

УДК 57.043:577.382.3:577.334

О.А. Нардид^{1*}, Я.О. Черкашина¹, Л.В. Иванов², Э.О. Нардид¹, А.Н. Ляпунов², В.В. Мамонтов¹

Влияние пропиленгликоля и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500 на микровязкость мембран эритроцитов

UDC 57.043:577.382.3:577.334

O.A. Nardid^{1*}, Ya.O. Cherkashina¹, L.V. Ivanov², E.O. Nardid¹, A.N. Lyapunov², V.V. Mamontov¹

Effect of Propylene Glycol and Polyethylene Glycol with Molecular Weight of 1,500 on Erythrocyte Membrane Microviscosity

Реферат: В работе с использованием метода электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов проведено сравнительное изучение влияния низко- и высокомолекулярных криозащитных веществ на микровязкость мембран эритроцитов. Результаты исследований вращательной подвижности жирно-кислотных спиновых зондов в мембранах эритроцитов после 5-минутной инкубации свидетельствуют об отсутствии значимых изменений микровязкости мембран в 15%-м растворе пропиленгликоля. Показано, что введение полиэтиленгликоля с м. м. 1500 (ПЭГ-1500) в конечной концентрации 15% в суспензию эритроцитов увеличивает микровязкость мембран при экспозиции до 60 мин. Это объясняется тем, что молекулы ПЭГ-1500 не проходят внутрь клеток, а локализируются на поверхности мембран, вызывая торможение вращательной подвижности спинового зонда. В начальный период наблюдения при таких концентрациях ПЭГ-1500 процесс нарушения жидкокристаллической структуры мембран и белково-липидных взаимодействий в мембране превалирует над процессом дегидратации клеток.

Ключевые слова: криопротекторы, эритроциты, мембраны, микровязкость, электронный парамагнитный резонанс, спиновые зонды.

Реферат: У роботі з використанням методу електронного парамагнітного резонансу спинових зондів проведено порівняльне вивчення впливу низько- і високомолекулярних криозахисних речовин на микров'язкість мембран еритроцитів. Результати досліджень обертальної рухливості жирно-кислотних спинових зондів у мембранах еритроцитів після 5-хвилинної інкубації в 15%-му розчині пропиленгликолю свідчать про відсутність значимих змін микров'язкості мембран. Показано, що введення поліетиленгликолю з м. м. 1500 (ПЕГ-1500) у кінцевій концентрації 15% у суспензію еритроцитів збільшує микров'язкість мембран при експозиції до 60 хв. Це пояснюється тим, що молекули ПЕГ-1500 не проходять усередину клітин, а локалізуються на поверхні мембран, викликають гальмування обертальної рухливості спинових зондів. У початковий період спостереження за таких концентрацій ПЕГ-1500 процес порушення рідкокристалічної структури мембран і білок-ліпідних взаємодій у мембрані превалює над процесом дегідратації клітин.

Ключові слова: криопротектори, еритроцити, мембрани, микров'язкість, електронний парамагнітний резонанс, спинові зонди.

Abstract: Electron paramagnetic resonance of spin probes was used to study the effect of low and high molecular weight CPAs on microviscosity of erythrocyte membranes. Research data on rotational mobility of the fatty acid spin probes in erythrocyte membranes after 5 min incubation in 15% propylene glycol solution indicate the absence of strong changes in membrane microviscosity. Introduced polyethylene glycol with m. w. 1500 (PEG-1500) at a final concentration of 15% has been shown to increase the membrane microviscosity at 60 min exposure. This is explained by the fact that the molecules of PEG-1500 do not pass inside the cells and are localized on the membrane surface to cause immobilization and inhibiting the rotational mobility of the spin probe. In the initial period of time under these concentrations of PEG-1500 the injury of liquid crystal membrane structure and disorder of the protein-lipid interactions in the membrane prevail over the dehydration of cells.

Key words: cryoprotectants, erythrocytes, membranes, microviscosity, electron paramagnetic resonance, spin probes.

За многие годы исследований в криобиологии накоплено значительное количество работ о высокой чувствительности биологических мембран к низким температурам и, особенно, к замораживанию [1, 6, 15, 22, 25]. Чувствительность мембран к действию замораживания и последующего отогрева обусловлена их сложной структурной организацией, обеспечивающей функционирование

Over many years of investigations in cryobiology a huge number of reports on a high sensitivity of biological membranes to low temperatures and in particular to freezing has been accumulated [3, 9, 10, 17, 22]. Sensitivity of membranes to freezing and subsequent thawing is stipulated by their complicated structural organization, providing the cell functioning [6, 8, 14]. Using the cryoprotective agents (CPAs) to

¹Отдел криобиофизики, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Институт монокристаллов НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: olnard@mail.ru

Поступила 25.08.2015

Принята в печать 09.02.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 35–44.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute of Solid Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: olnard@mail.ru

Received August, 25, 2015

Accepted February, 09, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 35–44.

© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

клеток [4, 5, 9]. При использовании криопротекторов для возможной защиты биообъектов от холодных повреждений должны учитываться данные об их влиянии на структуру и вязкость биологических мембран. Причины повреждений клеток в составе суспензий при замораживании и последующем отогреве окончательно не изучены, как и не определен до конца механизм действия применяемых криозащитных агентов [15–17, 24]. Среди описанных в литературе выделяют следующие механизмы защиты с помощью криопротекторов: предотвращение повреждений высокими концентрациями солей в растворах [26]; снижение повреждения клеток, в частности клеточных мембран, в результате дегидратации [3, 19, 23]; предотвращение внутриклеточной кристаллизации [6, 17] и некоторые другие. Однако известно, что данные соединения могут оказывать повреждающее действие, степень проявления которого зависит от температуры среды, концентрации вещества и времени экспозиции клеток в растворе и может приводить к увеличению гетерогенности липидного бислоя мембран, нарушению их барьерных свойств, ингибированию активности цитоплазматических и мембранных ферментных комплексов [3, 21, 23]. В суспензиях эритроцитов, содержащих высокомолекулярный криопротектор полиэтиленгликоль с м. м. 1500, были выявлены локальные изменения микровязкости мембраны, связанные с адсорбцией молекул криопротектора в местах белково-липидных контактов [14]. Появление при этом в спектрах электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) сигнала от более подвижных зондов свидетельствует об увеличении динамической гетерогенности мембран эритроцитов за счет появления более текучих областей. В присутствии низкомолекулярного криопротектора пропиленгликоля в суспензии клеток подобные изменения отсутствуют. Известно, что при добавлении низкомолекулярных проникающих криопротекторов к суспензии белых тений эритроцитов снижает термостабильность мембраносвязанных белковых комплексов [27]. Авторы считают, что это может быть вызвано нарушением внутри- и межмолекулярных взаимодействий интегральных и периферических белков мембран эритроцитов. Показано, что дестабилизирующий эффект пропиленгликоля на мембраны связан с его воздействием на интегральные мембранные белки, в то время как глицерина – на периферические.

При использовании криопротекторов внутриклеточного действия важно определить время, необходимое для эффективного проникновения вещества в клетку. Как правило, в результате длительной инкубации криопротектор оказывает

protect the biological objects from cold damages should consider the data about their impact on the structure and viscosity of biological membranes. The reasons of damage in the suspended cells occurring during freezing and subsequent thawing have not been completely understood, nor there was finally identified the acting mechanism of CPAs [16, 22, 24, 25]. The following protective mechanisms of the CPAs are among the described in publications: preventing the damage with high saline concentrations in solution [20]; reduction of cell damage, in particular, of cell membranes during dehydration [5, 12, 28]; preventing an intracellular crystallization [10, 25], *etc.* However, these compounds also could render a damaging effect, which extent depends on a medium temperature, concentration of substances and duration of exposure in a solution and can lead to an increased heterogeneity of membrane lipid bilayer, compromised barrier properties, inhibited activity of cytoplasmic and membrane enzyme complexes [1, 5, 12]. Local changes in membrane microviscosity were found in erythrocyte suspensions containing high molecular weight polyethylene glycol CPA with molecular weight of 1500, and these were associated with adsorption of CPA molecules in the sites of protein-lipid contacts [21]. The signal from more motile probes appeared in the spectra of electron spin resonance (ESR), that indicated an increased dynamic heterogeneity of erythrocyte membranes due to the emergence of more fluid areas. These changes were not found if low molecular weight CPA, propylene glycol, was present in the cell suspension. Adding the low-molecular penetrating CPAs to the suspension of erythrocyte white ghosts resulted in a reduction of thermal stability of the membrane-bound protein complexes [23]. The authors suggested that this might be due to a disruption of intra- and intermolecular interactions of integral and peripheral proteins of erythrocyte membranes. It has been shown that the destabilizing effect of propylene glycol on membrane was related to its influence on integral membrane proteins, whilst glycerol affected the peripheral ones.

When using the CPAs of intracellular action it is important to determine the time required for effective penetration of the substances into a cell. Generally, as a result of a prolonged incubation, the CPA has a toxic effect on cells. Optimal incubation time for each cell type is usually experimentally found [2, 16, 27, 28].

In reference with the above it is relevant to investigate the effects of CPAs on structure of cell membranes during their direct interaction. Herewith the most important was to study the effect of different CPAs on microviscosity of membranes, since the irreversible changes of cell membrane microviscosity could determine the cytotoxicity of CPAs. These mechanisms have been insufficiently elucidated, and



токсическое влияние на клетки. Оптимальная продолжительность инкубации для каждого вида клеток устанавливается зачастую опытным путем [19, 20, 24, 28].

В связи с вышеизложенным актуально было исследовать влияние криопротекторов на структуру мембран клеток при их непосредственном взаимодействии. При этом наиболее важным является изучение влияния различных криопротекторов на микровязкость мембран, поскольку необратимые изменения микровязкости мембран клеток могут определять цитотоксичность используемых криопротекторов. Эти механизмы выяснены недостаточно, что приводит зачастую к эмпирическим подходам при разработке способов и технологий низкотемпературного консервирования. Для получения более полной информации о состоянии мембранных структур в криопротекторных средах применяют неинвазивные методы исследования, в частности метод ЭПР спиновых зондов.

Цель работы – сравнительное изучение влияния низкомолекулярного (пропиленгликоль) и высокомолекулярного (полиэтиленгликоль с м. м. 1500) криозащитных веществ на микровязкость мембран эритроцитов методом ЭПР спиновых зондов.

Материалы и методы

В работе использовали проникающий через мембраны эритроцитов низкомолекулярный криопротектор пропиленгликоль (ПГ) и непроникающий высокомолекулярный полимер полиэтиленгликоль с м. м. 1500 (ПЭГ-1500). Растворы криопротекторов готовили на средах суспендирования эритроцитов и покапельно вносили в суспензии клеток при постоянном перемешивании при температуре 0°C до конечной концентрации 15%.

Данную работу выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Эритроциты для исследований получали из крови белых крыс-самцов. Для удаления плазмы и лейкоцитов кровь центрифугировали 5 мин при 1500g. Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли методом аспирации. Осадок эритроцитов трижды отмывали путем центрифугирования при 1500g в течение 3 мин в 10-кратном объеме фосфатно-солевого буфера (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4) и хранили при 4°C в течение 4 ч.

as result the methods and techniques for low-temperature preservation are developed basing on an empirical approach. For more complete information about the state of membrane structures in cryoprotective media one applies non-invasive research methods, in particular the method of EPR spin probes.

