]. Поэтому в работе мы анализировали 1ПСП, использование которых существенно снижает эффект мутности на СП БММ (рис. 1, б).

Анализ 1ПСП БММ показал, что они имеют основной отрицательный максимум в области 285-295 нм, в котором разрешаются два пика: при 286 и 292-294 нм, а также отрицательные пики при 278, 272, 266 нм. В некоторых случаях проявляется плечо при 300-305 нм. Несмотря на то, что форма 1ПСП БММ зависит от индивидуального белкового состава препаратов, основные белковые пики (при 286 и 292-294 нм) наблюдались во всех исследованных образцах с вариациями в соотношении их интенсивностей. Таким образом, 1ПСП могут быть использованы не только для изучения влияния внешних воздействий на БММ, но и для качественной характеристики белкового состава индивидуальных препаратов микросом.

Согласно исследованиям, выполненным на модельных системах и белках [8], полоса при 292-295 нм относится преимущественно к поглощению триптофановых остатков БММ, а в полосу при 286 нм основной вклад вносит поглощение тирозинов. В полосы при 267 и 272-278 нм – фенилаланиновые и тирозиновые остатки БММ соответственно. Природа полос, наблюдаемых при 300-305 нм, окончательно не выяснена. Предполагает-

300-305 нм. In spite of the fact that MMP 1DAS shape depends on individual protein composition of preparations, main protein peaks (at 286 and 292-294 nm) were observed in all studied samples with variations in the ratio of their intensities. Thus 1DAS may be used not only for studying the effect of outer influences on MMP but also for qualitative characterization of protein composition of individual microsomal preparations.

According to the researches carried-out in model systems and proteins [8] the band at 292-295 nm refers mainly to the absorption of tryptophan residuals of MMP and in the band at 286 nm the basic contribution is paid by the absorption of tyrosines, in the bands at 267 and 272-278 nm the one is done by phenylalanine and tyrosine residuals, correspondingly. The origin of bands observed at 300-305 nm is not completely elucidated. It is supposed to be stipulated by perturbation of significantly shifted towards long wave region of the absorption band for tryptophan residuals as a result of the effect of adjacent charged groups or formation of hydrogen bond [8]. In complicated multicomponent protein-lipid systems to those microsomal membranes are referred the data of absorption band do not allow the judging on conformational state of individual proteins being in their composition.

However they enable to obtain integral characteristics of MMP state which are in a direct dependence on the parameters of lipid bilayer. By other words, on absorption spectra (or by means of their 1DAS), reflecting the MMP closest microenvironment (polarity, accessibility to solvent etc.) one can judge about the effect of studied physical and chemical factors on the state of protein-lipid membranes.

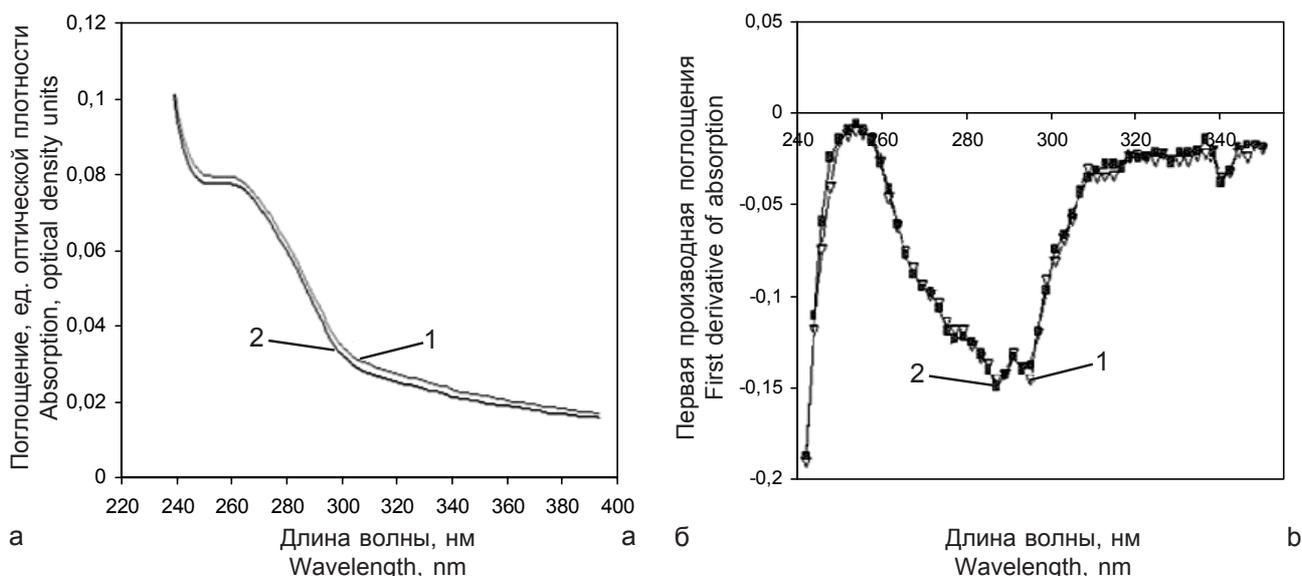


Рис. 1. Вид спектров поглощения белков микросомальных мембран из печени крысы (а) и их первых производных (б): 1 – контроль; 2 – после замораживания-отогрева.

