

## Действие многоатомных спиртов, амидов и ДМСО на сохранность меристем винограда и картофеля

Н.А.ШЕВЧЕНКО, Т.Ф.СТРИБУЛЬ, Л.Ф.РОЗАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Multiatom Alcohols, Amides and DMSO on Grape and Potato Meristems Integrity

N.A. SHEVCHENKO, T.F. STRYBUL, L.F. ROZANOV

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

Рассматривается токсическое действие глицерина, ДМСО и веществ рядов амидов и диолов в различных концентрациях на меристемы картофеля и винограда. Показано, что токсичность данных веществ в исследованных концентрациях не обуславливается осмотическим фактором и усиливается с увеличением гидрофобности.

**Ключевые слова:** меристема, амиды, диолы, токсичность.

Розглядається токсична дія гліцерину, ДМСО і речовин рядів амідів та діолів у різних концентраціях на меристеми картоплі та винограду. Показано, що токсичність даних речовин у досліджених концентраціях не обумовлюється осмотичним фактором і підсилюється зі збільшенням гідрофобності.

**Ключові слова:** меристема, амід, діол, токсичність.

The authors investigated a toxic effect of glycerol, DMSO and substances of amide and diol series under various concentrations on potato and grape meristems. It is shown that the toxicity of the mentioned above substances under investigated concentrations is not stipulated by an osmotic factor and is intensified with increase of their hydrophobic properties.

**Key-words:** meristems, amides, diols, toxicity.

Интерес к меристемальной ткани как объекту криобиологических исследований обусловлен тем, что криоконсервирование меристем может стать основой новых биотехнологий, направленных на разведение ценных видов растений, сохранение растительного генофонда и проведение селекционных мероприятий [4].

Традиционные для криобиологии методические подходы должны применяться к меристемам с учетом особенностей строения растительных объектов, в частности, наличия клеточной стенки и степени контакта с ней плазматической мембраны. Вместе с тем эти подходы остаются теми же, что и для традиционных криобиологических объектов: предотвращение внутриклеточной кристаллизации и чрезмерной дегидратации клеток [8, 12].

Защиту от действия основных факторов криоповреждения могут обеспечить криопротекторы, к важнейшим свойствам которых относят их осмотическую активность, скорость и пути проникновения в клетки, способность связывать воду и степень токсичности [3].

По способности проникать в растительные клетки криопротекторы можно разделить на 3 группы [14]:

проникающие как через клеточную стенку, так и через плазмалемму (этиленгликоль, диолы, амиды, диметилсульфоксид и глицерин – вещества

An interest towards a meristematic tissue as an object of cryobiological investigations is determined by the fact that the cryopreservation of meristems may become the base of new biotechnologies, directed to the valuable breeding of plant species, plant gene fond preservation and selection measures performance [4].

Traditional for cryobiology methodological approaches are to be realised, paying attention to the peculiarities of plant objects' structure, in particular, the presence of cellular wall and the extent of contact between that and plasmatic membrane. At the same time, these approaches are just the same as for traditional cryobiological objects: the prevention of intracellular crystallisation and excessive cell dehydration [8, 12].

The protection effect of main cryodamage factors can be provided with the cryoprotectants, which main peculiarities are related to their osmotic activity, the rate and the penetration ways into cells, the ability to bind water and toxicity degree [3].

According to capability to penetrate into plant cells, the cryoprotectants can be divided into 3 groups [14]:

penetrating both through a cellular wall and the plasmolemma ( ethyleneglycol, diols, amides, dimethyl sulfoxide and glycerol: substances with various penetration rate through a plasmatic membrane);

penetrating only via the cellular wall, but non-penetrating through plasmolemma (oligosaccharides, amino acids, low-molecular polymers);

**Адрес для корреспонденции:** Шевченко Н.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 777-42-84, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Shevchenko N.A., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 777 4284, fax: +38 (057) 7720084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

с различной скоростью проникновения через плазматические мембраны);

проникающие через клеточную стенку, но не проникающие через плазмалемму (олигосахариды, аминокислоты, низкомолекулярные полимеры);

непроникающие через клеточную стенку (высокомолекулярные полимеры и полисахариды).

Криопротекторы первой группы, обладающие высокой осмотической активностью, медленно проникающие через плазмалемму в высоких молярных концентрациях, могут стать причиной гибели клеток в результате гипертонического стресса [6,11], не исключено и их прямое токсическое действие на клетки [7].