The research aim was to comparative study the effect of low (propylene glycol) and high (polyethylene glycol of 1500 m. w.) molecular weight CPAs on microviscosity of erythrocyte membranes by means of spin probes EPR.

Materials and methods

We used an erythrocyte membrane-penetrating CPA of low molecular weight propylene glycol (PG) and non-invasive high molecular polymer polyethylene glycol with m.w. of 1500 (PEG-1500). CPAs solutions were prepared with erythrocyte re-suspension media and were dropwise added into cell suspension during constant stirring at 0°C up to final concentration of 15%.

Experiments were carried out in accordance with the General Principles of Animal Experiments, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Erythrocytes for the research were derived from the blood of white male rats. To remove plasma and white blood cells the blood was centrifuged 5 min at 1500g. Buffy coat and supernatant were removed by aspiration. Erythrocyte pellet was three times washed by centrifugation at 1500g for 3 min in a 10-fold volume of phosphate-saline buffer (0.15 mol/l NaCl, 0.01 mol/l phosphate buffer, pH 7.4) and stored at 4°C for 4 hrs.

Spin probes EPR method with a lipophilic organic substitutive (allowing the stable nitroxyl radicals to build into lipophilic layer of erythrocyte membranes) was used to evaluate the time of the rotational diffusion correlation of the probes in lipid membranes of cells.

To investigate the microviscosity of erythrocyte membranes in the presence of CPAs we have chosen two spin probes based on palmitic acid (Fig. 1), synthesized by the previously described method [13, 26].

The probes 1 and 2 were dissolved in DMSO and added to the aqueous suspension of erythrocytes to a final concentration of probes of 10⁻⁴ M and DMSO concentration of 0.5–1%. EPR spectra were recorded with ESR Spectrometer CMS8400 (Adani, Belarus).

Brownian rotational diffusion of probes and erythrocyte membrane microviscosity were assessed by the parameters of the EPR spectra of nitroxyl radicals, spin probes 1 and 2 located in the erythrocyte membrane lipid bilayer [7, 15]. To calculate the correlation time of the Brownian rotational diffusion of the probe



В работе методом ЭПР спиновых зондов с липофильным органическим заместителем (что позволяет стабильным нитроксильным радикалам внедряться в липофильный слой мембран эритроцитов) оценивали время корреляции вращательной диффузии зондов в липидах мембран клеток.

Для исследования микровязкости мембран эритроцитов в присутствии криопротекторов были выбраны два спиновых зонда на основе пальмитиновой кислоты (рис. 1), синтезированных по методу описанному ранее [8, 18].

Зонды 1 и 2 растворяли в ДМСО, добавляли в водную взвесь эритроцитов до конечной концентрации зондов 10^{-4} М и концентрации ДМСО 0,5–1%. Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре «ESR Spectrometer CMS8400» («Adani», Беларусь).

Броуновскую вращательную диффузию зондов и микровязкость мембран эритроцитов оценивали по параметрам спектров ЭПР нитроксильных радикалов – спиновых зондов 1 и 2, находящихся в липидном бислое мембран эритроцитов [10, 13]. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (τ_c) использовали такие характеристики спектров: ширина центрального компонента (ΔH_0), интенсивность компонентов спектра ЭПР h_0 , h_{+1} , h_{-1} с магнитным квантовым числом ядра ^{14}N ($M = 0 + 1 - 1$), изотропная константа сверхтонкого взаимодействия ($A_{\text{изо}}$).

Вязкость большинства жидких сред определяют по уравнению Стокса-Эйнштейна:

$$\tau = 4\pi a^3 \eta / 3kT, \quad (1)$$

где a – радиус частицы, η – вязкость среды. В случае оценки вязкости среды с помощью спинового зонда a – эффективный радиус спинового зонда. Для вычисления времени корреляции вращательной диффузии зонда τ_c использовали выражения, полученные Г.И. Лихтенштейном [10]:

$$1/\tau_{c(+1)} = 2 \times 10^8 / [(h_0/h_{(+1)})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ с}^{-1} \quad (2)$$

$$\tau_{c(+1/-1)} = 8,33 \times 10^{-11} [(h_{(+1)}/h_{(-1)})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ с} \quad (3)$$

Для определения места нахождения нитроксильной головки спинового зонда в мембране оценивали полярность микроокружения нитроксильного фрагмента в присутствии/отсутствии криопротекторов с помощью параметра $A_{\text{изо}}$ [10, 13]. При нахождении нитроксильного радикала в водном окружении $A_{\text{изо}}$ составляет 16,7–17,2 Гс, а в липофильном окружении в мембране – 14–14,5 Гс.

Ошибка измерения величины $1/\tau_c$ определяется дифференцированием формул (1) или (2). Поскольку

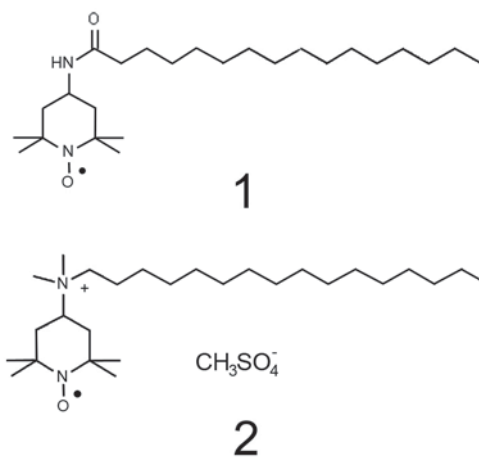


Рис. 1 Спиновые зонды на основе пальмитиновой кислоты: зонд 1 – нитроксильный радикал 4-пальмитиламидо-ТЕМПО и зонд 2 – нитроксильный радикал 4-(N,N-диметил-N-гексадециламмоний)-ТЕМПО, содержащий в своём составе четвертичный аммониевый фрагмент.