Fig. 1. Absorption spectra of proteins of microsomal membranes derived from rat's liver (a) and those for their derivatives (b): 1 – control; 2 – post-thaw.

ся, что она обусловлена пертурбацией значительно смещенной в длинноволновую область полосы поглощения триптофановых остатков в результате влияния соседних заряженных групп или образования водородной связи [8]. В сложных многокомпонентных белок-липидных системах, к которым относятся микросомальные мембраны, данные полосы поглощения не позволяют судить о конформационном состоянии индивидуальных белков, входящих в их состав. Однако они дают возможность получить интегральную характеристику состояния БММ, которое находится в непосредственной зависимости от параметров липидного бислоя. Иными словами, по спектрам поглощения (или по их 1ПСП), отражающим состояние ближайшего микроокружения БММ (полярность, доступность растворителю и т.п.), можно судить о влиянии исследуемых физико-химических факторов на состояние белок-липидных мембран.

Несмотря на то, что параметры СП БММ обнаруживают зависимость от количественного соотношения входящих в их состав белков, в реакции БММ на внешние воздействия (в частности, действие низкой температуры и органических добавок) выявляются определенные закономерности.

В работе [12] показано, что быстрое погружение в жидкий азот и последующий отогрев не вызывают существенных нарушений гидрофобности поверхности микросом, скорости ПОЛ, уровня цитохрома Р-450 и активности НАДФН-цитохром С редуктазы. В то же время даже такой, наименее повреждающий, режим криовоздействия отражается на функциональной активности БММ и приводит к снижению способности микросомальной монооксигеназной системы окислять 4-диметиламинохалкон [17], что может быть связано с повреждением терминальных участков цепи переноса электронов или системы гидроксилирования. Учитывая, что эти изменения могут отразиться на спектральных свойствах БММ, на начальном этапе исследования нами было изучено влияние данного режима замораживания на СП БММ.

Установлено, что после замораживания на фоне некоторого изменения общей интенсивности спектра наблюдаются небольшие (около 1 нм) сдвиги как основного отрицательного максимума 1ПСП, так и отдельных полос с изменением соотношения их интенсивностей (рис. 1, б). Эти изменения, по-видимому, затрагивают в первую очередь периферические белки, поскольку большинство микросомальных белков являются периферическими и, возможно, частично сорбированными на поверхности везикул, а доля белков, глубоко погруженных в бислой, не превышает 35% от их общего количества [9]. Таким образом, сравнительная криоустойчивость микросомальных мем-

In spite of the fact that MMP AS parameters manifest the dependency on quantitative ratio of entering them proteins in MMP response to outer effects (in particular, the effect of low temperature and organic additives) there are observed certain regularities.

The paper [12] reported that a rapid plunging into liquid nitrogen and following warming did not cause drastic impairments in hydrophobicity of microsomal surface, LPO rate, level of P-450 cytochrome and activity of NADPH-cytochrome C reductase. At the same time even such less damaging cryoeffect regimen affected MMP functional activity and resulted in a reduction of the capability of microsomal monooxygenase system to oxidize 4-dimethylaminochalcon [17] that could be related to a damage in terminal sites of electron transfer chain or hydroxylation system. Taking into account that these changes may affect MMP spectral properties at initial research stage we have studied the effect of this freezing regimen on MMP AS.

It has been found that after freezing on the background of a change in total spectrum intensity there were observed slight (about 1nm) changes of both main negative maximum of 1DAS and some bands with varying the ratio of their intensities (Fig. 1, b). These changes probably may affect firstly peripheric proteins because the majority of microsomal proteins are peripheric and may be perhaps partially absorbed on vesicle surface and a share of proteins deeply submerged into a bilayer does not exceed 35% of their total number [9]. Thus comparative cryoresistance of microsomal membranes to rapid freezing in this case is an advantage of model system as it enables emphasizing the contribution of the effect of cryoprotective additives into the object under study at minimal disorders caused by freeze-thawing.

All investigated CPs render the effect on MMP AS parameters, by changing their intensity, shape and location. Dependence of intensity of 1DAS on the concentration of CPs, which correlates with that for initial CPs has an analogous character for peaks at 288 and 292-294 nm and may be estimated on the intensity of the highest peak (Fig. 2, a). The character of curves depends both on concentration and chemical properties of CPs (Fig. 2, b). In this case also there is observed a shift towards long wave area of CPs maximum location.

Freezing and following warming of microsomes with CPs presence do not change the move of dependencies of 1DAS intensities and AS location on the concentration of CPs, but they affect absolute values of these parameters. Observed reductions of intensity of MMP AS for glycerol and a rise for 1,2-PD and DMSO along with a decrease in long wave shift of spectra maximums (Fig. 2) may be the result of cryoeffect-initiated change

бран к быстрому замораживанию в этом случае является преимуществом данной модельной системы, так как позволяет выделить вклад эффекта криозащитных добавок в исследуемый объект при минимальных нарушениях, вызванных замораживанием-отогревом.