В связи с вышесказанным на стадии предварительного отбора криопротекторов целесообразно проводить оценку их цитотоксического действия, которое может включать в себя как осмотические, так и прямые токсические эффекты.

Целью настоящей работы была оценка цитотоксичности криопротекторов, входящих в три класса химических соединений (амиды, многоатомные спирты и оксиды), на меристемы картофеля и винограда.

### Материалы и методы

В работе оценена перспектива применения в роли криопротекторов для меристемальных тканей веществ из классов: амидов – 4, диолов – 8, трехатомных спиртов – 1 (глицерин), оксидов – 1 (ДМСО). Диметилсульфоксид выбран как криопротектор, успешно использовавшийся при криоконсервировании меристем [9,13,16].

Меристемы винограда (*Vitis vinifera* L) сорта Изабелла получали из зимующих черенков. Для этого в фитотроне при температуре 22°C и фотопериоде 16 ч (день)/8 ч (ночь) выращивали побеги до длины 4–6 междоузлий. После удаления листьев пазушные меристемы винограда использовали в дальнейшей работе.

Меристемы картофеля (*Solanum tuberosum*) получали прорастиванием клубней при 22°C, из побегов выделяли пазушные меристемы (апексы), на 2 ч погружали в 2 мл 0,5; 1 или 1,5 М раствора криозащитного вещества, приготовленного на 0,9%-м NaCl. После экспозиции в растворе криопротектора меристемы в течение 2-х часов выдерживали в 4 мл физиологического раствора и переносили в чашки Петри (диаметр 4 см) на фильтровальную бумагу, смоченную 1мл физ-раствора. Через 24 ч определяли процент количества сохранных меристем [10].

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные о сохранности меристем картофеля после 2-часовой инкубации

non-penetrating through cellular wall (high molecular polymers and polysaccharides).

The cryoprotectants of the first group, with a high osmotic activity, slowly penetrating through the plasmolemma under high molar concentrations, can cause a cell death as a result of hypertonic stress [6,11], their direct toxic effect on the cells is not excluded as well [7].

Proceeding from the mentioned above, at the stage of preliminary cryoprotectants selection it is advisable to conduct the estimation of their cytotoxicity effect, which may include both an osmotic and direct toxic effects.

The aim of the work was the estimation of the cytotoxicity effect for cryoprotectants of three classes of chemical compounds (amides, multiatom alcohols and oxides), on potato and grape meristems.

### Materials and methods

In the work there was estimated the perspective of usage as cryoprotectants for meristematic tissues of the substances from the classes of: amides – 4, diols – 8, threeatom alcohols (glycerol) – 1, oxides (DMSO) – 1. Dimethyl sulfoxide was chosen as a cryoprotectant, successfully used for meristem cryopreservation [9,13,15].

Isabella grape (*Vitis vinifera* L) meristems were obtained from hibernating (over-wintering) grafts. With this aim the phytotrone at 22°C and photoperiod of 16 hrs (day) / 8 hrs (night) there were grown the shoots to the length of 4-6 internodes. After leaves removing the grapes sinus meristems were used for the further work. Potato (*Solanum tuberosum*) meristems were obtained by tubers shooting at 22°C, from the grafts there were isolated sinus meristems (apexes), within the period of 2 hrs they were immersed into 2 ml 0.5; 1 or 1.5 M solution of the substance, prepared with 0.9% NaCl. After the exposure in cryoprotectant solution, the meristems during 2 hrs were maintained in 4 ml of physiological solution and were removed into Petri dishes (4cm diameter) on the filter paper, moistened with 1ml of physiological solution. After 24 hrs there was determined the percentage of integral meristems [10].

### Results and discussion

Table 1 presents the data about the integrity of potato meristems after 2 hrs' incubation at 21±2°C in amides, diols, glycerol and DMSO solutions. Proceeding from the presented results, toxic effect of amides is more clearly expressed, than one of diols. In amides series only dimethylformamide (DMFA) and dimethylacetamide (DMAC) in 0.5M concentration damaged less than 30% of meristems. Amide solutions of 1M concentration damaged more than 60 % of meristems, and the incubation in 1.5 M solutions