Fig. 1. Palmitic acid-based spin probes: 1 is nitroxide radical of 4-palmitoylamido-TEMPO and 2 is nitroxide radical of 4-(N,N-dimethyl-N-hexadecylammonium)-TEMPO, containing quaternary ammonium fragment.

(τ_c) we used the following spectral characteristics: the core component width (ΔH_0), intensity of the EPR spectrum components h_0 , h_{+1} , h_{-1} with the magnetic quantum nucleus number ^{14}N ($M = 0 + 1 - 1$); isotropic hyperfine interaction constant ($A_{\text{изо}}$).

The viscosity of most liquid media is determined with the Stokes-Einstein equation

$$\tau = 4\pi a^3 \eta / 3kT, \quad (1)$$

where a – particle radius; η – medium viscosity. If the viscosity of the medium is assessed using the spin probe, a is an effective radius of the spin probe. To calculate the correlation time of the probe rotational diffusion we used the expressions obtained by G.I. Liechtenstein [14]:

$$1/\tau_{c(+1)} = 2 \times 10^8 / [(h_0/h_{(+1)})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ sec}^{-1} \quad (2)$$

$$\tau_{c(+1/-1)} = 8,33 \times 10^{-11} [(h_{(+1)}/h_{(-1)})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ sec} \quad (3)$$

To determine the location of the spin probe nitroxyl head in membrane we assessed the microenvironment polarity of nitroxyl fragment in the presence/absence of the CPAs using the parameter $A_{\text{изо}}$ [7, 15]. If the nitroxyl radical was located in an aqueous environment $A_{\text{изо}}$ was 16.7–17.2 G, and in the lipophilic membrane environment it was 14–14.5 G.

The measurement error of the value $1/\tau_c$ is determined by differentiating the formulae (1) or (2). Since



точность измерений величины H_0 изменяется в зависимости от спектра, то величину ошибки для общего случая оценивали приблизительно. Для $1/\tau_c$ в области 10^{-9} c^{-1} она не превышает $0,1 \times 10^{-9} \text{ c}^{-1}$. Для статистической обработки полученных данных применяли пакет прикладных программ «Statistica 6.0» (США). Результаты исследования представлены в виде средних значений, отклонение – стандартной ошибки среднего. Статистическую значимость расхождений между значениями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Структурные особенности и физико-химические свойства липидной фазы играют важную роль в поддержании надмолекулярной организации биомембран, важным фактором которой является сохранение нативности белково-липидных комплексов. В связи с этим необходимо исследование влияния низко- и высокомолекулярных криозащитных веществ, которые обладают свойством проникать через цитоплазматические мембраны клеток, на микровязкость липидной фазы мембран для обоснования возможности применения таких криопротекторов при разработке технологий криоконсервирования клеточных суспензий.

Криопротекторы ПГ и ПЭГ-1500 вводили во взвесь эритроцитов в концентрации, близкой к реально используемым при криоконсервировании клеток. С одной стороны, такие концентрации обеспечивают целостность мембран эритроцитов, а с другой – они близки к критическим, т. е. при которых отмечаются нарушения мембранных структур. Такой выбор концентраций необходим для определения тенденций изменения структуры мембран под действием криозащитных веществ при сохранении их барьерных свойств. Спектры ЭПР регистрировали через 5 и 60 мин после введения криопротекторов во взвесь эритроцитов, что позволяло оценить изменение конформационной подвижности липидов мембран под действием криозащитных веществ с течением времени и последствия диффузии молекул криопротекторов внутрь мембраны.

Используемые липофильные спиновые зонды по-разному встраиваются в липидный бислой мембран. По-видимому, зонд 2 с положительным зарядом встраивается в мембрану подобно фосфатидилхолину, имеющему положительно заряженную холиновую «головку» и два алкильных «хвоста». На основании полученных нами результатов установлено, что нитроксильный фрагмент зонда 2 с неспаренным электроном находится вблизи поверхности мембраны в липидном окружении, так

the measurement accuracy of the parameter H_0 varies depending on the spectrum, the error value in general was evaluated approximately. For $1/\tau_c$ in the range of 10^{-9} c^{-1} it did not exceed $0,1 \times 10^{-9} \text{ c}^{-1}$. The data were statistically processed using Statistica 6.0 software (USA). Research results were presented as mean values, the deviation was done as SEM. Statistical significance of the differences between the groups was evaluated by Student's t-test. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

Results and discussion

Structural peculiarities and physicochemical properties of the lipid phase play a vital role in maintaining the supramolecular organization of biological membranes, an important factor of which is to preserve the native state of protein-lipid complexes. In this regard, there is a necessity in investigating the effects of low and high molecular weight CPAs, which are capable of penetrating through the cell cytoplasmic membrane, on microviscosity of membrane lipid phase, and using this knowledge to justify the possibility of application of these CPAs when developing the techniques to cryopreserve the cell suspensions.

CPAs PG and PEG-1500 were added into the suspension of erythrocytes under the concentration close to those actually used for cryopreservation of cells. These concentration, on the one hand, ensure the integrity of erythrocyte membranes, and, on another hand, they are close to critical ones, *i. e.* under which the disorders of membrane structures are noted. Such a selection of concentrations is necessary to determine the directions of changes in membrane structure under the CPAs influence, while maintaining their barrier properties. EPR spectra were recorded in 5 and 60 min following introduction of CPAs into erythrocyte suspension that allowed the evaluation of the change in conformational mobility of the membrane lipids under the influence of CPAs with the time course and the consequences of diffusion of CPAs molecules inside a membrane.

