

Взаимодействие криопротекторов с липосомами из суммарных липидов спермиев петуха

UDC 577.352.2:57.043:636.5.082.453:66.095.11

T.P. LINNIK^{1*}, T.S. DYUBKO¹, I.N. MARTYNYUK¹, A.V. TERESCHENKO²

Interactions of Cryoprotectants with Liposomes from Total Lipids of the Fowl Spermatozoa

С использованием флуоресцентного зонда ФМЕ исследовано взаимодействие с липосомами, сформированными из суммарных липидов сперматозоидов петуха (СЛСП), криопротекторов: этиленгликоля (ЭГ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), N,N-диметилформамида (ДМФА), N,N-диметилацетамида (ДМАЦ), глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО). Установлено, что уровень воздействия криопротекторов на бислой определяется гидрофильно-гидрофобным балансом их молекул и имеет концентрационно-зависимый характер. По степени увеличения влияния на спектральные параметры флуоресценции ФМЕ в липосомах из СЛСП криопротекторы располагаются в ряд: глицерин \leq ЭГ $<$ 1,2-ПД $<$ ДМСО $<$ ДМАЦ \leq ДМФА, что согласуется с ростом их коэффициента распределения в системе “вода-неполярная фаза”. Рассматривается механизм влияния криопротекторов на связи, формирующие бислой.

Ключевые слова: петух, сперматозоиды, липиды, липосомы, криопротекторы, флуоресцентный зонд.

З використанням флуоресцентного зонда ФМЕ досліджено взаємодію з ліпосомами, які сформовані із сумарних ліпідів сперматозоїдів півня (СЛСП), криопротекторів: етиленгліколю (ЕГ), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), N,N-диметилформаміду (ДМФА), N,N-диметилацетаміду (ДМАЦ), гліцерину і диметилсульфоксиду (ДМСО). Встановлено, що рівень впливу криопротекторів на бішар визначається гідрофільно-гідрофобним балансом їх молекул та має концентраційно-залежний характер. За ступенем збільшення впливу на спектральні параметри флуоресценції ФМЕ в ліпосомах із СЛСП криопротектори розташовуються в ряд: гліцерин \leq ЕГ $<$ 1,2-ПД $<$ ДМСО $<$ ДМАЦ \leq ДМФА, що погоджується зі збільшення їх коефіцієнта розподілу в системі “вода-неполярна фаза”. Обговорюється механізм впливу криопротекторів на зв'язки, які формують бішар.

Ключові слова: півень, сперматозоїди, ліпіди, ліпосоми, криопротектори, флуоресцентний зонд.

Using the fluorescent probe FME we studied interactions of the cryoprotectants: ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (1,2-PD), N,N-dimethyl formamide (DMFA), N,N-dimethyl acetamide (DMAc), glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) with liposomes made from the fowl spermatozoa total lipid (FSTL). It was established that the level of CP impacts on bilayer is determined by hydrophilic-hydrophobic balance of their molecules and showed a concentration dependence. The cryoprotectants are ranked by their increasing influence on FME fluorescence spectral parameters in RSTL liposomes as follows: glycerol \leq EG $<$ 1,2-PD $<$ DMSO $<$ DMAc \leq DMFA, that corresponds the growth in their distribution coefficients in the system “water – non-polar phase”. A mechanism of the cryoprotectant impacts on bonds forming bilayer is discussed.

Key words: fowl spermatozoa, lipids, liposomes, cryoprotectants, fluorescent probe.

Для криоконсервирования спермы петухов разработаны альтернативные методы, основанные на использовании различных криопротекторов (КП): глицерина, этиленгликоля (ЭГ), N,N-диметилформамида (ДМФА), N,N-диметилацетамида (ДМАЦ) и диметилсульфоксида (ДМСО) [11], однако все они имеют определенные недостатки. Одной из причин этого является цитотоксическое действие КП, основная мишень которого – клеточные мембраны сперматозоидов петуха [5, 10–13]. Несмотря на то, что явление цитотоксичности КП давно общепризнано [11], тем не менее изучено недостаточно, молекулярные основы действия КП

Alternative methods for cryopreservation of the fowl sperm based on usage of different cryoprotectants (CPs): glycerol, ethylene glycol (EG), N,N-dimethyl formamide (DMFA), N,N-dimethyl acetamide (DMAc) and dimethyl sulfoxide (DMSO) [11] have been developed, however they all have certain disadvantages. One cause of this lies in CP cytotoxicity, the main target of which is the poultry spermatozoa cellular membranes [5, 10–13]. Despite the phenomenon of CP cytotoxicity is universally acknowledged [11], it is not studied enough; molecular principles of CP impact on membranes are still unclarified. Cryoprotectants are able to modify lipid-lipid and lipid-protein

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

²Институт птицеводства УААН, с. Борки, Харьковская обл.

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

²Institute of Domestic Bird Husbandry of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Village Borki, Kharkov Region

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

на мембраны до сих пор не выяснены. Криопротекторы способны модифицировать липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, изменять поверхностный потенциал, влиять на активность мембранных ферментов [11]. Одним из перспективных подходов, позволяющих оценить степень влияния внешних факторов на состояние липидного бислоя, является использование флуоресцентных зондов, молекулы которых прочно, но нековалентно связываются с мембранами, в том числе и модельными, и быстро реагируют на микроокружение.

Цель работы – исследование влияния проникающих КП различных химических классов: диолов – ЭГ, 1,2-пропандиола (1,2-ПД); амидов – ДМФА, ДМАЦ; триолов – глицерин и сульфоксидов – ДМСО на искусственные мембраны (липосомы), сформированные из суммарных липидов сперматозоидов петухов (СЛСП) с использованием флуоресцентного зонда ФМЕ.

Материалы и методы

Для исследований использовали сперму петухов породы род-айланд (предоставлены Институтом птицеводства УААН), которую получали массажем абдоминальной области. Концентрацию сперматозоидов определяли спектрофотометрически [10].

Для получения СЛСП сперму от 25 петухов объединяли и отмывали от спермальной плазмы 3-кратным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Липиды из сперматозоидов экстрагировали по модифицированной методике Блайя и Дайэра [8] и хранили в хлороформе при -20°C [9].

Однослойные липосомы со средним диаметром 80–100 нм получали из предварительно растворенных в 1 мл спирта СЛСП инъекционным методом с последующим диализом при 4°C против физиологического раствора, приготовленного на 5 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 [6].

Все КП марки “х. ч.” или “ч. д. а.” (Реакхим, Россия) дополнительно очищали 2-кратной вакуумной перегонкой, предварительно выдерживая 24 ч над окисью алюминия или активированным углем марки “А” [1, 14]. Концентрацию КП выражали в массовых процентах.

В качестве флуоресцентного зонда использовали краситель класса гидроксифлавонолов – 3-гидрокси-4'--(N,N-диметиламино)флавоин (ФМЕ), предоставленный В. Г. Пивоваренко (КНУ им. Т.Г. Шевченко). Для экспериментов ФМЕ готовили в виде спиртового раствора (5×10^{-3} М) и добавляли в суспензию липосом до конечной концентрации $2,5\text{--}5 \times 10^{-6}$ М за 15 мин до начала измерений. Спектры флуоресценции регистрировали при

interactions, to change surface potential, to affect membrane enzymes activities [11]. One of the promising approaches allowing evaluation of gravity of environmental factors influence on lipid bilayer state is application of fluorescent probes, molecules of which bind with membranes (including model ones) tightly, but non-covalently, and respond quickly to microenvironment.

The aim of the work is the investigation of influence of penetrating CPs of different chemical nature: diols – EG, 1,2-propane diol (1,2-PD); amides – DMFA, DMAc; triols – glycerol and sulfoxides – DMSO on artificial membranes (liposomes) formed from the fowl spermatozoa total lipids (FSTL) with the usage of the fluorescent probe FME.

Materials and methods

Sperm of fowls of the breed Rod Island (granted by Institute of Domestic Bird Husbandry of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences), which was obtained by massaging the abdominal region, was used in the research [10].

To get FSTL we mixed sperm from 25 fowls and washed it out from spermal plasma by 3-time centrifuging at 3,000 rpm for 10 min. Lipids from spermatozoa were extracted by the modified Blay and Dayer's technique [8] and stored in chloroform at -9°C [9].

Monolayer liposomes with the average diameter of 80–100 nm were obtained from FSTL pre-soluted in 1 ml of ethanol by the injection method with the following dialysis at 4°C against physiological solution prepared on 5 mM sodium-phosphate buffer, pH 7.4 [6].