**Таблица 1.** Сохранность меристем картофеля под действием различных концентраций криопротекторов  
**Table 1.** Potato meristems integrity under various cryoprotectants concentrations effect

| Криопротектор<br>Cryoprotectant       | Структурная формула<br>Structural formula   | Коэффициент<br>Coefficient               |   | Концентрация криопротектора, М<br>Cryoprotectant concentration, M |          |           |
|---------------------------------------|---|--|---|---|----------|-----------|
|                                       |   | распределения [1]<br>of distribution [1] | проницаемости для эритроцитов [1]<br>of permeability for erythrocytes [1] | 0,5   | 1        | 1,5       |
| Формамид<br>Formamide                 | $\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$  | 0,049                                    | —   | 16,0±5,0  | 0        | 0         |
| Ацетамид<br>Acetamide                 | $\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$   | 0,062                                    | 2,66  | 41,3±30,6   | 35,0±5,0 | 0         |
| Диметилформамид<br>Dimethyl formamide | $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ // \quad / \\ \text{H}-\text{C}-\text{N} \\ \quad \quad \backslash \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$    | 0,233                                    | 2,96  | 73,7±5,3  | 34,9±3,9 | 0         |
| Диметилацетамид<br>Dimethyl acetamide | $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ // \quad / \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{N} \\ \quad \quad \backslash \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | 0,291                                    | 2,86  | 90,5±3,2  | 23,2±8,4 | 0         |
| Этиленгликоль<br>Ethylene glycol      | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$  | 0,040                                    | 1,98  | 100   | 100      | 100       |
| Метилцеллозольв<br>Methyl cellosolve  | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$   | 0,121                                    | —   | 90,3±3,6  | 85,6±6,4 | 29,3±0,4  |
| 1,3-пропандиол<br>1,3-propane diol    | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$                                      | 0,064                                    | 0,897   | 100   | 93,5±3,1 | 91,7±2,9  |
| 1,2-пропандиол<br>1,2-propane diol    | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$  | 0,076                                    | 1,6   | 93,3±3,2  | 88,3±4,4 | 76,6±9,1  |
| 1,4-бутандиол<br>1,4-buthane diol     | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$              | 0,137                                    | 0,979   | 90,3±5,2  | 90,0±5,4 | 46,1±17,2 |
| 1,3-бутандиол<br>1,3-buthane diol     | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$                            | 0,227                                    | 2,64  | 83,3±4,6  | 68,8±5,3 | 68,0±6,1  |
| 2,3-бутандиол<br>2,3-buthane diol     | $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$  | 0,308                                    | 2,89  | 57,8±4,3  | 51,4±1,7 | 34,6±4,8  |
| 1,2-бутандиол<br>1,2-buthane diol     | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$  | 0,005                                    | 0,038   | 100   | 100      | 100       |
| Глицерин<br>Glycerol                  | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$                            | 0,005                                    | 0,038   | 100   | 100      | 100       |
| DMCO<br>DMSO                          | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{O} = \text{S} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$  | 0,247                                    | —   | 100   | 100      | 95,0±6,2  |

при температуре 21±2°C в растворах амидов, диолов, глицерина и ДМСО. Из приведенных результатов следует, что токсический эффект амидов более выражен, чем диолов. В ряду амидов только диметилформамид (ДМФА) и диметилацетамид (ДМАЦ) в концентрации 0,5 М повреждали менее 30% меристем. Растворы амидов с концентрацией 1 М повреждали более 60% меристем, а инкубация в 1,5 М растворах

resulted in a complete loss of the apexes integrity. The highest cytotoxicity was shown by formamide, damaged more than 80% of meristems even under 0.5M concentration.

In contrast to amides all the investigated substances of diols series under the concentration of 0.5M showed slightly manifested toxic effect or its complete absence. In 1M diol solutions there were preserved more than 80% of meristems. The exception was 1,2-buthane

приводила к полной потере сохранности апексов. Наибольшую цитотоксичность проявлял формамид, повреждавший более 80% меристем даже в 0,5 М концентрации.

В отличие от амидов все изученные вещества ряда диолов в концентрации 0,5 М оказывали слабовыраженное токсическое действие или демонстрировали полное его отсутствие. В 1 М растворах диолов сохранялось более 80% меристем. Исключением был 1,2-бутандиол (1,2-БД), повреждающий до 50% апексов. Большинство диолов в 1,5 М концентрации начинали проявлять свое повреждающее действие. Особенно токсичными оказались метилцеллозольв (МЦ) и 1,2-БД, инкубация в их растворах приводила к потере более 70% меристем. Около 50% меристем сохранились после действия 1,4- и 1,3-БД, а 2,3-БД и 1,2-ПД оказывали более выраженный повреждающий эффект, чем 1,3-ПД. Этиленгликоль в данной концентрации нетоксичен.