The used lipophilic spin probes are differently incorporated into lipid bilayer of membranes. Apparently, the probe 2 with a positive charge is incorporated into membrane like phosphatidylcholine, having a positively charged choline head and 2 alkyl tails. Based on these results we have found that the nitroxyl fragment of the probe 2 with an unpaired electron was located near the membrane surface in lipid environment, since its A_{iso} constant was 14.6 G and corresponded to the position of the nitroxyl fragment in a non-polar environment [15]. Nitroxyl fragment of probe 2 is 'sandwiched' between the phospholipid heads in the membrane and its rotational mobility can be quite sensitive to the changes in packing density of the



как его константа A_{iso} равна 14,6 Гс и соответствует нахождению нитроксильного фрагмента в неполярном окружении [10]. Нитроксильный фрагмент зонда 2 «зажат» между фосфолипидными головками в мембране, поэтому его вращательная подвижность может быть достаточно чувствительна к изменению плотности упаковки фосфолипидов мембран клеток, т. е. к микровязкости поверхности мембран. Связывание криопротекторов с мембраной эритроцитов и внедрение молекул криопротекторов между молекулами фосфолипидов мембран может изменять плотность упаковки фосфолипидов в мембране (микровязкость) и параметр A_{iso} зондов.

Нейтральный зонд 1 из-за отсутствия заряда более лабилен и менее погружен в липидный бислой мембран эритроцитов, чем несущий на себе положительный заряд зонд 2. Поэтому зонд 1 более чувствителен к приповерхностной области мембраны, а зонд 2 в большей степени характеризует состояние самого бислоя. В соответствии с этим вращательная подвижность зонда 1 в мембране эритроцитов несколько выше, чем зонда 2, что отражается на соответствующих спектрах ЭПР (рис. 2).

Анализ полученных нами результатов, а также данные литературы свидетельствуют о многофакторном влиянии криопротекторов на микровязкость мембран эритроцитов. Такими факторами являются первоначальная дегидратация и последующее восстановление объема или возможное набухание клеток, которые имеют разнонаправленное влияние на изменение микровязкости [11, 15, 27]. Кроме того, на микровязкость липидов при проникновении криопротекторов в мембрану будет влиять происходящее при этом нарушение жидкокристаллической структуры мембраны, а также изменение упорядоченности фосфолипидов и белково-липидных взаимодействий в мембранах клеток [7, 14, 15].

Ранее показано [12, 15], что добавление в достаточно высоких концентрациях (20%) проникающих криопротекторов, в частности глицерина, 1,2-ПД, ДМСО, приводит к двухфазному характеру изменений в клетке, связанному с начальной быстрой дегидратацией эритроцитов и уменьшением их объема, а затем к последующему восстановлению объема при диффузии молекул криопротекторов и воды внутрь клеток. При этом в начале объем клетки уменьшается, что приводит к уплотнению мембраны и увеличению ее микровязкости, затем микровязкость мембраны вследствие последующего восстановления клеточного объема уменьшается. Результаты проведенных нами исследований вращательной подвижности спиновых зондов

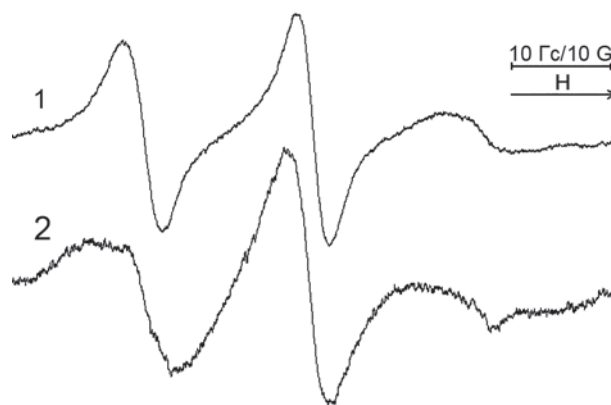


Рис. 2. Спектры ЭПР зондов 1 и 2 в эритроцитах при 25°C.

Fig. 2. EPR spectra of probes 1 and 2 in erythrocytes.

phospholipid cell membranes, *i. e.* to the membrane surface microviscosity. Binding of CPAs with the erythrocyte membrane and the insertion of the CPAs molecules between membrane phospholipids can alter the packing density of phospholipids in membrane (microviscosity), as well as the A_{iso} parameter of probes.

Neutral probe 1 has no charge and is more labile and less immersed into the lipid bilayer of erythrocyte membranes than the probe 2, carrying a positive charge. Therefore, the probe 1 is more sensitive to the membrane near-surface region and the probe 2 in a greater extent characterizes the state of the bilayer itself. Accordingly, the rotational mobility of the probe 1 in the erythrocyte membrane is slightly higher *vs.* the probe 2, that is reflected in the corresponding EPR spectra (Fig. 2).

The analysis of our findings and the previously reported data indicate multifactor effect of CPAs on microviscosity of erythrocyte membranes. These factors are the initial dehydration and subsequent volume recovery or *vice versa* swelling of the cells, which differently affect the changes in microviscosity [19, 22, 23]. In addition, during CPAs penetration into membrane the lipid microviscosity will be affected by occurring impairment of liquid crystal structure of the membrane as well as the change in the order of phospholipids and protein-lipid interactions in cell membranes [11, 21, 22].

It has been previously shown [18, 22] that the addition of relatively high concentrations (20%) of penetrating CPAs, such as glycerol, 1,2-PD, DMSO led to the biphasic nature of the changes in a cell associated with an initial rapid dehydration of erythrocytes and their volume reduction, and later to the following recovery of the volume during diffusion



1 и 2 в мембранах эритроцитов показали, что микровязкость мембран через 5 мин после добавления в суспензию эритроцитов ПГ в конечной концентрации 15% значительно не изменяется (таблица), что свидетельствует о быстрых процессах восстановления клеточного объема и диффузии внутрь клеток при комнатной температуре [12].