All the CPs of grade “chemically pure” or “analytically pure” (Reakhim, Russia) were additionally purified by twice repeated vacuum distillation after preliminary exposure above aluminium oxide or activated carbon of grade “A” for 24 hours [1, 14]. The CPs' concentrations are presented as mass percents.

A dye from the hydroxyflavone class, 3-hydroxy-4'--(N,N-dimethylamino) flavone (FME) granted by V.G. Pivovarenko (T.G. Shevchenko Kiev National University), was used as a fluorescent probe. FME was prepared as ethanol solution (5×10^{-3} M) and added to liposome suspension to the final concentration of $2.5\text{--}5 \times 10^{-6}$ M 15 min prior the start of measuring. Fluorescence spectra were registered at room temperature (20°C) on a spectrofluorimeter Cary Eclipse (Varian, USA) with automatic correction. The width of the monochromator inlet and outlet slits was 5 nm. FME fluorescence spectra were excited by light with wavelength of 405 nm and registered in the diapason of 410–650 nm. The probe excitation spectra were registered at the fluorescence wavelength of 570 nm. FME fluorescence synchronic spectra were determined by scanning the excitation and fluorescence monochromators from 200 to 550 nm with the shift value of the monochromators $\Delta\lambda = 40$ nm. To eliminate

комнатной температуре (20°C) на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) с автоматической коррекцией. Ширина входной и выходной щелей монохроматоров составляла 5 нм. Спектры флуоресценции ФМЕ возбуждали светом с длиной волны 405 нм и регистрировали в области 410–650 нм. Спектры возбуждения зонда регистрировали на длине волны флуоресценции 570 нм. Синхронные спектры флуоресценции ФМЕ получали сканированием монохроматоров возбуждения и флуоресценции от 200 до 550 нм при величине сдвига монохроматоров $\Delta\lambda = 40$ нм. Для устранения концентрационного тушения при флуориметрических измерениях образцы разводили так, чтобы их оптическая плотность на длине волны возбуждения флуоресценции не превышала 0,1 [6]. Все спектральные измерения выполняли при 20°C в стандартных кварцевых кюветах размером 1×1×3 см.

Спектральные кривые анализировали с помощью программы “Microcal Origin 6.0”. Положение N*- и T*-полос флуоресценции ФМЕ уточняли по вторым производным спектров флуоресценции.

Результаты исследований

При электронном возбуждении ФМЕ способен изомеризоваться, образуя нормальную (N*) и таутомерную (T*) формы (рис. 1). Данная реакция обусловлена внутримолекулярным фотопереносом протона. Каждая из форм обладает флуоресцентными свойствами, вследствие чего в спектре ФМЕ, как и других флавонолов, можно наблюдать полосы зелено-голубой (форма N*) и желтой (форма T*) эмиссии, на положение и интенсивность которых влияют параметры микроокружения зонда в мембранах (вязкость, полярность, способность к образованию межмолекулярных водородных связей и др.). В липидном бислое ФМЕ располагается в области “полярных головок” липидов, частично погружаясь в гидрофобную зону углеводородных цепей [18, 21].

В физиологическом растворе и водных растворах КП флуоресценция ФМЕ тушится водой, а спектр флуоресценции представлен одной полосой. При связывании с липосомами, образованными из СЛСП, многократно возрастает интенсивность флуоресценции, изменяется форма спектра, в котором отчетливо проявляются полосы: длинноволновая с максимумом при 570 ± 2 нм (T*-полоса) и коротковолновая (N*-полоса) в виде плеча с максимумом около 515 ± 3 нм (рис. 2). Сравнительно низкая величина отношения интенсивностей N*- и T*-полос флуоресценции ФМЕ (F_{515}/F_{570}) в липосомах из СЛСП составляет $0,41 \pm 0,03$, что свидетельствует о высокой гидрофобности его микроокружения [18].

concentration quench during fluorimetric measurements we diluted samples so that their absorbancy at the fluorescence excitation wavelength did not exceed 0.1 [6]. All the spectral measurements were performed at 20°C in standard quartz cuvettes of the size of 1×1×3 cm.

Spectral curves were analysed with the Microcal Origin 6.0 software. The positions of N* and T* FME fluorescence bands were specified by the second derivatives of the fluorescence spectra.

Results and discussion

When being electron-excited FME can isomerize yielding normal (N*) and tautomeric (T*) forms (Fig. 1). This reaction is attributed to proton intramolecular phototransfer. Each of the forms has its fluorescence characteristics, thereupon in FME spectrum as well as in spectra of other flavones one can observe emission in green-blue (N* form) and yellow (T* form) bands, positions and intensities of which are influenced by parameters of the probe microenvironment in membranes (viscosity, polarity, capacity for forming intermolecular hydrogen bonds *etc.*). In lipid bilayer FME settles in the lipid polar head region partially submerging in hydrophobic zone of hydrocarbon chains [18, 21].

In physiological solution and in CP aqueous solutions FME fluorescence is quenched by water, and the fluorescence spectrum is presented as a single band. When binding with liposomes produced from FSTL FME is characterised by manifold increased intensity of fluorescence and changed spectrum shape, in which the long wavelength band with the maximum at 570 ± 5 nm (T* band) and the short wavelength one with the maximum at about 515 ± 3 nm become apparent (Fig. 2). A comparatively low ratio of the FME fluorescence

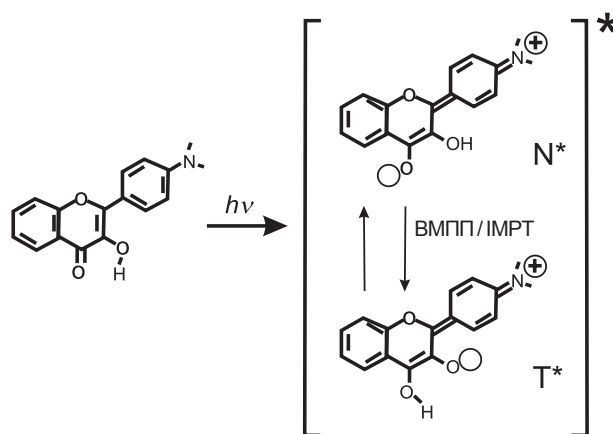


Рис. 1. Химическая структура основного и возбужденного состояний зонда ФМЕ [18, 19] (ВМПП – внутримолекулярный фотоперенос протона).

Fig. 1. Chemical structure of the basic and excited states of the probe FME [18, 19] (IMPT – intramolecular photon phototransfer).

Установлено, что все исследованные КП снижают квантовый выход флуоресценции ФМЕ, связанного с липидным бислоем, однако степень их влияния на интенсивность и положение N*- и T*-полос флуоресценции разная. На рис. 3 (и далее) представлены примеры влияния глицерин и ДМФА, наиболее отличающихся по своей структуре и физико-химическим свойствам в ряду изученных КП, на форму спектров флуоресценции ФМЕ, встроенного в липосомы из СЛСП.

Как видно из рис. 3, в исследованной области концентраций глицерин наиболее гидрофильное из изученных веществ оказывает наименьшее влияние на форму спектра флуоресценции ФМЕ, а значит – и на липосомы. Спектр сохраняет свою двухполосную структуру даже при содержании глицерина в среде 20%. Практически такие же изменения наблюдаются под действием ЭГ.

В то же время диполярный апротонный ДМФА, более гидрофобный по сравнению с глицерином, начинает заметно влиять на форму спектра ФМЕ уже при концентрации около 10%, при дальнейшем повышении концентрации этого КП исчезает коротковолновая N*- полоса и наблюдается сдвиг положения максимума длинноволновой T*- полосы в коротковолновую область к 554 нм. Подобные форма и положение полосы близки к нормальному спектру флуоресценции ФМЕ, который наблюдается в водных растворах КП. Аналогичные изменения формы спектра флуоресценции ФМЕ в суспензии липосом наблюдаются в присутствии ДМСО и ДМАЦ, которые также относятся к дифильным апротонным растворителям. В суспензиях липосом, содержащих 1,2-ПД, форму спектра ФМЕ

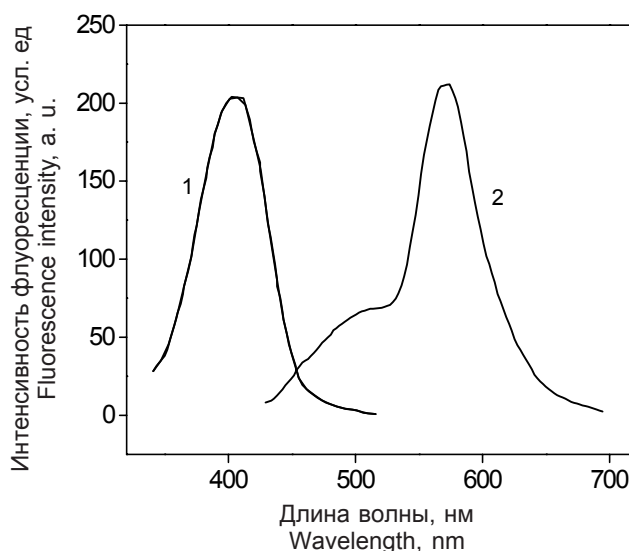


Рис. 2. Спектры возбуждения (1) и флуоресценции (2) зонда ФМЕ в липосомах из СЛСП.

