

Однако вопрос о возможности повреждений биологических объектов во время хранения при низких температурах изучен недостаточно. Принято считать, что в биологических объектах, которые хранятся при постоянной температуре в жидком азоте, дополнительные повреждения не возникают. При эксплуатации низкотемпературных банков уровень жидкого азота в хранилищах изменяется, что приводит к колебаниям температуры хранения объектов и возможности развития дополнительных повреждений клеток. Поэтому цель работы – изучение влияния колебаний температуры хранения при $-196\div-100^{\circ}\text{C}$ на жизнеспособность бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* B, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, клеток карциномы Герена крыс. Образцы, помещенные на длительный срок хранения в низкотемпературные хранилища, подвергали циклическому колебанию температуры. Во время одного цикла образцы находились 16 ч в жидком азоте и 8 ч – в парах жидкого азота при температурах $-150, -130, -100^{\circ}\text{C}$. Контроль жизнеспособности клеток определяли после 5 и 10-ти циклов.

Экспериментальные исследования показали, что однократный отогрев от -196 до $-150, -130, -100^{\circ}\text{C}$ и дальнейшее хранение при конечных температурах не приводят к дополнительной гибели бактерий, дрожжей, перевиваемых клеток, эмбриональных клеток печени и нейроткани эмбриона человека. Циклическое изменение температуры от -196 до -150°C и хранение при конечной температуре -150°C после 5 и 10-ти циклов также не вызывают дополнительную гибель клеток. Неоднократное колебание температуры хранения образцов в диапазонах $-196\div-130^{\circ}\text{C}$, $-196\div-100^{\circ}\text{C}$ и их выдерживание в течение 8 ч при конечных температурах -130 и -100°C приводят к дополнительной гибели криоконсервированных клеток. Количество погибших клеток увеличивается как при повышении конечной температуры выдерживания, так и увеличении количества циклов колебания температуры. Рассмотрены возможные механизмы повреждения клеток при циклическом изменении температуры хранения.

Установлено, что на чувствительность клеток к колебаниям температуры хранения влияют исходные морфофункциональные свойства, а также состав среды криоконсервирования.

It is a common notion that in biological objects, stored at constant temperature in liquid nitrogen, no additional damages appear. When low temperature banks are under exploitation the levels of liquid nitrogen in storehouses varies that results in fluctuations of storage temperature of objects and probable development of additional cell damage. Therefore the research aim was to study the effect of variations of storage temperature within the range of $-196\div-100^{\circ}\text{C}$ on the viability of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* B, *Saccharomyces cerevisiae* yeast, cells of rats' Guerin carcinoma. The samples placed for a long storage term into low temperature storehouses were subjected to cyclic temperature variation. During a cycle the samples were maintained for 16 hrs in liquid nitrogen and 8 hrs in its vapors at $-150, -130, -100^{\circ}\text{C}$. The control of viable cells was determined after 5 and 10 cycles.

Experiments showed that a single thawing from -196 to $-159, -130, -100^{\circ}\text{C}$ and further storage at final temperatures did not lead to an extra-death of bacteria, yeast, rats' Guerin carcinoma cells. Cyclic change in temperature from -196 to -150°C and storage at final temperature -150°C after 5 and 10 cycles also did not cause an additional death of cells. Not single fluctuations of storage temperature of samples within the range of -196 to -100°C may result in an additional death of cryopreserved cells. The number of dead cells enhances both with a rise in a final exposure temperature and increase in the number of temperature fluctuation cycles. There are considered different mechanisms of cell damage at cyclic change in storage temperature.

Cell sensitivity to fluctuation of storage temperature has been established to be affected by initial morphofunctional properties as well as the composition of cryopreservation medium.

Исследование влияния глицерина, 1,2-пропандиола и ДМСО на термоденатурацию микросомальных белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Е.В. Онищенко, А.В. Зинченко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Glycerol, 1,2-Propanediol and DMSO Influence to Thermal Denaturation of Microsomal Proteins by Differentiating Scanning Calorimetry Method

E.V. ONISCHENKO, A.V. ZINCHENKO

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

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) является одним из прямых методов изучения процесса денатурации белков. ДСК может быть использован для исследования эндотермических пере-

Method of differentiating of scanning calorimetry (DSC) is one of direct methods of studying denaturation proteins which may be used for research of endothermal transition of such difficult structures as isolated organelles,

ходов таких сложных структур, как изолированные органеллы, в частности митохондрии, микросомы. Установлено, что термоденатурация белков в микросомах и других клеточных органеллах происходит в температурном диапазоне 40–60°C [2, 3].

Цель работы – изучение влияния глицерина, 1,2-ПД и ДМСО на температуру и энтальпию тепловой денатурации белков микросомальных мембран до и после низкотемпературного воздействия. Выбранные криопротекторы широко используются при криоконсервировании биологических объектов.