Через 5 мин после добавления в суспензию эритроцитов ПЭГ-1500 в конечной концентрации 15% микровязкость мембран уменьшается (таблица, зонд 2). Это обусловлено изменениями в жидко-кристаллической структуре мембраны из-за лиотропного мезоморфизма и нарушениями белково-липидных взаимодействий в мембране, преобладающими над процессом дегидратации эритроцитов с уплотнением мембраны под действием ПЭГ-1500. Эти данные совпадают с ранее полученными [14, 15]. С помощью спин-меченой в пятом положении доксилстеариновой жирной кислоты, которая локализуется на глубине 8 нм в липидной фазе, авторами было установлено увеличение динамической гетерогенности мембран эритроцитов за счет появления более текучих областей при добавлении в суспензию клеток ПЭГ-1500.

Данные вращательной подвижности зонда 1, находящегося на поверхности раздела мембрана-вода ($A_{iso} = 16,8$ Гс), свидетельствуют о том, что при введении ПЭГ-1500 в суспензию эритроцитов увеличивается микровязкость в приповерхностной области мембраны как в начальный период наблюдения (5 мин), так и через 60 мин (таблица). Это обусловлено тем, что молекулы ПЭГ-1500, которые располагаются на поверхности мембран в результате гидрофобных взаимодействий, вызывают уплотнение приповерхностной области мембраны и торможению вращательной подвижности спинового зонда.

Полученные результаты подтверждаются данными А.К. Гулевского [7], согласно которым глицерин и ПЭГ даже в более высоких концентрациях (40% и выше), не нарушая целостность мембран, увеличивают микровязкость в анизотропной зоне. Имобилизация поверхности мембраны может быть вызвана дегидратацией полярных областей мембраны в присутствии криопротекторов. Такой модифицирующий эффект усиливается с ростом концентрации криозащитных агентов [15].

Значения времени корреляции вращательной диффузии τ_c спиновых зондов в мембранах эритроцитов в присутствии 15% криопротекторов при температуре 25°C

Correlation time of rotational diffusion τ_c of spin probes in erythrocyte membranes in presence of 15% cryoprotectant (at 25°C)

Криопротектор Cryoprotectant	Время экспозиции, мин Exposure time, min	$\tau_{c(i+1)} \times 10^9$, с $\tau_{c(i+1)} \times 10^9$, sec		$\tau_{c(i+1/2)} \times 10^9$, с Зонд 2 $\tau_{c(i+1/2)} \times 10^9$, sec Зонд 1 Probe 2
		Зонд 2 Probe 2	Зонд 1 Probe 1	
Контроль Control	–	8,2 ± 0,1	1,6 ± 0,2	5,2 ± 0,1
ПЭГ-1500 PEG-1500	5	7,1 ± 0,3	2,2 ± 0,3	3,5 ± 0,3
	60	7,9 ± 0,3	2,2 ± 0,3	5,1 ± 0,3
ПГ PG	5	8,4 ± 0,2	2,0 ± 0,2	5,4 ± 0,2
	60	7,8 ± 0,3	1,7 ± 0,2	4,8 ± 0,3

of water molecules and CPAs into the cells. At first the cell volume decreases, and then the membrane microviscosity reduces as a result of following recovery of cell volume. Our findings on rotational mobility of spin probes 1 and 2 in erythrocyte membranes have shown that the microviscosity of membranes was not significantly altered 5 min later the addition of PG in a final concentration of 15% into erythrocyte suspension (Table), indicating the fast recovery of cell volume and diffusion of CPA into the cells at room temperature [18].

In 5 min after the addition into the erythrocyte suspension of PEG-1500 at a final concentration of 15% the membrane microviscosity decreases (Table, probe 2). This is stipulated by the changes in the liquid crystalline structure of membrane due to lyotropic mesomorphism and impaired protein-lipid interactions in membrane, prevailing over the dehydration of red blood cells and membrane compaction under the effect of PEG-1500. These findings are consistent with previous results [21, 22]. Using a doxylstearic fatty acid spin-labeled in the fifth position, which localized at a depth of 8 nm in lipid phase, a rise in dynamic heterogeneity of erythrocyte membranes the authors have found due to appearance of more fluid areas when PEG-1500 was added to cell suspensions.

The rotational mobility data for the probe 1, being on the surface of the membrane-water interface ($A_{iso} = 16.8$ G), indicate that the introduction of PEG-1500 into erythrocyte suspension increases the microviscosity in the near-surface region of membrane both at the start of observation (5 min) and 60 min later (see Table). This is stipulated by the fact that PEG-1500 molecules, located on the membrane surface,



Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что степень и характер воздействия криопротекторных веществ на мембраны эритроцитов зависят не только от молекулярной массы и пространственной структуры, а также от размера и проникающей способности молекул этих веществ. На взаимодействие молекул криопротекторов с мембранами может влиять и степень гидрофобности. На основании результатов предыдущих исследований [3, 7, 11, 12, 14, 15] можно полагать, что взаимодействие криопротекторов с мембранами осуществляется в результате их связывания с поверхностными группами фосфолипидов и белковых молекул.

Скорее всего, мембранотропный эффект криопротекторов обусловлен их влиянием как на полярные (вблизи поверхности), так и на гидрофобные взаимодействия липидных компонентов мембраны [7, 14, 15]. Полярные взаимодействия в присутствии криопротекторных веществ могут изменяться вследствие встраивания молекул веществ в бислой и дегидратации полярных «головок» фосфолипидов, а также при действии молекул криопротекторов на структуру воды и опосредованно на упаковку фосфолипидов.