По выраженности токсического действия на меристемы картофеля амиды составляют ряд: ДМФА≈ДМАЦ<АА<ФА.

Ряд диолов в порядке возрастания токсичности имеет вид: ЭГ<1,3-ПД<1,2-ПД<2,3-БД<1,3-БД≈1,4-БД<МЦ<1,2-БД.

Глицерин токсического действия на меристемы картофеля в использованных концентрациях не оказывает, а ДМСО проявляет слабовыраженный токсический эффект только в концентрации 1,5 М.

В табл. 2 приведены данные о влиянии амидов, диолов, глицерина и ДМСО на сохранность меристем винограда. Результаты исследований показывают, что меристемы винограда более устойчивы к действию ацетамида (АА) и менее устойчивы к действию диметилформамида (ДМФА), чем меристемы картофеля. Даже после 2-часовой инкубации в 1,5 М растворе АА около 30% меристем сохраняются.

В ряду диолов наиболее выраженный токсический эффект отмечен для 1,2-БД (до 40% меристем гибнут в 0,5 М и до 70% в 1,5 М растворах) и МЦ (гибель до 70% меристем в 1,5 М растворе). Другие криопротекторы данного ряда во всех использованных концентрациях не проявляют выраженного повреждающего действия. Однако можно сказать, что меристемы винограда как и картофеля оказались более устойчивыми к инкубации в растворах пропандиолов, чем в растворах бутандиолов.

Ряд диолов в порядке возрастания токсичности (1,5 М концентрация) имеет вид: ЭГ<1,2-ПД<1,3-ПД<1,4-БД≈1,3-БД≈2,3-БД<МЦ<1,2-БД.

Следует отметить, что ЭГ и глицерин токсического действия на меристемы винограда, как и на меристемы картофеля, не оказывают, а ДМСО

diol (BD), damaged up to 50% of apexes. The most part of diols in 1.5 M concentration began to reveal its damaging effect. Especially toxic appeared to be methyl cellosolve (MC) and 1,2-BD, their incubation in the solutions resulted in the loss of more than 70% of meristems. About 50% of meristems survived after the effect of 1,4 and 1,3-BD, and 2,3-BD and 1,2-PD affected more markedly, than 1,3-PD. Ethylene glycol (EG) in the given concentration is not toxic.

According to the manifestation of their toxic effect on potato meristems the amides form the series: DMFA≈DMAM<AA<FA

The series of diols in the order of an increased toxicity are of such a kind: EG<1,3-PD<1,2-PD<2,3-BD<1,3-BD≈1,4-BD<MC<1,2-BD.

Glycerol does not toxically affect the potato meristems under the used concentrations, and DMSO shows slightly manifested toxic effect only under 1.5 M concentration.

In Table 2 there are demonstrated the data about the effect of amides, diols, glycerol and DMSO on the integrity of grape meristems.

The results of investigation show that grape meristems are more resistant to the effect of acetamide (AA) and less resistant to the effect of potato dimethyl formamide (DMFA), comparing to the potato meristems. Even after 2 hrs incubation in 1.5 M AA solution about 30% of meristems are kept.

In diol series the more manifested toxic effect is noted for 1,2-BD (up to 40% of meristems die in 0.5 M and to 70% in 1.5 M in solutions) and MC (the death of 70% of meristems in 1.5 M solution). Other cryoprotectants of these series in all used concentrations do not manifest clear damaging cryoprotective effect. Although, we may say, that grape meristems as well as potato ones, appeared to be more resistant to the incubation in propanediol solutions than in butandiol ones.

Diol series in the order of toxicity increase (1.5 M concentration) is as follows: EG<1,2-PD<1,3-PD<1,4-BD≈1,3-BD≈2,3-BD<MC<1,2-BD.

It should be noted, that EG and glycerol do not toxically affect the grapes meristems, as well as potato ones, and DMSO shows slightly expressed damaging effect.