Все исследованные КП оказывают влияние на параметры СП БММ, изменяя их интенсивность, форму и положение. Зависимость интенсивности 1ПСП от концентрации КП, которая коррелирует с интенсивностью исходных СП, имеет аналогичный характер для пиков при 288 и 292–294 нм и может быть оценена по интенсивности наибольшего пика (рис. 2, а). Ход кривых 1ПСП зависит как от концентрации, так и от химических свойств КП (рис. 2, б). При этом также наблюдается сдвиг в длинноволновую область положения максимумов СП.

Замораживание и последующий отогрев микросом в присутствии КП не изменяют ход зависимостей интенсивности 1ПСП и положения СП от концентрации КП, однако оказывают влияние на абсолютные значения этих параметров. Наблюдаемые снижения интенсивности СП БММ для глицерина и повышение для 1,2-ПД и ДМСО, наряду со снижением длинноволнового сдвига максимума спектров (рис. 2), могут быть следствием инициированного криовоздействием изменения проницаемости микросомальных мембран, в результате которого изменяется доступность БММ растворителю.

Анализ формы 1ПСП БММ показал, что КП вызывают изменения соотношения интенсивностей отрицательных максимумов при 286 и 292 нм и полуширины спектров, обусловленной умень-

in permeability of microsomal membranes resulted in the alteration of MMP accessibility to solvent.

Analysis of the shape of MMP 1DAS showed that the CPs caused the changes in the ratio of intensities of negative maximums at 286 and 292 nm and halfwidth of spectra stipulated by a reduction on the contribution into absorption spectrum of protein chromophores within the range of 260–275 nm (Table). Slight changes in the shape of 1DAS are observed in DMSO presence. This enables the supposing that DMSO under concentration higher than 10% causes significant exciting effect not only on microenvironment of protein chromophores but also the state of lipid matrix of microsomal membranes. Repeated increase in 1DAS intensity observed within the area of high DMSO concentrations is probably associated exactly with destruction of bilayer and change in aggregate state of microsomes (Fig. 2, a).

Freeze-thawing of microsomes in glycerol presence results in some relaxation of spectrum halfwidth ($\Delta\lambda$ parameter) towards its increasing. At the same time in 1,2-PD and DMSO presence the effect of low temperature and accompanying factors causes following but insignificant reduction of $\Delta\lambda$ S parameter. Under conditions of additional effect of temperature factor differences in the interactions of the studied CPs with lipid bilayer stipulated by the peculiarities of their chemical structure, are supposed to be more manifested.

Deviations from linearity of SPAS plots under CPs effect reflecting the change in state of surface chromophore groups of MMP are not observed in GL presence and occur at 10 and above 30% DMSO concentrations (Fig 3, a). After freezing the

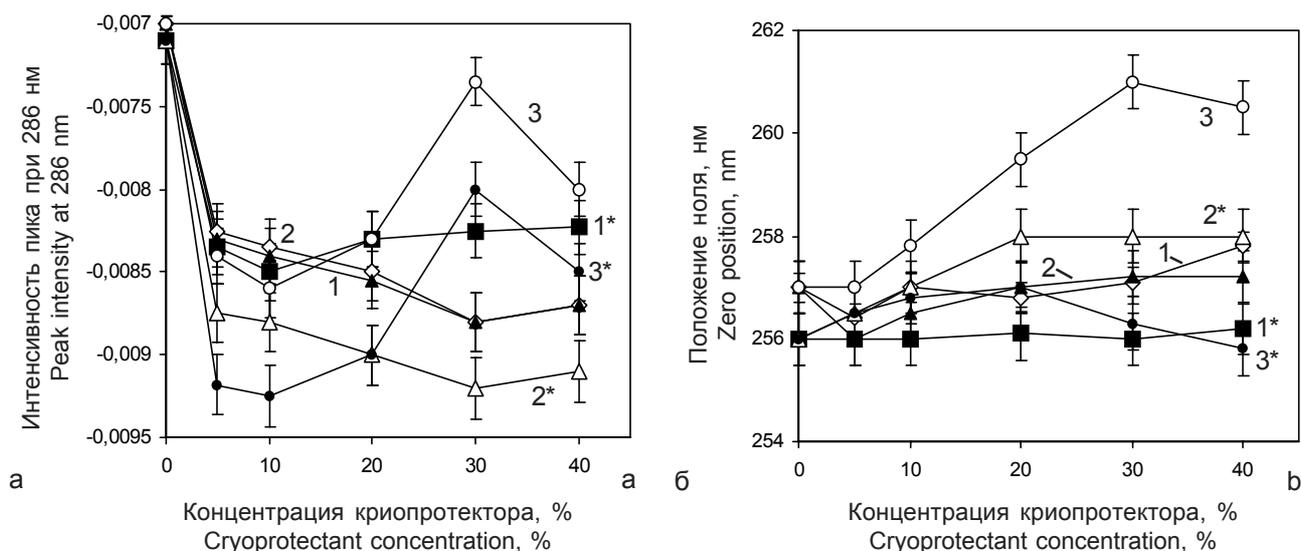


Рис. 2. Влияние криопротекторов и замораживания на интенсивность отрицательного пика при 286 нм (а) и положение ноля (б) 1ПСП БММ: 1 – глицерин; 2 – 1,2-ПД; 3 – ДМСО; * – замораживание.