Fig. 2. FME excitation (1) and fluorescence (2) spectra FSTL liposomes.

N* and T* bands intensities (F_{515}/F_{570}) in FSTL liposomes is 0.41 ± 0.03 , that attests to high hydrophobicity of the probe microenvironment [18].

All the CPs studied were revealed to decrease quantum yield of fluorescence of FME bound with lipid bilayer, however the extents of their influence on fluorescence N* and T* bands intensity and position are different. In Fig. 3 (and further) examples of impacts of glycerol and DMFA, which mostly differ by their structures and physico-chemical properties among the CPs studied, on spectra of fluorescence of FME embedded in FSTL liposomes are presented.

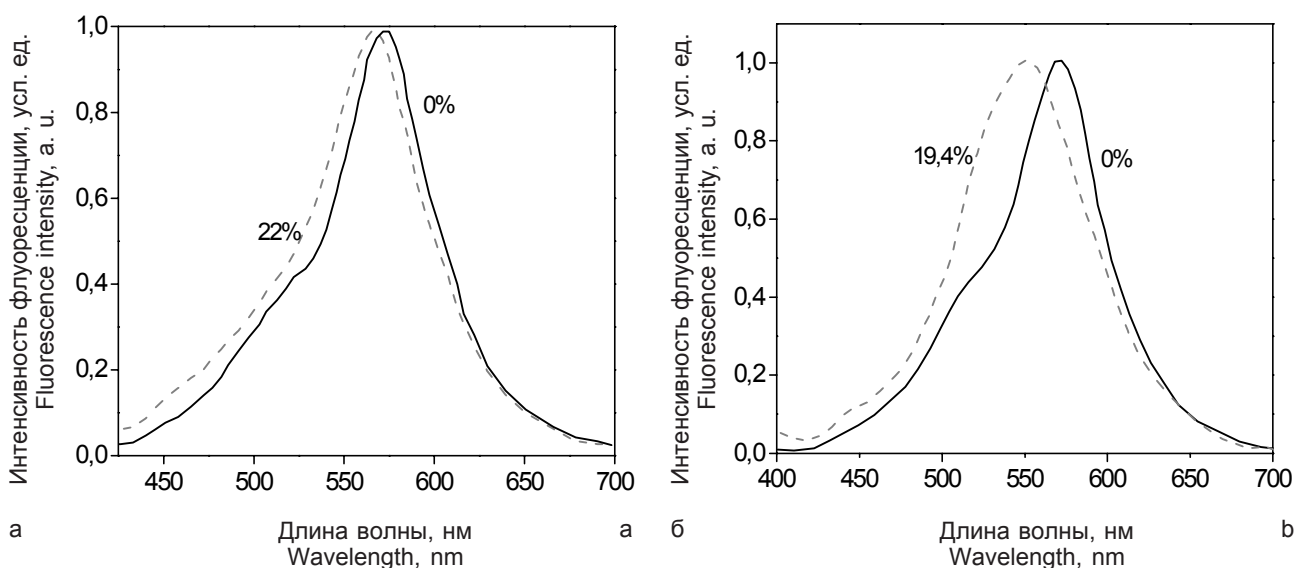


Рис. 3. Влияние глицерина (а) и ДМФА (б) на нормированные спектры флуоресценции ФМЕ в липосомах из СЛСП (концентрация криопротекторов указана рядом с соответствующими кривыми).

Fig. 3. Glycerol (a) and DMFA (b) impacts on FME fluorescence normalized spectra in FSTL liposomes (cryoprotectant concentration is shown at appropriate curves).

можно рассматривать как промежуточную: вплоть до 20 %-й концентрации 1,2-ПД спектр сохраняет двухполосную структуру, но изменения интенсивности и положения коротковолновой составляющей более выражены, чем в присутствии глицерина и ЭГ.

Дополнительную информацию о влиянии КП на липидный бислой можно получить из спектров возбуждения (рис. 4), а также из синхронных спектров флуоресценции (ССФ) ФМЕ (рис. 5). Слабые изменения положения и полуширины спектров возбуждения ФМЕ в присутствии глицерина (незначительное уменьшение полуширины при более высоких концентрациях глицерина) свидетельствуют о том, что микроокружение зонда практически не изменяется и более однородно. В то же время в присутствии ДМФА наблюдается не только длинноволновое смещение спектров возбуждения, но и их уширение, свидетельствующее об увеличении гетерогенности в бислое липосом в области распределения ФМЕ.

Две полосы, которые обнаруживаются в синхронных спектрах флуоресценции ФМЕ при разнице сдвигов монохроматоров возбуждения и флуоресценции ($\Delta\lambda = 40$ нм), относятся, по-видимому, к спектральным разновидностям нормальной N*-формы ФМЕ. Можно утверждать, что максимумы полос ССФ при 420–430 и 470–472 нм принадлежат ФМЕ, связанному с мембранами, так как вклад флуоресценции зонда, находящегося в воде, минимален (менее 10%). Кроме того, максимум флуоресценции ФМЕ в водных растворах NaCl и КП наблюдается около 440 нм. В присутствии глицерина в синхронных спектрах флуоресценции ФМЕ

With reference to Fig. 3 it can be seen that within the concentration range investigated glycerol, which is the most hydrophilic among the substances studied, exerts the least impact on FME fluorescence spectrum, consequently, on the liposomes, too. The spectrum maintains its two-band pattern even with 20% glycerol in medium. Practically the same changes are observed in the case of EG.

At the same time dipolar aprotic DMFA, which is more hydrophobic than glycerol, exerts a conspicuous impact on FME spectrum even at the concentration of about 10%, and when this CP concentration being increased further, the short wavelength N* band disappears and the long wavelength T* band maximum shifts to the short wavelength diapason to 554 nm. Such pattern and band position are close to FME fluorescence normal spectrum in CP water solutions. Analogous changes of FME fluorescence spectra in liposome suspension are observed in the presence of DMSO and DMAc, which also belong to diphilic aprotic solvents. In the liposome suspension containing 1,2-PD the FME spectrum pattern can be considered as intermediate: up to 20% concentration of 1,2-PD the spectrum maintains its two-band pattern, but changes of the short wavelength component intensity and position are more conspicuous than those in the case of glycerol and EG.

Additional information about CPs influence on lipid bilayer can be derived from excitation spectra (Fig. 4) as well as from FME fluorescence synchronic spectra (FSS) (Fig. 5). Slight changes of the position and half-width of FME excitation spectra in the presence of glycerol (unessential decline in the half-width at higher concentrations of glycerol) attest to the fact that the

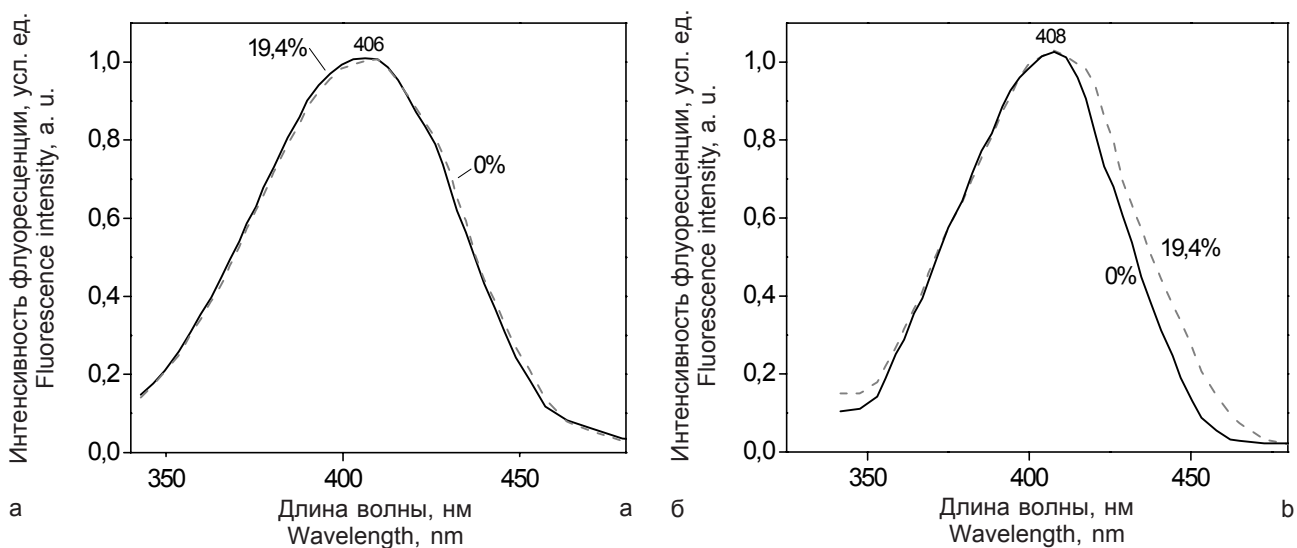


Рис. 4. Влияние глицерина (а) и ДМФА (б) на нормированные спектры возбуждения ФМЕ в липосомах из СЛСП ($\lambda_{\text{рег}} = 406$ нм, концентрация криопротекторов указана рядом с соответствующими кривыми).