Analyzing the causes of toxicity and estimating a possible contribution into cell damage of osmotic factors, it is necessary to pay attention to the presented in the Table 1 and 2 distribution coefficients (DC) of substances in the system water-n-octanol and to the permeability coefficients of these substances [1]. Nowadays we have no real possibility to determine the membrane permeability of plant cells. However we suppose, that permeability coefficients for erythrocytes, given in the tables, can to some extent characterize the penetration capability of investigated

**Таблица 2.** Сохранность меристем винограда под действием различных концентраций криопротекторов  
**Table 2.** Grape meristems integrity under various cryoprotectants concentrations effect

| Криопротектор<br>Cryoprotectant       | Структурная формула<br>Structural formula  | Коэффициент<br>Coeffi cient              |   | Концентрация криопротектора, М<br>Cryoprotectant concentration, M |           |           |
|---------------------------------------|--|--|---|---|-----------|-----------|
|                                       |  | распределения [1]<br>of distribution [1] | проницаемости для эритроцитов [1]<br>of permeability for erythrocytes [1] | 0,5   | 1         | 1,5       |
| Ацетамид<br>Acetamide                 | $\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$  | 0,062                                    | 2,66  | 87,0±5,0  | 41,0±12,2 | 30,3±6,6  |
| Диметилформамид<br>Dimethyl formamide | $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ // \quad / \\ \text{H}-\text{C}-\text{N} \\ \quad \quad \backslash \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | 0,233                                    | 2,96  | 42,2±3,4  | 14,0±3,8  | 2,8±2,7   |
| Этиленгликоль<br>Ethylene glycol      | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$   | 0,040                                    | 1,98  | 100   | 100       | 100       |
| Метилцеллозольв<br>Methyl cellosolve  | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$  | 0,121                                    | —   | 88,5±4,3  | 98,2±1,9  | 34,8±4,4  |
| 1,3-пропандиол<br>1,3-propane diol    | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$                                   | 0,064                                    | 0,897   | 100   | 89,0±11,0 | 85,0±12,4 |
| 1,2-пропандиол<br>1,2-propane diol    | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$   | 0,076                                    | 1,6   | 91,7±8,2  | 89,0±11,0 | 93,3±16,5 |
| 1,4-бутандиол<br>1,4-buthane diol     | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$           | 0,137                                    | 0,979   | 97,6±2,5  | 96,1±3,2  | 75,1±5,4  |
| 1,3-бутандиол<br>1,3-buthane diol     | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$                         | 0,182                                    | 1,89  | 88,3±16,7   | 86,7±5,0  | 70,0±19,0 |
| 2,3-бутандиол<br>2,3-buthane diol     | $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$                                       | 0,227                                    | 2,64  | 83,3±4,6  | 68,8±5,3  | 68,0±6,1  |
| 1,2-бутандиол<br>1,2-buthane diol     | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$                                     | 0,308                                    | 2,89  | 57,8±4,3  | 51,4±1,7  | 34,6±4,8  |
| Глицерин<br>Glycerol                  | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$                         | 0,005                                    | 0,038   | 100   | 100       | 100       |
| DMCO<br>DMSO                          | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \quad \quad \backslash \\ \text{O} = \text{S} \\ \quad \quad / \\ \text{CH}_3 \end{array}$                                | 0,247                                    | —   | 89,0±11,0   | 100       | 83,3±20,7 |

проявляет слабовыраженное повреждающее действие.

Анализируя причины токсичности и оценивая возможный вклад в повреждение клеток осмотических факторов, следует обратить внимание на приведенные в табл. 1 и 2 коэффициенты распределения (Кр) веществ в системе вода – n-октанол и коэффициенты проницаемости этих веществ [1]. В настоящее время мы не располагаем реальной возможностью определения проницаемости мембран растительных клеток. Однако мы полагаем, что коэффициенты проницаемости для эритроцитов, приведенные в таблицах, могут в какой-то мере характеризовать проникающую способность изученного ряда веществ и для клеток растений. Известно, что диаметр белковой

substances series for the plant cells as well. It is known that the diameter of protein pore both in plasmolemma of the plant cell and in erythrocyte membrane is about 4Å, and membrane structures of animals and plants cells within the frames of investigated problem do not differ from each other significantly. Substances, which distribution coefficient is less than 0.1, badly penetrate through the lipid bilayer of plant membrane, but may come along the water channels, if their molecular diameter is not more than 4Å [5]. Glycerol, characterized both by the lowest distribution coefficient (low solubility in lipid phase) and the molecular diameter, which is more, than 4Å [1], slowly penetrates into the cell, and does not toxically affect on grapes and potatoes meristems. EG also characterised with a slight DC value, has a high coefficient of permeation due to small