Fig. 2. Effect of cryoprotectants and freezing on intensity of negative peak at 286 nm (a) and “zero” position (b) MMP 1 DAS: 1 – glycerol; 2 – 1,2-PD; 3 – DMSO; * – freezing

шением вклада в спектр поглощения белковых хромофоров в области 260–275 нм (таблица). Наибольшие изменения формы 1ПСП наблюдаются в присутствии ДМСО. Это позволяет предположить, что ДМСО в концентрации более 10 % оказывает существенное возмущающее влияние не только на микроокружение белковых хромофоров, но и на состояние липидной матрицы микросомальных мембран. Возможно, именно с разрушением бислоя и изменением агрегатного состояния микросом связано повторное увеличение интенсивности 1ПСП, наблюдаемое в области высоких концентраций ДМСО (рис. 2, а).

Замораживание-отогрев микросом в присутствии глицерина приводит к некоторой релаксации полуширины спектра (параметра $\Delta\lambda_{1/2}$) в направлении его увеличения. В то же время в присутствии 1,2-ПД и ДМСО действие низкой температуры и сопутствующих факторов вызывает дальнейшее, хотя и незначительное, снижение $\Delta\lambda_{1/2}$. Можно предположить, что в условиях дополнительного действия температурного фактора больше проявляются различия во взаимодействии исследуемых КП с липидным бислоем, обусловленные особенностями их химической структуры.

Отклонения от линейности графиков СПДС под влиянием КП, отражающие изменение состояния поверхностных хромофорных групп БММ, не наблюдаются в присутствии глицерина и происходят в присутствии 10 и более 30% ПД, а также более 10% ДМСО (рис. 3, а). После замораживания концентрационные зависимости графиков СПДС существенно не изменяются. Это говорит о том, что после криовоздействия характер влияния КП на поверхностные хромофорные группы БММ в сравнении с контролем (микросомы+КП) сохраняется. Изменение наклона графиков СПДС БММ при совместном воздействии КП и низкотемпературного фактора отражает уменьшение доступности белковых

concentration dependencies of SPAS plots do not significantly change. This means that after cryoeffect the character of CP influence on surface chromophore groups of MMP when compared with the control (microsomes + CP) is kept. Alteration of slope for MMP SPAS plots at joint effect of CP and low temperature factor reflects the reduction of accessibility of protein chromophores to solvent, caused by

Влияние криопротекторов и замораживания-отогрева на полуширину и отношение минимумов 1ПСП БММ при 286 и 292 нм
Effect of cryoprotectants and freeze-thawing on half-width and ratio of minimums of MMP 1DAS at 286 and 292 nm

Концентрация криопротектора Cryoprotectant concentration	Характеристика 1-й производной спектра поглощения Characteristics of 1st derivative of absorption spectra			
	$\Delta\lambda_{1/2}$, нм $\Delta\lambda_{1/2}$, nm	A_{286}/A_{292}	$\Delta\lambda_{1/2}$, нм $\Delta\lambda_{1/2}$, nm	A_{286}/A_{292}
	Инкубация 10 мин при 20°C Incubation during 10 min at 20°C		После замораживания – отогрева After freeze – thawing	
Контроль Control	36±0,5	1,0±0,02	36±0,5	1,1±0,03
Глицерин Glycerol				
5 %	34±0,5	1,1±0,03	35±0,5	1,1±0,03
10 %	33±1,0	1,1±0,04	35±0,5	1,0±0,06
20 %	34±0,5	1,1±0,03	35±0,5	1,1±0,04
30 %	33±1,0	1,1±0,01	35±0,5	1,1±0,05
40 %	34±0,5	1,1±0,01	33±0,5	1,1±0,01
1,2-ПД 1,2-PD				
5 %	36±0,5	1,1±0,02	35±0,5	1,1±0,03
10 %	35±0,5	1,1±0,02	33±0,5	1,2±0,03
20 %	34±0,5	1,1±0,03	33±0,5	1,2±0,03
30 %	32±1,0	1,1±0,01	32±1,0	1,0±0,02
40 %	32±1,0	1,1±0,01	33±0,5	1,0±0,04
ДМСО DMSO				
5 %	33±0,5	1,2±0,02	33±0,5	1,2±0,02
10 %	33±0,5	1,2±0,02	32±0,5	1,1±0,01
20 %	32±1,0	1,1±0,03	32±0,5	1,0±0,02
30 %	27±1,0	1,1±0,04	27±1,0	1,0±0,01
40 %	26±1,0	1,1±0,02	26±1,0	1,0±0,04

Примечания: $\Delta\lambda_{1/2}$ – полуширина спектра, соответствующая его ширине (нм), измеренной на половине высоты; A_{286}/A_{292} – отношение интенсивностей минимумов 1ПСП при 286 и 292 нм.

Notes: $\Delta\lambda_{1/2}$ – half-width of spectrum corresponding to its width (nm) measured at the middle of height; A_{286}/A_{292} – ratio of intensities of minimums for 1DAS at 286 and 292 nm.

хромофоров растворителю, вызванное нарушением структуры бислоя либо изменением агрегатного состояния везикул.