Fig. 4. Glycerol (a) and DMFA (b) impacts on FME excitation normalized spectra in FSTL liposomes ($\lambda_{\text{reg}} = 406$ nm, cryoprotectant concentration is shown at appropriate curves).

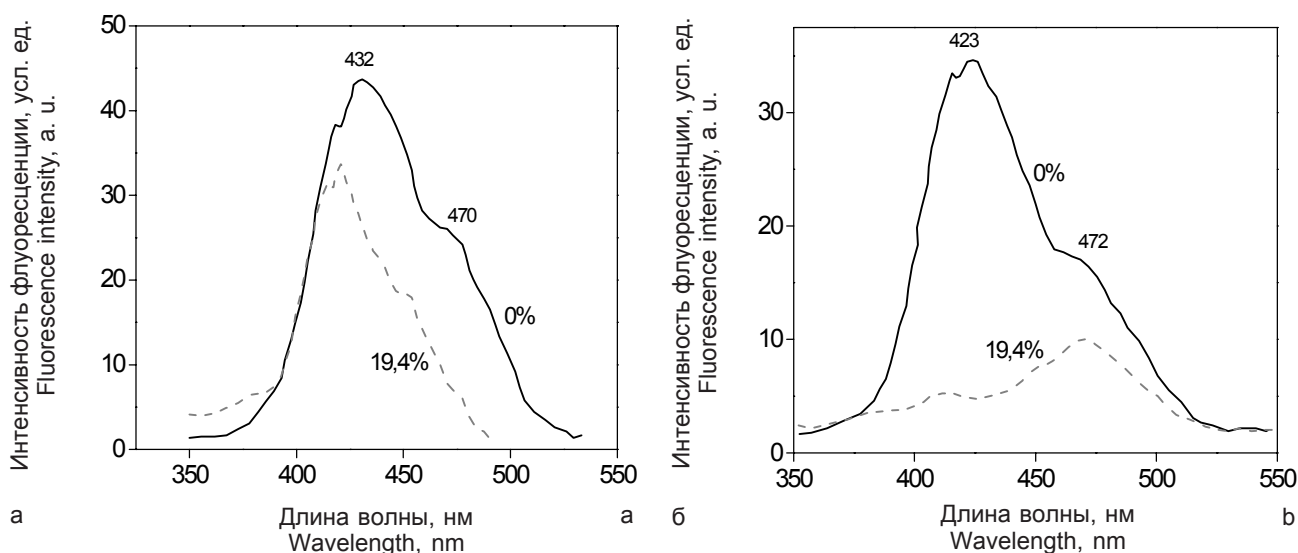


Рис. 5. Влияние глицерина (а) и ДМФА (б) на синхронные спектры флуоресценции ФМЕ в липосомах из СЛСП ($\Delta\lambda=40$ нм) (концентрация криопротекторов указана рядом с соответствующими кривыми).

Fig. 5. Glycerol (a) and DMFA (b) impacts on FME fluorescence synchronic spectra in FSTL liposomes ($\Delta\lambda=40$ nm, cryoprotectant concentration is shown at appropriate curves).

почти равномерно снижается интенсивность обеих полос (рис. 5, а). Это свидетельствует о том, что глицерин в исследованной области концентраций практически не оказывает возмущающего влияния на структуру бислоя липосом, сформированных из СЛСП, а незначительное снижение интенсивности полос может быть связано с частичным конкурентным замещением поверхностно локализованного зонда при образовании водородных связей глицерина с полярными головками липидов. При введении в суспензию липосом ДМФА и увеличении его концентрации (рис. 5, б) форма ССФ зонда резко изменяется. Снижение интенсивности коротковолнового пика, вероятно, отражает не только активное вытеснение из мембран ФМЕ, нарушая его водородные связи с фосфатными и карбонильными группами липидов, но и значительное изменение свойств микроокружения зонда, возможно, за счет более “глубокого” внедрения ДМФА в бислой.

Информативным параметром, отражающим изменение состояния ближайшего окружения ФМЕ, связанного с мембраной, является отношение интенсивностей флуоресценции его нормальной и таутомерной форм (F_{N^*}/F_{T^*}) [16]. Дополнительную информацию предоставляет совместный анализ отношения F_{N^*}/F_{T^*} и изменения положения максимумов N^* - и T^* -полос флуоресценции зонда. Влияние глицерина и ДМФА на отношение F_{N^*}/F_{T^*} , а также на положение максимумов λ_{N^*} и λ_{T^*} представлено на рис. 6 и 7.

В присутствии глицерина (рис. 6, а) отношение F_{N^*}/F_{T^*} практически не изменяется по сравнению с контролем ($0,41 \pm 0,03$), что формально можно рассматривать как отсутствие модифицирующего

probe microenvironment practically does not change and is more homogeneous. At the same time in the presence of DMFA not only long wavelength shift of the excitation spectra, but also their widening attesting to a rise in heterogeneity in lipid bilayer in FME distribution zone are observed.

Two bands, which are discovered in FME fluorescence synchronic spectra at the difference between excitation and fluorescence monochromators shifts ($\Delta\lambda = 40$ nm), seem to belong to spectral varieties of normal N^* form of FME. One can affirm that SSF bands maxima at 420–430 and 470–472 nm appertain to FME bound with membranes, since the contribution of the probe fluorescence in water is minimal (less than 10%). Besides, FME fluorescence maxima in NaCl and CP aqueous solutions are observed at about 440 nm. In the presence of glycerol the intensities of both bands decrease almost uniformly in FME fluorescence synchronic spectra (Fig. 5, a). This attests to the fact that within the concentration range studied glycerol practically does not exert perturbation influence on FSTL liposome bilayer structure, and a slight decline in the bands intensities can be attributed to a partial competitive substitution of the surface-localized probe, when hydrogen bonds between glycerol and lipid polar heads form. The SSF configuration of the probe changes drastically, when DMFA is added to liposome suspension and its concentration increases (Fig. 5, b). Apparently a decline in the short wavelength peak intensity reflects not only active displacement of FME from membranes, which impairs its hydrogen bonds with lipid phosphate and carbonyl groups, but also significant changes of the probe microenvironment characteristics, possibly, at the account of a deeper embedding of DMFA in bilayer.

влияния этого КП на микроокружение связанного с липосомами зонда, а, следовательно – и на бислоем. Однако при концентрациях глицерина 5 – 15% (рис. 6, а) наблюдается некоторое уменьшение отношения F_{N^*}/F_{T^*} , указывающее на снижение полярности и повышение гидрофобности микроокружения зонда. Изменения положения максимумов λ_{N^*} и λ_{T^*} (рис. 6, б) незначительны. Глицерин и ЭГ способны дегидратировать липосомы, уменьшая их размеры, а также сольватировать полярные головки липидов мембран, что приводит к уменьшению толщины и упорядочиванию бислоя [2].

Напротив, при повышении концентрации ДМФА в суспензии липосом отношение F_{N^*}/F_{T^*} значительно увеличивается по сравнению с контролем, наблюдается резкий перелом при его концентрации около 10% (рис. 7, а). По данным [2], максимальное количество ДМФА, которое может связаться с бислоем липосом из яичного лецитина путем сольватации его полярных головок приблизительно соответствует концентрации 10%. При содержании ДМФА в суспензии 20% отношение F_{N^*}/F_{T^*} достигает величины 0,91. При этом наблюдается значительное сближение положения N*- и T*-полос флуоресценции ФМЕ (рис. 7, б).