поры и в плазмалемме растительной клетки, и в мембране эритроцита около 4Å, а структуры мембран клеток растений и животных в рамках рассматриваемой задачи существенно не отличаются друг от друга. Вещества, коэффициент распределения которых меньше 0,1, плохо проникают через липидный бислой мембран растений, но могут проходить по водным каналам, если диаметр их молекулы не превышает 4Å [5]. Глицерин, характеризующийся самым низким коэффициентом распределения (низкой растворимостью в липидной фазе) и диаметром молекулы, превышающим 4Å [1], медленно проникает в клетку и не оказывает токсического действия на меристемы винограда и картофеля. Этиленгликоль, также характеризуемый небольшой величиной Кр, имеет большой коэффициент проницаемости из-за маленького диаметра молекулы – 2,6Å [1]. Проникая через белковые поры, ЭГ не оказывает токсического действия на меристемы. Отсутствие корреляции токсичности глицерина и ЭГ с их проникающей способностью в клетки свидетельствует о том, что в общем повреждающее действие указанных веществ осмотический эффект не вносит существенного вклада. Следует обратить внимание на тот факт, что в гомологическом ряду исследованных диолов с увеличением числа и длины алкильных радикалов повышается коэффициент распределения данных веществ (т.е. растет их гидрофобность) и усиливается их повреждающее действие. Результаты, полученные для рядов изомеров 1,3-ПД – 1,2-ПД и 1,4-БД – 1,3-БД – 2,3-БД – 1,2-БД, свидетельствуют, что внутри ряда с увеличением коэффициента распределения усиливается токсическое действие веществ на меристемы, что согласуется с данными [2].

### Выводы

Увеличение Кр приводит к повышению проницаемости веществ через липидный бислой, что увеличивает вероятность пертурбаций в мембране и их повреждений. Рассматривая результаты, полученные для ряда этиленгликоль – метилцеллозольв, можно отметить, что введение метоксигруппы в молекулу ЭГ приводит к появлению токсического эффекта у МЦ [17].

Аналогичных выводов по отношению к амидам мы сделать не можем в связи с отсутствием возможности исследовать весь ряд веществ данного класса.

### Литература

1. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М. Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів // Пробл. криобіології.– 2002.– №4.– С. 9-15.

molecule diameter of 2,6Å [1]. Passing through pores EG does not toxically affect meristems. The absence of correlation between glycerol and EG toxicity and their penetration capability into the cells testifies to osmotic effect does not significantly contribute to the total damaging effect of the mentioned substances. The fact should be noted that in the series of homologues of investigated diols with the increase of the length and number of alkyl radicals, the distribution coefficient of these substances (that is their hydrophobicity grows) enhances and their damage effect increases. The results, obtained from the isomers series of 1,3-PD–1,2-PD and 1,4-BD–1,3-BD–2,3-BD–1,2-BD testify to the fact that within the series with the increase of distribution coefficient the toxic effect of substances on meristems intensifies, that corresponds to the data [2].

### Conclusions

The increase of DC results in the strengthening of substance permeability through the lipid bilayer that increases perturbation probability in membrane and their damages. Considering the results, obtained for the ethylene glycol series: methyl cellosolve, it is possible to note, that introduction of the methoxy group into EG molecular leads to the appearance of toxic effect [1].

Analogue conclusions in respect of amides we unable to make because of the absence of the possibility to investigate the whole series of this class substances.

### References

1. Gordienko O.I., Gordienko E.A., Linnik T.P., Kompaniets A.M. Mechanisms of Cryoprotectant Permeation via Erythrocytes Membranes // Problems of Cryobiology.– 2002.– №4.– P. 9-15.
2. Pichugin Yu.I. Dependence of cytotoxicity and cryoprotectant diols activity on their structure and physical and chemical peculiarities: Author's abstract of the candidate of biological sciences.– Kharkov, 1988.– 18 p.
3. Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V. Cryoprotectants.– Kiev: Nauk. dumka, 1979.– 197 p.
4. Rudishin S.D. Principles of plant biotechnology.– Vinnytsa, 1998.– 224 p.
5. Salamatova T.S. Physiology of plant cell.– Leningrad, 1983.– 232 p.
6. Smolyaninova E.I., Zhegunov G.F., Khromenkova O.V. Osmotic Behavior of Murine Embryos in Hypertonic Solutions of 1,2-Propanediol and its Oxyethylated Derivatives // Problems of Cryobiology.– 2000.– N1.– P. 49-51.
7. Fahy G.M., Lilley T.H., Lindsell H. et al. Cryoprotectant, toxicity and cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanism // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27.– P. 247-268.
8. Grospietsch M., Stodulkova E, Zamechnik J. Effect of osmotic stress on dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips // Cryo-Letters.– 1999.– Vol. 20, №6.– P. 339-346.
9. Harding K., Staines H. Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot tips recovered from tissue culture,