Величина светорассеяния суспензии микросом позволяет судить об изменении размеров микросомальных везикул либо степени их агрегации [4], что в конечном итоге косвенно отражает нарушение нативной упаковки бислоя. Оценка уровня светорассеяния суспензии микросом в области, где отсутствует собственное поглощение БММ (650 нм), показала, что исследованные КП отличаются по направленности своего влияния на микросомальные мембраны, и что эти зависимости носят нелинейный характер (рис. 3, б). Так, низкомолекулярные полиолы глицерин и 1,2-ПД снижают параметр A_{650} по сравнению с контролем, а представитель сульфоксидов ДМСО вызывает рост светорассеяния суспензии в области концентраций до 10% с последующим резким снижением. При этом глицерин оказывает наименьшее влияние на светорассеяние суспензии, которое выражается лишь в незначительном росте в области концентраций 10-40%. 1,2-ПД приводит к увеличению параметра A_{650} в области 10% с последующим снижением и повторным ростом при концентрациях более 30%. Подобные нелинейные изменения параметра A_{650} свидетельствуют о том, что КП оказывают влияние на агрегатное состояние везикул уже при комнатной температуре и оно наиболее выражено в присутствии 1,2-ПД и ДМСО. Воздействие низкой температуры достоверно не оказывает дополнительного возмущающего влияния на агрегатное состояние микросом до 20%-й концентрации глицерина и 1,2-ПД и при содержании ДМСО 5-

disorder in bilayer structure or the change in aggregate state of vesicles.

Value of light dispersion of microsome suspension enables the judging about the change in sizes of microsomal vesicles or the rate of their aggregation [4], that finally represents indirectly the impairment of bilayer native packing. The assessment of light dispersion level for the suspension of microsomes in the region where own MMP absorption is absent (650 nm), has shown that the studied CPs differed on orientation of their effect on microsomal membranes and these dependencies were of non-linear character (Fig. 3, b). So, low-molecular polyols, glycerol and 1,2-PD decrease A_{650} parameter when compared with the control and DMSO causes the rise in light dispersion of suspension in the area of concentrations up to 10% with following sharp fall. In this case glycerol causes the least effect on light dispersion of suspension, which is expressed just in a slight growth of concentrations (10-40%). 1,2-PD results in a rise of A_{650} parameter in the area of 10% with following decrease and repeated growth at concentrations higher that 30%. Similar non-linear changes of A_{650} parameter testify to the fact that CPs render the effect on an aggregate state of vesicles even at room temperature and it is more vividly manifested in 1,2-PD and DMSO presence. Low temperatures had no statistical and significant additional exciting effect on aggregate state of microsomes at 20% concentration of glycerol and 1,2-PD and at 5-10% DMSO that is within the concentration areas where these CPs usually demonstrate cryoprotective effect. Under higher CP concentrations the effect of low temperature factor strengthens their perturbing influence on bilayer.

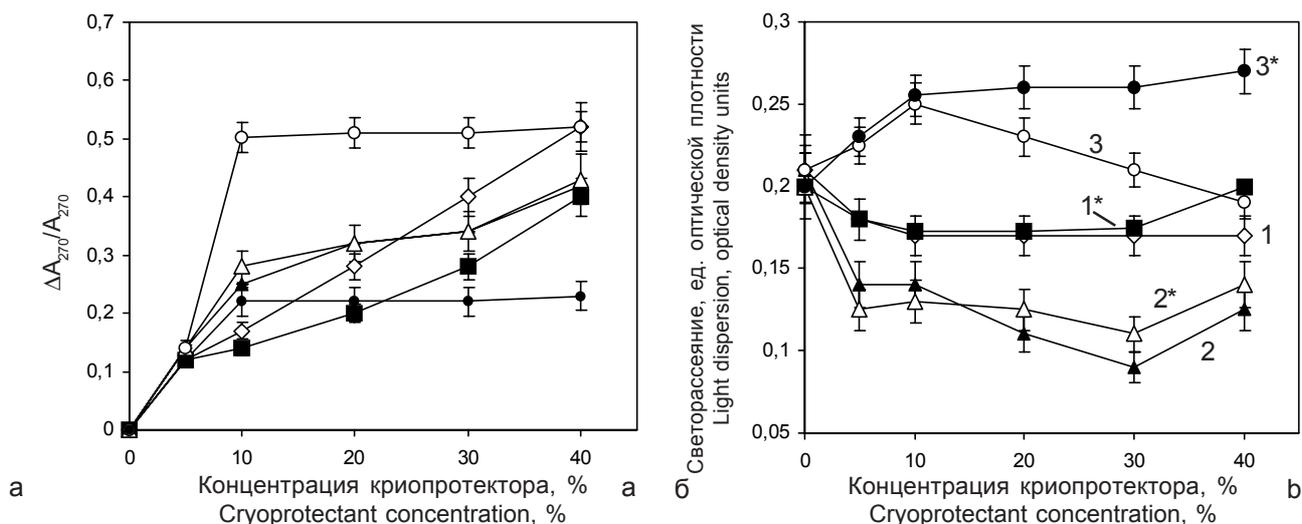


Рис. 3. Влияние КП и замораживания на СПДС БММ (а) и светорассеяние суспензии микросом (б): 1 – глицерин; 2 – 1,2-ПД; 3 – ДМСО; * – замораживание.

Fig. 3. Effect of CPs and freezing on MMP SPAS (a) and light dispersion of microsome suspension (b): 1 – glycerol; 2 – 1,2-PD; 3 – DMSO; * – freezing

10%, то есть в областях концентраций, где эти КП обычно проявляют криозащитный эффект. При более высоких концентрациях КП действие низкотемпературного фактора усиливает их пертурбирующее влияние на бислой.