Характер изменения и значения спектральных характеристик флуоресценции ФМЕ в липосомах из СЛСП под воздействием остальных изученных КП либо мало отличаются (глицерин и ЭГ), либо повторяют ту же закономерность (ДМСО и ДМАЦ, как ДМФА), но переломы наблюдаются при разных концентрациях. Изменения в спектрах флуоресценции ФМЕ, связанного с бислоем, в присутствии 1,2-ПД имеют промежуточный характер. По степени увеличения влияния на параметры спектра флуоресценции ФМЕ в липосомах КП располагаются в ряд: глицерин \leq ЭГ $<$ 1,2-ПД $<$ ДМСО $<$ ДМАЦ \leq ДМФА.

Наблюдаемое снижение квантового выхода и изменение формы спектров флуоресценции ФМЕ в присутствии возрастающих концентраций КП может быть следствием: 1 – перераспределения молекул зонда из мембран в растворитель вследствие замещения или вытеснения молекул зонда из центров сорбции в бислоем молекулами КП по конкурентному механизму; 2 – тушения флуоресценции зонда молекулами воды или КП, происходящего в результате изменения нативной структуры бислоя и, как следствие, повышения его доступности за счет нарушения липид-липидных взаимодействий вплоть до полного разрушения липосом. Бислоевая структура липидных мембран поддерживается балансом электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий полярных головок липида и воды, а также гидрофобных взаимодействий в области углеводородных цепей.

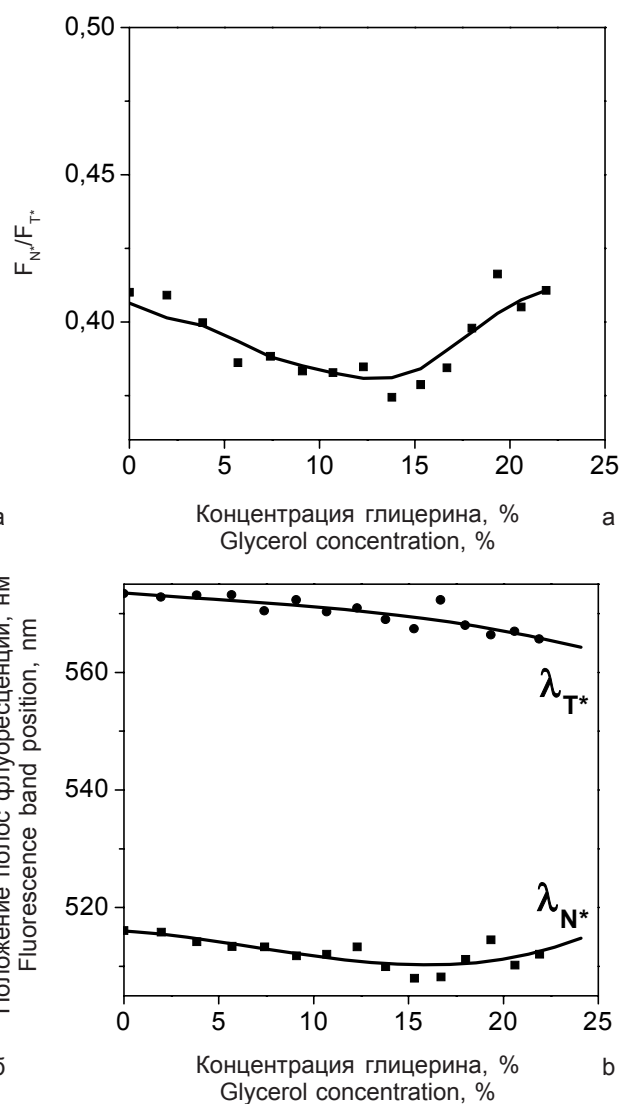


Рис. 6. Влияние глицерина на отношение интенсивностей F_{N^*}/F_{T^*} (а) и положение (б) полос флуоресценции ФМЕ в липосомах из СЛСП.

Fig. 6. Glycerol impact on the intensities ratio F_{N^*}/F_{T^*} (а) and FME fluorescence bands positions (б) in FSTL liposomes.

The ratio of fluorescence intensities of FME normal and tautomeric forms (F_{N^*}/F_{T^*}) is an informative parameter reflecting changes of the nearest environment of FME bound with membrane [16]. Coupled analysis of the ratio F_{N^*}/F_{T^*} and the probe fluorescence N* and T* bands maxima shifts gives additional information. Glycerol and DMFA impacts on F_{N^*}/F_{T^*} and the λ_{N^*} and λ_{T^*} maxima positions are presented in Fig. 6 and 7.

In the presence of glycerol (Fig. 6, a) the ratio F_{N^*}/F_{T^*} practically does not change in comparison with the control (0.41 ± 0.03), that can be considered *pro forma* as lack of any modifying influence of this CP on microenvironment of the probe bound with liposomes, and, consequently, on bilayer, too. Nevertheless at 5–15% concentrations of glycerol (Fig. 6, a) a certain

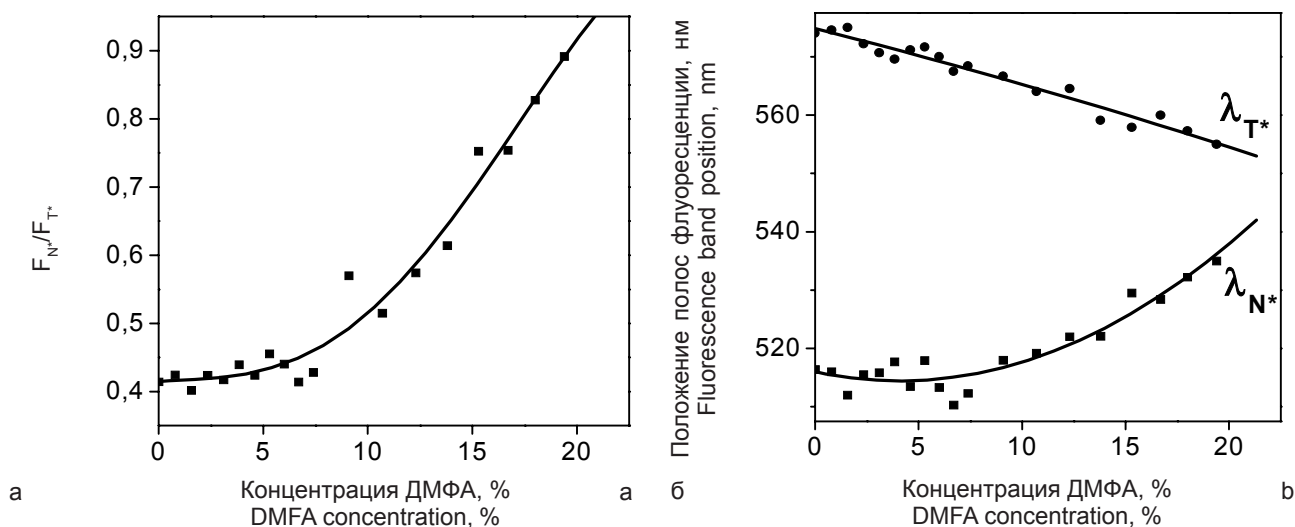


Рис. 7. Влияние ДМФА на отношение интенсивностей F_{N^*}/F_{T^*} (а) и положение (б) полос флуоресценции ФМЕ в липосомах из СЛСП.
Fig. 7. DMFA impact on the intensities ratio F_{N^*}/F_{T^*} (a) and FME fluorescence bands positions (b) in RSTL liposomes.

Очевидно, что изменение или нарушение этого баланса в присутствии КП зависит от их физико-химических свойств.

Диэлектрическая проницаемость среды (ϵ) является одним из важных параметров, определяющих формирование бислоиных структур молекулами липидов в смешанных растворителях [2]. Согласно расчетам по уравнению Шахпоронова [15], увеличение концентрации КП в суспензии липосом до 20% приводит к уменьшению величины ϵ в среднем на 10–12% от диэлектрической проницаемости воды 78,5. Эти значения согласуются с экспериментальными результатами работы [7]. Даже при 20%-й концентрации всех изученных КП величина диэлектрической проницаемости среды не достигает критического значения ($\epsilon \approx 34$), ниже которого в растворах неэлектролитов не могут возникнуть и существовать бислоиные структуры [2]. Следовательно, изменение диэлектрической проницаемости окружающей липосомы среды при изученных концентрациях КП не является основной причиной нарушения бислоиной организации мембран.