2. Пичугин Ю.И. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1988.– 18 с.
3. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1979.– 197 с.
4. Рудишин С.Д. Основы биотехнології рослин.– Вінниця, 1998.– 224 с.
5. Саламатова Т.С. Физиология растительной клетки.– Л., 1983.– 232 с.
6. Смольянинова Е.И., Жегунов Г.Ф., Хроменкова О.В. Осмотическое поведение эмбрионов мышей в гипертонических растворах 1,2-ПД и его оксиэтилированных производных // Пробл. криобиологии.– 2000.– №1.– С. 49-51.
7. Fahy G.M., Lilley T.H., Lindsell H. et al. Cryoprotectant, toxicity and cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanism // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27.– P. 247-268.
8. Grospietsch M., Stodulkova E, Zamechnik J. Effect of osmotic stress on dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips // Cryo-Letters.– 1999.– Vol. 20, №6.– P. 339-346.
9. Harding K., Staines H. Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot tips recovered from tissue culture, dimethyl sulfoxide treatment and cryopreservation // Cryo-Letters.– 2001.– Vol. 22, №4.– P. 255-262.
10. Kartha K.K. Cryopreservation of plant cells and organs.– Boca Raton: CRS Press, 1985.– 278 p.
11. Katkov I.I., Katkova N., Critser J.K., Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentration // Cryobiology.– 1998.– Vol. 37.– P. 325-338.
12. McLellan M.R., Schrijnemakers E.W.M., Van Iren F. The response of four cultured plant cell-lines to freezing and thawing in the presence or absence of cryoprotectant mixtures // Cryo-Letters.– 1990.– Vol. 11, №3.– P. 189-204.
13. Plessis P., Leddet C., Collas A., Dereuddre J. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L cv Chardonnay shoot-tips by encapsulation-dehydration effect of pretreatment, cooling and postculture conditions // Cryo-Letters.– 1993.– Vol.14, №5.– P. 309-320.
14. Tao Dali, Li Paul H. Classification of plant cell cryoprotectants // J.Theor. Biol.– 1986.– Vol. 123.– P. 305-310.
15. Towill L.E. Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups Andigena, Phureja, Stenotonum, Tuberosum and other tuber-bearing *Solanum* species // Cryo-Letters.– 1984, -5, №5. -P.319-326.
16. Wowk B., Darwin M., Harris S.B. et al. Effect of solute methoxulation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions // Cryobiology.– 1999.– Vol. 39.– P. 215-227.
- dimethyl sulfoxide treatment and cryopreservation // Cryo-Letters.– 2001.– Vol. 22, №4.– P. 255-262.
10. Kartha K.K. Cryopreservation of plant cells and organs.– Boca Raton: CRS Press, 1985.– 278 p.
11. Katkov I.I., Katkova N., Critser J.K., Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentration // Cryobiology.– 1998.– Vol. 37.– P. 325-338.
12. McLellan M.R., Schrijnemakers E.W.M., Van Iren F. The response of four cultured plant cell-lines to freezing and thawing in the presence or absence of cryoprotectant mixtures // Cryo-Letters.– 1990.– Vol. 11, №3.– P. 189-204.
13. Plessis P., Leddet C., Collas A., Dereuddre J. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L cv Chardonnay shoot-tips by encapsulation-dehydration effect of pretreatment, cooling and postculture conditions // Cryo-Letters.– 1993.– Vol.14, №5.– P. 309-320.
14. Tao Dali, Li Paul H. Classification of plant cell cryoprotectants // J.Theor. Biol.– 1986.– Vol. 123.– P. 305-310.
15. Towill L.E. Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups Andigena, Phureja, Stenotonum, Tuberosum and other tuber-bearing *Solanum* species // Cryo-Letters.– 1984, -5, №5. -P.319-326.
16. Wowk B., Darwin M., Harris S.B. et al. Effect of solute methoxulation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions // Cryobiology.– 1999.– Vol. 39.– P. 215-227.

*Accepted in 27.01.2004*

*Поступила 27.01.2004*