Известно, что пертурбация спектров поглощения органическими веществами обусловлена изменением состояния хромофорных групп в белках [8]. При этом рост интенсивности и длинноволновый спектральный сдвиг характерны для спектров флуоресценции белковых хромофоров в присутствии органических растворителей, способных образовывать водородные связи. Близкие по химическому строению низкомолекулярные полиолы глицерин и ПД содержат ОН-группы, позволяющие им образовывать водородные связи с молекулами воды [6]. Считается, что механизм криозащитного действия этих веществ имеет преимущественно коллигативную основу, обусловленную их гидрофильностью. В то же время полифункциональное строение молекулы ДМСО, содержащей полярную группу =S=O и две гидрофобные CH_3 -группы, позволяет ему проявлять гидрофобные свойства и образовывать сильные межмолекулярные Н-связи [19]. Это значит, что наблюдаемые в его присутствии увеличение интенсивности и длинноволновый сдвиг спектров поглощения могут быть, по крайней мере частично, обусловлены образованием водородных связей между молекулами криопротектора и поверхностными аминокислотными остатками периферических белков, а также полярными группами фосфолипидов микросом. Изменения параметров спектров поглощения при больших концентрациях КП, по-видимому, отражают процессы, связанные с проникновением крио-защитных веществ вглубь интерьера микросомальных белков и с их влиянием на параметры липидного бислоя. Полученные результаты свидетельствуют, что 1,2-ПД так же, как и ДМСО, проявляет мембранотропную эффективность, что может быть связано с большей гидрофобностью его молекулы в сравнении с глицерином [14, 20]. Согласно данным [20], исследуемые КП существенно отличаются по своей липофильности, отражающей их сродство к липидному бислою (коэффициенты распределения в системе хлороформ-вода составляют 0,00001; 0,002 и 0,05 для глицерина, 1,2-ПД и ДМСО соответственно). Эти результаты позволяют предположить, что исследуемые КП могут также опосредованно влиять на конформационное состояние БММ вследствие проникновения в бислой по механизму пассивной диффузии. Во время замораживания и последующего отогрева дополнительному проникновению КП внутрь микросомальных мембран могут способствовать факторы, вызывающие нарушение проницаемости мембран,

It is known that perturbation of absorption spectra with organic substances is stipulated with the change in state of chromophore groups in proteins [8]. In this case the growth of intensities and long wave spectral shift are characteristic for fluorescence spectra of protein chromophores in presence of organic solvents capable of forming hydrogen bonds. Similar on chemical structure low molecular polyols, glycerol and 1,2-PD contain OH-groups enabling them to form hydrogen bonds with water molecules [6]. The mechanism of cryoprotective effect of these substances is considered to have predominantly colligative base, stipulated by their hydrophilicity. At the same time polyfunctional structure of DMSO molecule, possessing =S=O polar group and two hydrophobic CH_3 -groups, allowing it manifesting hydrophobic properties and forming strong intermolecular H-bonds [19]. It means that observed in its presence increase of intensities and long-wave shift of absorption spectra may be at least partially stipulated by the formation of hydrogen bonds between cryoprotectant molecules and surface amino acid rests of peripheric proteins as well as polar groups of microsome phospholipids. Changes in parameters of absorption spectra at higher concentrations of CP perhaps reflect the processes related to penetration of cryoprotective substances inside an interior of microsomal proteins and to their effect on parameters of lipid bilayer. Obtained results testify that 1,2-PD as well as DMSO manifest membrane tropic efficiency that may be related to higher hydrophobicity of its molecule in comparison with glycerol [14, 20]. According to the data [20] the studied CPs differ considerably on their lipophilicity, reflecting their affinity to lipid bilayer (distribution coefficients in "chloroform-water" system makes 0.00001; 0.002 and 0.05 for glycerol, 1,2-PD and DMSO, correspondingly).

These results enable the supposing that the CPs under study may indirectly affect conformational state of MMP due to penetration into bilayer via passive diffusion. During freezing and following thawing the factors causing the disorder of membrane permeability and formation of defective sites on the boundaries between liquid crystal and solid phases of bilayer (lateral separation of lipids in bilayer plane and aggregation of membrane proteins) may contribute to additional penetration of CPs inside microsomal membranes.

Thus the efficiency of CPs interaction with microsomal proteins and bilayer in a whole in freeze-thawing cycle is greatly determined by their sensibilization at equilibration stage with CPs. This relationship depends both on concentration of CPs and their individual physical and chemical properties. Effect of low temperature and accompanying factors on MMP and mirosomal membranes are in a direct

и образование дефектных участков на границах между жидкокристаллической и твердой фазами бислоя (латеральное разделение липидов в плоскости бислоя и агрегация мембранных белков).

Таким образом, эффективность взаимодействия КП с микросомальными белками и бислоем в целом в цикле замораживания-отогрева в значительной степени определяется их сенсбилизацией на этапе эквипирации с КП. Это взаимодействие зависит как от концентрации КП, так и от их индивидуальных физико-химических свойств. Влияние низкой температуры и сопутствующих факторов на БММ и микросомальные мембраны находится в прямой зависимости от мембрано-тропных свойств КП и действует по отношению к ним аддитивно.