Выводы

Результаты анализа вращательной подвижности жирно-кислотных спиновых зондов в мембранах эритроцитов показали, что 15%-я концентрация ПГ в суспензии клеток значимо не влияет на микровязкость мембран уже после 5 мин инкубации. Это подтверждает наличие достаточно быстрых процессов восстановления клеточного объема и диффузии внутрь клеток при комнатной температуре.

Введение ПЭГ-1500 в конечной концентрации 15% в суспензию эритроцитов увеличивает микровязкость мембран при экспозиции до 60 мин. Данный факт объясняется тем, что молекулы ПЭГ-1500 не проходят внутрь клеток, а локализуются на поверхности мембран, вызывая иммобилизацию поверхности мембран и торможение вращательной подвижности спинового зонда. Из анализа данных по подвижности спинового зонда, нитроксильный радикал которого расположен между фосфолипидными головками мембранных липидов, следует, что на начальном этапе экспозиции (5 мин) микровязкость мембран снижается с тенденцией к повышению в течение часа. Наблюдаемое снижение микровязкости обусловлено изменениями в жидкокристаллической структуре мембраны и нарушениями белково-липидных взаимодействий, превалирующими над процессом дегидратации эритроцитов.

in the result of hydrophobic interactions, cause the compaction of near-surface region of membrane and inhibition of spin probe rotational mobility.

These results are confirmed by the data of A.K. Gulevsky [11], according to which even higher concentrations (40% and higher) of glycerol and PEG increase the microviscosity in an anisotropic zone without compromising the integrity of membranes. Immobilization of the membrane surface may be caused by dehydration of the membrane polar regions in the presence of CPAs. This modifying effect is strengthened with a rise in concentration of CPAs. [22].

The results of performed studies suggest that the extent and nature of the CPAs effect on erythrocyte membranes depend not only on the molecular weight and the spatial structure, but also on the size and penetrating ability of the molecules of these substances. Hydrophobicity extent also can affect the interaction of CPAs molecules with membranes. Based on the findings of previous studies [5, 11, 18, 19, 21, 22], one can assume that CPAs interaction with membranes is implemented by their binding to the surface groups of phospholipids and protein molecules.

The membrane effect of CPAs is rather due to their influence on both polar (near the surface) and hydrophobic interaction of the lipid membrane components [11, 21, 22]. Polar interactions in the presence of CPAs may vary due to incorporation of the molecules and substances into the bilayer and the dehydration of polar heads of phospholipids, as well as during the CPAs molecules influence on water structure and indirectly on packaging of phospholipids.

Conclusions

The results of the analysis of rotational mobility of fatty acid spin probes in erythrocyte membranes have shown that presence of 15% PG in the cell suspension does not significantly affect the membrane microviscosity following 5 min incubation. This confirms the presence of quite rapid recovery of cell volume and diffusion into the cells at room temperature.

Introduction of PEG-1500 at a final concentration of 15% into erythrocyte suspension increases the membrane microviscosity during the exposure up to 60 min. This fact could be explained by the phenomenon that the molecules of PEG-1500 do not penetrate into the cells but are localized on the surface of membranes, causing the immobilization of membrane surface and inhibition of the spin probe rotational mobility. The analysis of the mobility data on the spin probe with the nitroxyl radical located between the phospholipid heads of membrane lipids, demonstrated that at the start of exposure (5 min) the microviscosity



Литература

1. Бауст Дж.Г., Бауст Дж.М., Шнайдер К., Ван Баскирк Р. Биосохранение – уменьшение отрицательных последствий консервирования на молекулярном уровне // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2 – С. 163.
2. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – К.: Наук. думка, 1982. – 256 с.
3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 432 с.
4. Бергельсон Л.Д. Биологические мембраны: Факты и гипотезы. – М.: Наука, 1975. – 183 с.
5. Богач П.Г., Курский М.Д., Кучеренко Н.Е., Рыбальченко В.К. Структура и функции биологических мембран. – К.: Вища школа, 1981. – 336 с.
6. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994. – 144 с.
7. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства мембран при низких температурах. – К.: Наук. думка, 1988. – 208 с.
8. Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Картель Н.Т. и др. Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови // Поверхность. – 2014. – Вып. 6(21). – С. 292–304.
9. Лев А.А. Ионная избирательность клеточных мембран. – Л.: Наука, 1975. – 323 с.
10. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
11. Моисеев В. А., Межидов С.Х., Нардид О.А. Исследование дегидратации эритроцитов методом спинового зонда // Биофизика. – 1989. – Т. 34, Вып. 6. – С. 993–996.
12. Межидов С.Х., Нардид О.А., Моисеев В.А. Метод ЭПР-спинового зонда в исследовании проницаемости эритроцитов для криопротекторов // Биофизика. – 1996. – Т. 41, Вып. 6. – С. 1278–1283.
13. Метод спиновых меток. Теория и применения / Под ред. Л. Берлинера. – М.: Мир, 1979. – 639 с.
14. Нардид О.А., Цымбал Л.В., Гулевский А.К. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов // Физико-химические процессы в криобиологических системах: Сб. статей. – Харьков, 1991. – С. 102–106.
15. Нардид О.А. Внутри- и межмолекулярные взаимодействия и их роль в криповреждении и криозащите биологических структур: Дис. ... д-ра. биол. наук. – Харьков, 2012. – С. 373.
16. Осецкий А.И., Гурина Т.М., Кирилюк А.Л., Репин Н.В. О механизме защиты криоконсервируемых биообъектов с помощью многокомпонентных криопротекторных растворов // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 231.
17. Розанов Л.Ф. Кинетика реакцій клітин на дію факторів криоконсервування: Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. – Харків, 1995. – 35 с.
18. Розанцев Э.Г. Свободные иминоксильные радикалы. – М.: Химия, 1970. – 216 с.
19. Смольянинова Е.И., Пишко О.В., Лисина Е.Г. и др. Анализ влияния различных этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов миши // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №4. – С. 385–393.
20. Пат. №30888А, Україна, МПК 6А01N 1/02. Спосіб консервування еритроцитів / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, С. Сусіда та ін. – заявл. 16.06.98; опубл. 15.12.2000, Бюл. №7.
21. Ancho doguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // Cryobiology. – 1987. – Vol. 24, №4. – P. 324–331.

of membranes was reduced and risen in an hour. The observed decrease in microviscosity was due to the changes in the liquid crystal membrane structure and impaired protein-lipid interactions, prevailing over the dehydration of red blood cells.