Методом дифракции рентгеновских лучей установлено, что ДМСО в концентрации $> 10\%$ инициирует образование новой фазы в бислое, которая сосуществует с нативной, и только при концентрации $> 40\%$ нативная фаза исчезает [20], что свидетельствует о нарушении структуры бислоя. Под влиянием ДМСО наблюдалось также уменьшение толщины мембраны в липосомах из яичного лецитина с 37,4 до 35,9 Å [2]. Таким образом, в диапазоне исследуемых концентраций КП, по-видимому, полного разрушения липосом не происходит. Однако повышение в суспензии липосом концентрации изученных веществ, кроме ЭГ и глицерина,

drop in the ratio F_{N^*}/F_{T^*} is observed, which indicates to a reduction in polarity and increase in hydrophobicity of the probe microenvironment. The changes of the λ_{N^*} and λ_{T^*} maxima positions (Fig. 6b) are negligible. Glycerol and EG are able to dehydrate liposomes decreasing their sizes as well as to solvate membrane lipid polar heads, which leads to a decrease in bilayer thickness and regularity [2].

Contrariwise, as DMFA concentration grows in liposome suspension, the ratio F_{N^*}/F_{T^*} increases considerably in comparison with the control; a kink is observed at its concentration of about 10%. According to [2] the maximal DMFA percentage, which can be bound with egg lecithin liposome bilayer by solvating lecithin polar heads is also approximately 10%. If suspension contains 20% DMFA, the ratio F_{N^*}/F_{T^*} reaches 0.91. Thereat a considerable contingency of FME fluorescence N* and T* bands is apparent (Fig. 7, b).

The changes in FME fluorescence spectral characteristics in FSTL liposomes under the influence of the other studied CPs either differ little (glycerol and EG) or demonstrate the same regularities (DMSO, DMAc) as those for DMFA, but with kinks at different concentrations. The bilayer-bound FME fluorescence changes in the presence of 1,2-PD are of intermediate pattern. By ascending influence on FME fluorescence spectra parameters the CPs are ranked in the following way: glycerol \leq EG $<$ 1,2-PD $<$ DMSO $<$ DMAc \leq DMFA.

The observed decrease in quantum yield and FME fluorescence spectra configuration changes in the presence of the CPs increasing concentrations can be a consequence of: 1 – redistribution of the probe molecules from membranes into solvent because of substitution or displacement of the probe molecules with the CPs molecules from sorption sites in bilayer by the

может оказывать возмущающее действие на нативную “упаковку” мембран, нарушать липид-липидные взаимодействия, и в силу этого способствовать возникновению липидных пор. При этом мембрана более доступна как для КП, так и для молекул воды.

Способность КП внедряться в гидрофобную область липидного бислоя коррелирует с их коэффициентом распределения (K_p) в системе “вода – неполярная фаза”. Чем выше K_p для конкретного вещества, тем оно более гидрофобно, следовательно, легче взаимодействует с бислоем по гидрофобному механизму, проникая глубоко в зону углеводородных цепей. По мере увеличения коэффициента распределения в системе “вода – n-октанол” изученные криопротекторы расположены в порядке [11]: глицерин < ЭГ < 1,2-ПД < ДМФА < ДМСО < ДМАЦ.

Наблюдаемые изменения спектральных характеристик флуоресценции ФМЕ под влиянием изученных веществ согласуются с ростом их коэффициента распределения в системе “вода – неполярная фаза”, т. е. с их способностью к гидрофобным взаимодействиям. Существенных отклонений формы спектров зонда в присутствии ЭГ и глицерина не наблюдается, следовательно, эти КП не способны нарушать липид-липидные взаимодействия липосом. Более того, замещая молекулы воды в сольватной оболочке полярных головок вплоть до зоны карбонильных групп, напротив, способствуют укреплению гидрофобных связей углеводородных звеньев липидов. Имея в структуре две протоно-донорные гидроксильные группы, 1,2-ПД до определенной концентрации ($\approx 10\%$) влияет на липосомы практически как ЭГ и глицерин. Но наличие CH_3 - группы в α -положении обеспечивает его способность встраиваться в гидрофобную область бислоя и вносить вклад в нарушения липид-липидных взаимодействий, подобно ДМСО и ДМФА.

Дифильные ДМСО, ДМФА и ДМАЦ также образуют прочные Н-связи, но с протонодонорными функциональными группами ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $=\text{NH}$, $-\text{NH}_2$) полярных головок липидов или молекулами воды. Значит они могут сольватировать полярную область липидов. Однако наличие в структуре этих веществ 2-х метильных групп (в ДМАЦ – 3-х) обуславливают их гидрофобные свойства: способность растворять жиры (липиды) и самим растворяться в липидах. Эти вещества способны глубоко внедряться в зону углеводородных цепей бислоя, нарушать липид-липидные взаимодействия в липосомах, тем самым существенно изменять микроокружение зонда, конкурировать за места его связывания. Подтверждением

competitive mechanism; 2 – the probe fluorescence quench by water or the CPs molecules occurring due to changes of bilayer native structure and, as a result, an increase in its accessibility at the account of disruption of lipid-lipid interactions up to complete disintegration of liposomes. Lipid membrane bilayer structure is provided by balance between electrostatic and van der Waals interactions of lipid polar heads and water as well as hydrophobic interactions in hydrocarbon chain zone. Evidently changes or aberrations of this balance in the CPs presence depend on their physicochemical properties.

Medium dielectric permittivity (ϵ) is one of the important parameters determining formation of bilayer structures from lipid molecules in hybrid solvents [2]. According to the calculations by the Shakhporonov's equation [15] an increase in CP concentration in liposome suspension up to 20% results in the drop in the ϵ value at the average by 10–12% related to water permittivity 78.5. These values are consistent with the experimental data in [7]. Even with 20% concentration of all the CPs studied the medium dielectric permittivity does not reaches the crucial value ($\epsilon \approx 34$), below which bilayer structures cannot emerge and exist in non-electrolyte solutions [2]. Consequently, changes of permittivity of surrounding liposomes medium at the CPs concentrations studied are not the main cause of disruption of membrane bilayer organisation.

By X-ray diffraction it was shown that DMSO at the concentration of > 10% initiated formation a new phase in bilayer that coexisted with the native one, and only at the concentration of > 40% the native phase disappeared [20], which attests to lipid bilayer disruption. Under DMSO influence the egg lecithin liposome membrane thickness lessened from 37.4 to 35.9 Å [2]. Thus, within the range of the CP concentrations investigated, apparently, there is no complete disintegration of liposomes. Nevertheless increasing concentrations of the substances studied, except EG and glycerol, in liposome suspension can exert perturbation influence on membrane native “packing”, disrupt lipid-lipid interactions, and thereby contribute to emergence of lipid pores. Herewith membrane is more accessible both to CPs and to water molecules.

CPs' capacity for being embedded in hydrophobic zone of lipid bilayer correlates with their distribution coefficient (K_d) in the system “water – non-polar phase”. The higher K_d for a concrete substance is, the more hydrophobic it is, consequently, the easier it interacts with bilayer by hydrophobic mechanism penetrating deeply into hydrocarbon chain zone. According to the growth of the distribution coefficient in the system “water – n-octanol”, the CPs investigated are arranged in the following order [11]: glycerol < EG < 1,2-PD < DMFA < DMSO < DMAc.

этого являются значительные изменения спектральных параметров флуоресценции зонда в присутствии данных КП.

Гипотетическая схема, иллюстрирующая расположение в липидном бислое зонда ФМЕ, а также глицерина и ДМФА, которые наиболее отличаются по структуре и гидрофильно-гидрофобным свойствам, представлена на рис. 8.

В состав СЛСП, из которых сформированы липосомы, входят как “кислые” липиды (фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, этаноламин плазмалоген, фосфатидилэтанолламин, кардиолипин и др.), полярные головки которых содержат протондонорные гидроксильные и аминные группы, так и “нейтральные” (фосфатидилхолин (39,6%), сфингомиелин (13,1%) и др.) [17]. При этом содержание “нейтральных” липидов в сперматозоидах петухов составляет более половины от общего количества фосфолипидов, а их фосфолипидные головки практически не содержат протондонорных групп. Возможно, это еще одна причина, из-за которой ДМСО и ДМФА, в отличие от глицерина, ЭГ и 1,2-ПД, в меньшей степени связываются с полярной зоной липидного бислоя, а преимущественно встраиваются в начало его неполярной области путем гидрофобного взаимодействия. Причем активное влияние ДМСО, ДМФА и ДМАЦ на липид-липидные взаимодействия проявляется в диапазоне концентраций 5–8%, при более высоких концентрациях резко усиливается.