При проведении дальнейших исследований представляет интерес выяснить, как влияют исследуемые низкомолекулярные КП и замораживание на люминесцентные свойства белков микросом.

Выводы

1. Низкомолекулярные криопротекторы глицерин, 1,2-ПД и ДМСО взаимодействуют с микросомальными белками уже на этапе эквипирации при комнатной температуре, вызывая их конформационные изменения. Эффективность этого взаимодействия определяется как концентрацией криопротекторов, так и их индивидуальными физико-химическими свойствами.

По возрастанию пертурбирующего влияния на состояние БММ исследованные КП можно расположить в ряд: глицерин < 1,2-ПД < ДМСО.

2. Эффективность взаимодействия КП с белками микросом во время замораживания-отогрева определяется предварительной сенсбилизацией мембран на этапе их эквипирации с КП. Влияние замораживания-отогрева на БММ и микросомальные мембраны зависит от мембрано-тропных свойств КП и действует по отношению к ним аддитивно.

Литература

1. Аксенов С.И., Гаврилова И.И., Гангард М.Г., Ревокатов О.П. Исследование взаимодействия диметилсульфоксида с макромолекулами белков методом спинного эха ЯМР // Криобиология.– 1985.– №4.– С. 31-33.
2. Арчаков А.И. Оксигеназы биологических мембран.– М.: Наука, 1983.– 56 с.
3. Бабичук Л.А., Землянских Н.Г. Влияние полиэтиленоксида–1500 и температуры на особенности модификации мембран эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1996.– №4.– С. 32-38.
4. Безрукова А.Г., Розенберг О.А. Определение параметров липосом методом спектра мутности // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1981.– №4.– С. 506–508.

dependence on CPs' membranotropic properties and supplements them.

Further experiments will be interesting for elucidating the effect of low molecular CPs and freezing on luminescent properties of microsome proteins.

Conclusions

1. Low molecular cryoprotectants glycerol, 1,2-PD and DMSO interact with microsomal proteins even at the equilibration stage at room temperature resulting in conformational changes. The efficiency of this interaction is determined both by the concentration of cryoprotectants and their individual physical and chemical properties.

Examined CPs on ascending of perturbing effect on MMP state could be disposed in the row: glycerol < 1,2-PD < DMSO.

2. Efficiency of CPs interaction with microsomal proteins during freeze-thawing is determined by preliminary sensabilization of membranes at the stage of their equilibration with CPs. The effect of freeze-thawing on MMP and microsomal membranes depends on membranotropic properties of CPs and supplements them.

References

1. Aksekov S.I., Gavrilova I.I., Gangard M.G., Revokatov O.P. Investigation of the interaction between dimethylsulfoxide and protein macromolecules using a method of NMR spin echo // Kriobiologiya.– 1985.– N4.– P. 31-33.
2. Archakov A.I. Oxygenases of biological membranes.– Moscow: Nauka, 1983.– 56 p.
3. Babichuk L.A., Zemlyanskikh N.G. Effect of polyethylene oxide-1500 and temperature on peculiarities of erythrocyte membrane modification // Problems of Cryobiology.– 1996.– N4.– P. 32-38.
4. Bezrukova A.G., Rozenberg O.A. Determination of liposome parameters by the method of spectrum turbidity // Bull. experiment. biol. and med.– 1981.– N4.– P.506-508.
5. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes of biological membranes during cooling.– Kiev: Naukova dumka, 1982.– 255 p.
6. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 431 p.
7. Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Barrier properties of biomembranes under low temperatures.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 208 p.
8. Demchenko A.P. Ultraviolet spectrophotometry and structure of proteins.– Kiev: Naukova dumka, 1981.– 208 p.
9. Dobretsov G.E., Spirin M.M., Karyakin A.V. et al. Study using inductive-resonance energy transfer of spatial interaction between proteins and lipids in membranes of liver microsomes // Biokhimiya.– 1981, Vol.1, Issue 3.– P. 504-510.
10. Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Stepuro I.I. Thermostability of erythrocyte membranes in ethanol presence // Biophysics.– 1994.– Vol.39, Issue 3.– P. 470-474.
11. Lakin G.F. Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1990.– 352 p.
12. Lemeshko V.V., Kudokotseva E.V., Belous A.M. Cryoresistance of membranes of endoplasmic reticulum of rat's liver // Biokhimiya.– 1978.– Vol. 43, Issue 1.– P. 72-77.

5. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
6. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 431 с.
7. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук. думка, 1988.– 208 с.
8. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков.– Киев: Наук. думка, 1981.– 208 с.
9. Добрецов Г.Е., Спирин М.М., Карякин А.В. и др. Исследование с помощью индуктивно-резонансного переноса энергии пространственных взаимоотношений между белками и липидами в мембранах микросом печени // Биохимия.– 1981.– Т. 46, Вып. 3.– С. 504-510.
10. Заводник И.Б., Лалшина Е.А., Стелуро И.И. Термостабильность эритроцитарных мембран в присутствии этанола // Биофизика.– 1994.– Т. 39, Вып. 3.– С. 470-474.
11. Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высш. школа, 1990.– 352 с.
12. Лемешко В.В., Кудокоцева Е.В., Белоус А.М. Криорезистентность мембран эндоплазматического ретикулума печени крыс // Биохимия.– 1978.– Т. 43, Вып. 1.– С. 72-77.
13. Леонов Б.Н. Влияние замораживания и полиэтиленгликоля молекулярной массы 600 на структуру бычьего сывороточного альбумина // Пробл. кробиологии.– 1993.– №1.– С. 27–32.
14. Ліннік Т.П. Фізико-хімічні фактори кріопшкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного кріоконсервування: Автореф. дис. ... докт. біол. наук.– Харків, 2003.– 36 с.
15. Лозина-Лозинский Л.К., Успенская З.И. Системное направление в кробиологии // Кробиология.– 1985.– № 1.– С. 13-19.
16. Луговой В.И., Моисеев В.А. Влияние низких температур на растворимые ферменты // Итоги науки и техники ВИНТИ. Серия: Биофизика.– 1979.– Вып. 9.– С. 53-79.
17. Makevina M.G., Kudoctseva E.V., Dobretsov G.E., Belous A.M. Влияние низких температур на функциональное состояние мембран эндоплазматического ретикулума печени // Вопросы мед. химии.– 1978.– Т. 24, №5.– С. 605-607.
18. Моисеев В.А. Молекулярные механизмы криозащиты биологических систем // II Всесоюз. конф. "Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов": Тез. докл. Т. 1.– Харьков, 1984.– С. 58.
19. Петропавлов Н.Н. Криопротектор диметилсульфоксид // Консервация генетических ресурсов: Материалы XV раб. совещания.– Пущино, 1998.– С. 116-117.
20. Пичугин Ю.И., Новиков А.Н., Олейник С.Т. Лиотропный ряд криопротекторов // Кробиология.– 1984.– №7.– С.12-13.
21. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
22. Duppel W., Dahi G. Effect of phase transition on the distribution of membrane-associated particles in microsomes // Biochim. Biophys. Acta.– 1976.– Vol. 426, N 3.– P. 408-417.
23. Herskovits T. T., Sorensen Sr. M. Studies of the location of tyrosyl and tryptophyl residues in proteins. 1. Solvent perturbation data of model compounds // Biochemistry.– 1968.– Vol. 7, N 7.– P. 2523-2533.
24. Levitt J.A. A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance of plants // J. Theor. Biol.– 1982.– Vol. 3, N2.– P. 355–391.
25. Lovelock J.E. Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing // Proc. Roy. Soc. (Biol.).– 1957.– Vol. 147.– P. 427-433.
26. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– Vol. 193, N 1.– P. 265–275.
27. Leonov B.N. Effect of freezing and polyethylene glycol of molecular mass 600 on structure of bovine serum albumin // Problems of Cryobiology.– 1993.– N1.– P. 27-32.
28. Linnik T.P. Physical and chemical factors of cryodamage and cryoprotection of spermatozoa of fowls in cycle of low temperature preservation: Author's thesis....of doctor of biol. sciences.– Kharkiv, 2003.– 36p.
29. Lozina-Lozinsky L.K., Uspeskaya Z.I. System direction in cryobiology // Kriobiologiya.– 1985.– N1.– P. 13-19.
30. Lugovoy V.I., Moiseev V.A. Effect of low temperatures on soluble enzymes // Itogi Nauki i Tekhniki VINITI. Series: Biophysics.– 1979, Issue 9.– P. 53-59.
31. Makevina M.G., Kudoctseva E.V., Dobretsov G.E., Belous A.M. Effect of low temperatures on functional state of membranes of liver emndoplasmatic reticulum // Voprosy Med. Khimii.– 1978.– Vol.24, N5.– P. 605-607.
32. Moiseyev V.A. Molecular mechanisms of cryoprotection of biological systems // IInd All-Union Conference "Mechanisms of cryodamage and cryoprotection of biological objects": Proc. of Rep.– Kharkov, 1984.– Vol.1.– P. 58.
33. Petropavlov N.N. Dimethyl sulfoxide cryoprotectant // "Conservation of genetic resources": Proc. of XV Working Meeting.– Puschino, 1998.– P. 116-117.
34. Pichugin Yu.I., Novikov A.N., Olejnik S.T. Lyotropic row of cryoprotectants // Kriobiologiya.– 1984.– N7.– P. 12-13.
35. Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V. Cryoprotectants.– Kiev: Naukova dumka, 1978.– 204 p.
36. Duppel W., Dahi G. Effect of phase transition on the distribution of membrane-associated particles in microsomes // Biochim. Biophys. Acta.– 1976.– Vol. 426, N 3.– P. 408-417.
37. Herskovits T. T., Sorensen Sr. M. Studies of the location of tyrosyl and tryptophyl residues in proteins. 1. Solvent perturbation data of model compounds // Biochemistry.– 1968.– Vol. 7, N 7.– P. 2523-2533.
38. Levitt J.A. A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance of plants // J. Theor. Biol.– 1982.– Vol. 3, N2.– P. 355–391.
39. Lovelock J.E. Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing // Proc. Roy. Soc. (Biol.).– 1957.– Vol. 147.– P. 427-433.
40. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– Vol. 193, N 1.– P. 265-275.

Accepted in 14.09.2004

Поступила 14.09.2004