References

1. Ancho doguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 1987; 24(4): 324–331.
2. Babiy chuk L.O., Gris chenko V.I., Sumida S. et al., inventors. Cryopreservation method for erythrocytes. Patent of Ukraine N30888A. 2000 Dec. 15.
3. Baust J.G., Baust J.M., Shnayder K. et al. Biopreservation – molecular-based mitigation of the preservation challenges. *Problems of Cryobiology* 2008; 18(2): 163.
4. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes of biological membranes under cooling. Kiev: Naukova Dumka; 1982.
5. Belous A.M., Gris chenko V.I. *Cryobiology*. Kiev: Naukova Dumka; 1994.
6. Bergelson L.D. *Biological membranes: Facts and hypotheses*. Moscow: Nauka; 1975.
7. Berliner L.J., editor. *Spin labeling. Theory and applications*. New York – San Francisco – London: Academic press; 1979.
8. Bogach P.G., Kurskiy M.D., Kucherenko N.E., Rybalchenko V.K. The structure and function of biological membranes. Kiev: Vyscha shkola; 1981.
9. Farrant J., Walter C.A., Lee H. et al. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology* 1977; 14(3): 273–286.
10. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions. Kiev: Naukova Dumka; 1994.
11. Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Barrier properties of biomembranes at low temperatures. Kiev: Naukova Dumka; 1988.
12. Heber U.W. Freezing injury is relation to loss of enzyme activities and protection against freezing. *Cryobiology* 1968; 5: 188–201.
13. Ivanov L.V., Lyapunov O.M., Kartel M.T. et al. Delivery of spin probes by carbon nanotubes in erythrocytes and plasma of blood. *Surface* 2014; 6(21): 292–304.
14. Lev A. A. The ion selectivity of cell membranes. Leningrad: Nauka; 1975.
15. Likhtenshtein G.I. *Method of spin probes in molecular biology*. Moscow: Nauka; 1974.
16. Lovelock J.E., Bishop M.W.H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 1959; 183: 1394–1395.
17. Meryman H.T. Freezing injury and its prevention in living cells. *Ann Rev Biophys Bioeng* 1974; 3(4): 341–363.
18. Mezhhidov S.Kh., Nardid O.A., Moiseyev V.A. EPR spin probe method to study the permeability of red blood cells for the cryoprotectants. *Biophysics* 1996; 41(6): 1278–1283.
19. Moiseyev V.A., Mezhhidov S.Kh., Nardid O.A. Study of erythrocyte dehydration by the method of spin probe. *Biofizika* 1989; 34(6): 993–996.
20. Moiseyev V.A., Nardid O.A., Belous A.M. On a possible mechanism of the protective action of cryoprotectants. *CryoLetters* 1982; 3: 17–26.
21. Nardid O.A., Tsymbal L.V., Gulevsky A.K. Influence of cryoprotectants on the protein-lipid interactions in the membranes of red blood cells. Physical and chemical processes in



22. Farrant J., Walter C.A., Lee H. et. al. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // *Cryobiology*. – 1977. – Vol. 14, №3. – P. 273–286.
23. Heber U.W. Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing // *Cryobiology*. – 1968. – Vol. 5. – P. 188–201.
24. Lovelock J.E., Bishop M.W.H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide // *Nature*. – 1959. – Vol. 183. – P.1394–1395.
25. Meryman H.T. Freezing injury and its prevention in living cells // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* – 1974. – Vol. 3, №4. – P. 341–363.
26. Moiseyev V.A., Nardid O.A., Belous A.M. On a possible mechanism of the protective action of cryoprotectants // *CryoLetters*. – 1982. – Vol. 3. – P. 17–26.
27. Nardid O.A., Dyubko T.S., Soloviova A.S et. al. Influence of some polyols on erythrocyte cytoskeleton proteins // *Cellular & Molecular Biology Letters*.– 1998.– Vol. 3, № 2.– P. 187–188.
28. Simone F.P. Cryopreservation manual. – American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nunc International Corp. – 1998. – 8 p.
22. Nardid O.A. Intra- and intermolecular forces and their role in cryodamage and cryoprotection of biological structures [dissertation]. Kharkov; 2012.
23. Nardid O.A., Dyubko T.S., Soloviova A.S et al. Influence of some polyols on erythrocyte cytoskeleton proteins. *Cellular & Molecular Biology Letters* 1998; 3(2): 187–188.
24. Osetsky A.I., Gurina T.M., Kirilyuk A.L., Repin N.V. About mechanism of cryopreserved bioobject protection with multi-component cryoprotectant solutions. *Problems of Cryobiology* 2008; 18(2): 231.
25. Rozanov L.F. Kinetics of cell reactions on effect of cryopreservation factors. [Author's abstract of dissertation]. Kharkov; 1995.
26. Rozantsev E.G. Free iminoxyl radicals. Moscow: Khimiya; 1970.
27. Simone F.P. Cryopreservation manual. American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nunc International Corp; 1998.
28. Smolyaninova Ye.I., Pishko O.V., Lisina E.G. et al. Analysis of effect of different steps of vitrification protocol for cryopreservation with ethylene glycol-sucrose medium on 2-cell murine embryo viability. *Problems of Cryobiology* 2007; 17(4): 385–393.