Следует отметить, что указанные концентрации этих КП являются “пороговыми”, применение более высоких вызывает существенные повреждения мембран сперматозоидов петухов при гипотермическом хранении и замораживании.

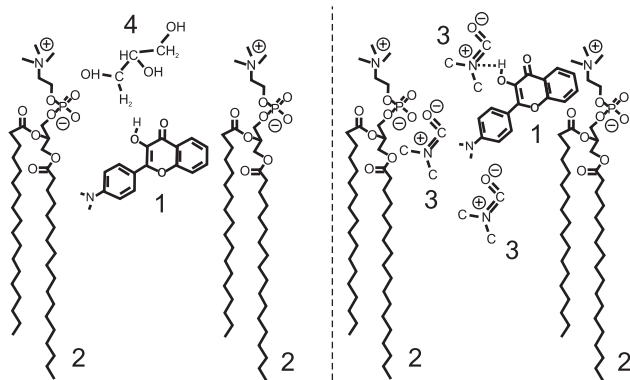


Рис. 8. Гипотетическая схема локализации зонда ФМЕ (1), ДМФА (3) и глицерина (4) в липидном бислое из фосфатидилхолина (2) [18, 21].

Fig. 8. The hypothetical scheme of the probe FME (1), DMFA (3) and glycerol (4) locations in lipid phosphatidyl choline bilayer [18, 21].

The observed changes of FME fluorescence spectral characteristics under the influence of the substances studied conform with the growth of their distribution coefficients (K_d) in the system “water – non-polar phase”, *i. e.* with their capacity for hydrophobic interactions. No significant aberrations of the probe spectra patterns were observed for EG and glycerol, consequently, these CPs are unable to disrupt lipid-lipid interactions in liposomes. Moreover by substituting water molecules in solvation sphere of polar heads as far as to carbonyl group zone they even contribute to strengthening hydrophobic bonds of lipid hydrocarbon groups. Possessing two proton-donor hydroxyl groups in its structure, 1,2-PD up to a certain concentration ($\approx 10\%$) affects liposomes practically in the same way as EG and glycerol do. But presence of CH_3 -group in α -position provides its capacity for getting embedded into bilayer hydrophobic zone and for contributing to disruptions of lipid-lipid interactions like DMSO and DMFA do.

Diphilic DMSO, DMFA and DMAc also form strong H-bonds, but with proton-donor functional groups ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $=\text{NH}$, $-\text{NH}_2$) of lipid “polar heads” or with water molecules. So they can solvate lipid polar zone. Nevertheless presence of 2 methyl groups in these substances structure (there are 3 methyl groups in DMAc) determines their hydrophobic properties: ability to solve fats (lipids) and to be solved in lipids. These substances are able to become embedded deeply into bilayer hydrocarbon chain zone, to disrupt lipid-lipid interactions in liposomes, in that way to change significantly the probe microenvironment and to compete for the probe-binding sites. The significant changes of the probe fluorescence spectral parameters in the presence of the CPs confirm this assumption.

The hypothetical scheme illustrating FME as well as glycerol and DMFA (which differ the most by their structures and hydrophilic-hydrophobic properties) locations in lipid bilayer is presented in Fig. 8.

Both “acid” lipids (phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, ethanolamine, plasmalogen, phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin *etc.*), polar heads of which comprise proton-donor hydroxyl and amine groups, and “neutral” ones (phosphatidyl choline (39.6%), sphingomyelin (13.1%) *etc.*) are constituents of FSTL liposomes [17]. Herewith “neutral” lipid content in the fowl spermatozoa is more than a half of the the total phospholipid content, and their phospholipid heads practically do not contain proton-donor groups. Probably this is another cause, because of which DMSO and DMFA, unlike glycerol, EG and 1,2-PD, bind with lipid bilayer polar zone to a less extent, but preferentially get embedded into the edge of lipid bilayer non-polar zone by hydrophobic interactions. Notably DMSO, DMFA and DMAc active impacts on lipid-lipid interactions become apparent within the concentration

Поэтому эти концентрации КП (ДМСО 5%, ДМФА и ДМАЦ 7,5%), установленные эмпирически, успешно используются при криоконсервировании спермы петухов [10–13].

На основании полученных данных можно утверждать, что значительный вклад в цитотоксический эффект криопротекторов на сперматозоиды петухов вносит их способность активно воздействовать на гидрофобные взаимодействия мембран, изменять связи и структурные образования, в которых участвуют липиды. Сила влияния веществ на липид-липидные взаимодействия находится в прямой зависимости от их мембранотропных свойств, обусловленных гидрофильно-гидрофобным балансом их молекул. Полученные данные предоставляют также дополнительную информацию о механизме проницаемости веществ в липосомы, а также в клетки, косвенно указывая на преимущественные пути их диффузии через мембраны, учитывая при этом сложность и многообразие их состава и структуры. Например, можно предположить, что для мембранотропных ДМСО, ДМФА и ДМАЦ не исключен и даже предпочтителен липидный путь транспорта в клетку [3, 4, 22].

Выводы

Флуоресцентный зонд ФМЕ является высокочувствительным инструментом исследования степени влияния КП на липидный бислой, дающий возможность оценивать их “пороговую” концентрацию, выше которой КП оказывают повреждающее действие на мембраны.

Активность взаимодействия низкомолекулярных криопротекторов с липосомами из суммарных липидов сперматозоидов петуха определяется гидрофильно-гидрофобным балансом их молекул и имеет концентрационно-зависимый характер.

По степени увеличения влияния на спектральные параметры флуоресценции ФМЕ в липосомах из СЛСП изученные вещества располагаются в ряд: глицерин \leq ЭГ $<$ 1,2-ПД $<$ ДМСО $<$ ДМАЦ \leq ДМФА, что хорошо согласуется с ростом их коэффициента распределения в системе “вода – неполярная фаза”.

В область углеводородных звеньев бислоя наиболее активно внедряются ДМФА, ДМАЦ и ДМСО и вызывают нарушения липид-липидных взаимодействий, 1,2-ПД занимает промежуточное положение. В диапазоне изученных концентраций (до 20%) глицерин и ЭГ не оказывают существенного влияния на состояние липосом, образуя водородные связи в области полярных головок липидов, и, вероятно, упорядочивают структуру бислоя.

range of 5–8%; as the concentrations increase, the impacts strengthen sharply.

It should be noted that the CPs concentrations above-mentioned are “threshold”, application of higher concentrations leads to significant injuries of the fowl spermatozoa membranes during hypothermic storage and freezing. That is why these concentrations of the CPs (5% DMSO, 7.5% DMFA and DMAc) established empirically are used successfully for the fowl sperm cryopreservation [10–13].

Basing on the data obtained one can affirm that CPs’ capacity for active influencing membrane hydrophobic interactions and changing bonds and structural lipid domains contribute greatly to CPs cytotoxic effects on the fowl spermatozoa. Strength of the substances’ influence on lipid-lipid interactions is in a direct dependence on their membrane tropic properties determined by hydrophilic-hydrophobic balance of their molecules. The data obtained also provide additional information on mechanisms of permeability of substances in liposomes as well as in cells indicating circumstantially to preferable ways of their diffusion through membranes and at the same time taking into account complexity and diversity of their compositions and structures. For example, one can assume that lipid transport way into cells is not excluded and even preferable for membrane tropic DMSO, DMFA and DMAc [3, 4, 22].

Conclusions

The fluorescent probe FME is a highly sensitive tool for research in CPs’ influence on lipid bilayer providing possibility of assessing their “threshold” concentrations, over which CPs exert a damaging impact on membranes.

Activity of interactions between low molecular cryoprotectants and liposomes from the fowl spermatozoa total lipids is determined by hydrophilic-hydrophobic balance of their molecules and shows a concentration dependence.

The substances studied are ranked by their increasing influence on FME fluorescence spectral parameters in FSTL liposomes as follows: glycerol \leq EG $<$ 1,2-PD $<$ DMSO $<$ DMAc \leq DMFA, that conforms well with the growth in their distribution coefficients in the system “water – non-polar phase”.

DMFA, DMAc and DMSO embed the most actively in bilayer hydrocarbon group zone and disrupt lipid-lipid interactions; 1,2-PD holds an intermediate position. Within the concentration range investigated (up to 20%) glycerol and EG exert no significant influence on liposome state forming hydrogen bonds in lipid polar heads zone and, probably, regularize bilayer structure.