Микросомальную фракцию получали методом дифференциального ультрацентрифугирования [1] из печени крыс линии Вистар. Содержание белка в суспензии, определяемое по методу Лоури в модификации Миллера [4], составляло 20–40 мг/мл. Образцы охлаждали до –196 °С погружением в жидкий азот с последующим нагревом на водяной бане при 37°C. Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре (ДАСМ-4) производства СКББП РАН (Пушино, Россия) при скорости сканирования 1°C/мин.

На начальном этапе мы изучали возможность использования микросом, подвергнутых замораживанию и хранению при температуре –196°C, для последующего исследования влияния криопротекторов на стабильность микросомальных белков. О состоянии микросомальных белков судили по показателям температуры и теплоты денатурации микросомальных белков, измеренным методом ДСК. Далее исследовали влияние криопротекторов в диапазоне концентраций от 5 до 30 масс % на термодинамические параметры денатурации микросомальных белков. На основании полученных термограмм построены зависимости теплоты ΔH и температуры T_d денатурации микросомальных белков от концентрации криопротекторов в растворе.

Характер зависимостей T_d и ΔH от концентрации криопротекторов в суспензиях микросом свидетельствует об одновременном проявлении разных факторов во взаимодействиях криопротекторов с белками микросомальных мембран как стабилизирующих, так и дестабилизирующих молекулу белка. Так, низкие концентрации криопротекторов (до 5–10 масс %), воздействуя на гидратное окружение микросомальных белков оказывают стабилизирующее действие на микросомальные мембраны, в то время как более высокие концентрации – дестабилизирующее в случае глицерина и 1,2-ПД. Данные исследования подтверждают тот факт, что процедура криоконсервирования биологических объектов требует их отмычки от криопротекторов.

Литература

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление.– М.: Наука, 1975.– 327 с.
2. Луневич А.Я. Термотропные свойства цитохром P-450-содержащих модельных и биологических мембран: Автореферат дис. ... канд. биол. наук.– Минск, 1987.– 20 с.
3. Lepock J.R., Frey H.E., Ritchie K.P. Protein Denaturation in Intact Hepatocytes and Isolated Cellular Organelles During Heat Shock // J. Cell Biol.– 1993.– Vol.122, N6.– P. 1267-1276.
4. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem.– 1959.– Vol. 31, N5.– P. 964-966.

(mitochondria, microsomes). It was established that proteins of thermal denaturation in microsomes and other cell organelles occurred at 40–60°C [2, 3].

Research aim is to study the influence of glycerol, 1,2-PD and DMSO to temperature, enthalpy of thermal protein denaturation of microsomal membranes before and after low temperature influence. Chosen cryoprotectants are widely used at cryopreservation of biological objects.

Microsomal fraction was obtained by differential ultra centrifugation [1] from the Wistar rat's livers. Protein content in suspension, determined by Lowry method in Miller' modification [4], it made 20–40 mg/ml. Samples were cooled down to –196°C by submerging into liquid nitrogen with following heating on water bath at 37°C. Thermogrammes were recorded with differential adiabatic scanning microcalorimeter (DASM-4) produced by Special Constructing Bureau of Biological Devices of Russian Academy of Sciences (Puschino, Russia) at 1°C/min scanning rate.

At initial stage there were studied the possibility of using the microsomes subjected to freezing and storage at –196°C for following investigation of the influence of cryoprotectants on stability of microsomal proteins. The state of microsomal proteins was judged on indices of temperature and denaturation head of microsomal proteins by DSC method. Then there was examined the influence of cryoprotectants on thermodynamic parameters of microsomal proteins denaturation under concentration from 5 to 30% w/w. On the base of obtained thermogrammes there were built the dependencies of heat ΔH and temperature T_d of microsomal proteins denaturation on concentration of cryoprotectants in solution.

The character of T_d and ΔH dependencies on concentration of cryoprotectants in microsome suspensions indicates to simultaneous manifestation of different factors in interactions of cryoprotectants with proteins of microsomal membranes of both stabilizing and destabilizing a protein molecule. Thus low concentrations of cryoprotectants (to 5–10% w/w), affecting hydrate environmental microsomal proteins, probably render a stabilizing effect on microsomal membranes meanwhile higher concentrations do a destabilizing one with adding glycerol and 1,2-PD. These research data confirm the fact that during cryopreservation of biological objects the washing-out of cryoprotectants is necessary.

References

1. Archakov A.I. Microsomal oxidation.– Moscow.:Nauka, 1975.– 327 p.
2. Lunevich A.Ya. Thermotropic properties of cytochrome P-450-containing model and biological membranes: Author's abstract of the thesis of candidate of biological sciences.– Minsk, 1987. – 20 p.
3. Lepock J.R., Frey H.E., Ritchie K.P. Protein Denaturation in Intact Hepatocytes and Isolated Cellular Organelles During Heat Shock // J. Cell Biol.– 1993.– Vol.122, N6.– P. 1267-1276.
4. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem.– 1959.– Vol. 31, N5.– P. 964-966.