Литература

1. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Д., Тупс Э. Органические растворители.– М.: Химия, 1968.– 1450 с.
2. Василенко И.А., Тонконог Л.А., Балагуров А.М. и др. Структурная организация фосфолипидов в неводных полярных растворителях // Биол. мембраны.– 1988.– Т. 5, №4.– С. 428–438.
3. Гордієнко О.І., Гордієнко Е.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М. Механізми проникання криопротекторів крізь мембрани еритроцитів // Пробл. криобиології.– 2002.– №4.– С. 9–16.
4. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Механізм проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів // Біофізичний вісник.– 2002.– Вип. 2 (11).– С. 43–47.
5. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук.думка, 1988.– 208 с.
6. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 277 с.
7. Иванов Л. В., Ляпунов Н. А., Цымбал Л. В. и др. Влияние состава двухкомпонентных растворителей на биологические мембраны // Химико-фарм. журнал.– 1988.– №1.– С. 1437–1443.
8. Кейтс М. Техника липидологии.– М.: Мир, 1975.– 322 с.
9. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран.– Л.: Наука, 1981.– С. 195–201.
10. Ліннік Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. II. Криопротекторная активность амидов и диолов // Пробл. криобиології.– 2001.– №4.– С. 43–51.
11. Ліннік Т.П. Фізико-хімічні фактори криошкодженнь і криозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис. ... докт. біол. наук.– Харків, 2003.– 36 с.
12. Ліннік Т.П., Бизикина О.В. Цитотоксичность и криопротекторная активность диолов, амидов и их смесей при криоконсервировании спермы петухов // Биофизика живой клетки.– 2003.– Т. 7.– С. 42–49.
13. Ліннік Т.П. Механизм цитотоксического и криозащитного действия проникающих криопротекторов – амидов и диолов – при криоконсервировании спермы птиц // Цитология.– 2004.– Т. 46, №9.– С. 811–812.
14. Протиева М. Очистка растворителей // В кн.: Лабораторная техника органической химии.– М.: Мир, 1966.– С. 591–615.
15. Шахпоронов М.И. Введение в современную теорию растворов.– М.: Высш. шк., 1976.– 296 с.
16. Bondar O.P., Pivovarenko V.G., Rowe E.S. Flavonols – new fluorescent membrane probes for studying the interdigitation of lipid bilayers // Biochim. Biophys. Acta.– 1998.– Vol. 1369, N1.– P. 119–130.
17. Darin-Bennet A., Poulos A., White I.G. The phospholipids and phospholipids-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa // J. Reprod. Fert.– 1974.– Vol. 41.– P. 471–474.
18. Klymchenko A. S., Duportail G., Demchenko A. P., Mely Y. Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers // Biophys. J.– 2004.– Vol. 86, N5.– P. 2929–2941.
19. Ormson S. M., Brown R. G., Vollmer F., Rettig W. Switching between charge and proton-transfer emission in the excited state of a substituted 3-hydroxyflavone // J. Photochem. Photobiol. A: Chem.– 1994.– Vol. 81, N2.– P. 65–72.
20. Pivovarenko V.G., Wroblewska A., Blazejewski J. The effect of hydrogen bonding interactions between 2-[4-(dimethylamino)phenyl]-3-hydroxy-4H-chromene-4-one in the ground and excited states and dimethylsulfoxide or methanol on electronic absorption and emission transitions // J. Molec. Struct.– 2004.– Vol. 708, N1–3.– P. 175–181.
21. Shynkar V.V., Klymchenko A. S., Mely Y. et al. Anion formation of 4'-(dimethylamino)-3-hydroxyflavone in phosphatidyl-

References

1. Weissberger A., Proskauer E., Riddick D., Toops E. Organic solvents.– Moscow: Khimiya, 1968.– 1450 p.
2. Vasilenko I.A., Tonkonog L.A., Balagurov A.M. et al. Structural organisation of phospholipids in non-water polar solvents // Biol. Membrany.– 1988.– Vo. 5, N4.– P. 428–438.
3. Gordienko O.I., Gordienko E.A., Linnik T.P., Kompaniets A.M. Mechanisms of cryoprotectant permeation via erythrocytes membranes // Problems of Cryobiology.– 2002.– N4.– P. 9–16.
4. Gordiyenko O.I., Linnik T.P. Penetration mechanisms of non-electrolytes of diol nature through erythrocyte membranes // Biophysical Bulletin.– 2002.– Issue 2 (11).– P. 43–47.
5. Gulevskiy A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Membrane barrier properties of biomembranes at low temperatures.– Kiev: Nauk. dumka, 1988.– 208 p.
6. Dobretsov G.Ye. Fluorescent probes in cell, membrane and lipoprotein researches.– Moscow: Nauka, 1989.– 277 p.
7. Ivanov L.V., Lyapunov N.A., Tsybal L.V. et al. Influence of composition of two-component solvents on biological membranes // Khimiko-Farm. Zhurnal.– 1988.– N1.– P. 1437–1443.
8. Kates M. Lipidology techniques.– Moscow: Mir, 1975.– 322 p.
9. Kreps E.M. Lipids of cell membrane.– Leningrad: Nauka, 1981.– P. 195–201.
10. Linnik T.P., Bizikina O.V. Fowl sperm cryopreservation. II. Amide and diol cryoprotective activity // Problems of Cryobiology.– 2001.– N4.– P. 43–51.
11. Linnik T.P. Physico-chemical factors of cryoinjuries and cryoprotection of the fowl spermatozoa during low temperature preservation cycle: Author's abstract of the thesis of Doctor of Biological Sciences.– Kharkov, 2003.– 36 p.
12. Linnik T.P., Bizikina O.V. Cytotoxicity and cryoprotective activity of diols, amides and their mixtures during cryopreservation of the fowl sperm // Biofizika Zhivoy Kletki.– 2003.– Vol. 7.– P. 42–49.
13. Linnik T.P. Mechanism of cytotoxic and cryoprotective action of penetrating cryoprotectors – amides and diols – during cryopreservation of bird sperm // Tsitologiya.– 2004.– Vol. 46, N9.– P.811–812.
14. Protiva M. Purification of solvents // In: Laboratory techniques of organic chemistry.– Moscow: Mir, 1966.– P. 591–615.
15. Shakhporonov M.I. Introduction to the modern theory of solutions.– Moscow: Vysshaya shkola, 1976.– 296 p.
16. Bondar O.P., Pivovarenko V.G., Rowe E.S. Flavonols – new fluorescent membrane probes for studying the interdigitation of lipid bilayers // Biochim. Biophys. Acta.– 1998.– Vol. 1369, N1.– P. 119–130.
17. Darin-Bennet A., Poulos A., White I.G. The phospholipids and phospholipids-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa // J. Reprod. Fert.– 1974.– Vol. 41.– P. 471–474.
18. Klymchenko A. S., Duportail G., Demchenko A. P., Mely Y. Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers // Biophys. J.– 2004.– Vol. 86, N5.– P. 2929–2941.
19. Ormson S. M., Brown R. G., Vollmer F., Rettig W. Switching between charge and proton-transfer emission in the excited state of a substituted 3-hydroxyflavone // J. Photochem. Photobiol. A: Chem.– 1994.– Vol. 81, N2.– P. 65–72.
20. Pivovarenko V.G., Wroblewska A., Blazejewski J. The effect of hydrogen bonding interactions between 2-[4-(dimethylamino)phenyl]-3-hydroxy-4H-chromene-4-one in the ground and excited states and dimethylsulfoxide or methanol on electronic absorption and emission transitions // J. Molec. Struct.– 2004.– Vol. 708, N1–3.– P. 175–181.
21. Shynkar V.V., Klymchenko A. S., Mely Y. et al. Anion formation of 4'-(dimethylamino)-3-hydroxyflavone in phosphatidyl-glycerol vesicles induced by HEPES buffer: a steady-state and time-resolved fluorescence investigation // J. Phys. Chem. B.– 2004.– Vol. 108, N48.– P. 18750–18755.

- glycerol vesicles induced by HEPES buffer: a steady-state and time-resolved fluorescence investigation // J. Phys. Chem. B.– 2004.– Vol. 108, N48.– P. 18750–18755.
22. *Toon M.R., Solomon A.K.* Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interactions of hydrophilic alcohols and their effect on permeation // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– Vol. 1022, N1.– P. 57–71.
22. *Toon M.R., Solomon A.K.* Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interactions of hydrophilic alcohols and their effect on permeation // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– Vol. 1022, N1.– P. 57–71.

Accepted in 23.02.2010

*Поступила 23.02.2010
Рецензент В.Д. Зинченко*