

## Исследование влияния криопротекторов на липосомы из суммарных липидов сперматозоидов собаки

UDC547.42:599.742.1-146.311

T.P. LINNIK, T.S. DYUBKO\*, M.I. YEGOROV, V.G. PIVOVARENKO

## Study of the Effect of Cryoprotectants on Liposomes of Canine Spermatozoa Total Lipids

Исследован механизм взаимодействия криопротекторов (КП): этиленгликоля (ЭГ), глицерина и N,N-диметилформамида (ДМФА) с липидным бислоем липосом, сформированных из суммарных липидов сперматозоидов собаки методом флуоресцентной спектроскопии с применением нового флуоресцентного зонда флавонольной природы – 3-гидрокси-4'-(N,N-диметиламино)флавона (ФМЕ). Установлено, что из изученных КП (глицерин, ЭГ, ДМФА), наибольшее влияние на форму спектра флуоресценции ФМЕ, связанного с липидным бислоем, оказывает ДМФА. Степень влияния исследованных КП на липосомы определяется гидрофобно-гидрофильным балансом их молекул. ДМФА преимущественно воздействует на липидный бислой путем гидрофобного взаимодействия, а глицерин и ЭГ – на гидратный слой полярных “головак” фосфолипидов, образуя межмолекулярные водородные связи.

**Ключевые слова:** собака, сперматозоиды, липиды, криопротекторы, флуоресцентный зонд, ФМЕ.

Досліджено механізм взаємодії криопротекторів (КП): етиленгліколю (ЕГ), гліцерину і N,N-диметилформаміду (ДМФА) з ліпідним бішаром ліпосом, які утворені з сумарних ліпідів сперматозоїдів собаки методом флуоресцентної спектроскопії із застосуванням нового флуоресцентного зонда флавонольної природи – 3-гідрокси-4'-(N,N-диметиламіно)флавоно (ФМЕ). Встановлено, що з досліджених КП (гліцерин, ЕГ, ДМФА) найбільший вплив на форму спектра флуоресценції, що зв'язаний з ліпідним бішаром ліпосом ФМЕ, спричиняє ДМФА. Ступінь впливу досліджених КП на ліпосоми зумовлюється гідрофобно-гідрофільним балансом їх молекул. ДМФА переважно впливає на ліпідний бішар шляхом гідрофобної взаємодії, а гліцерин і ЕГ – на гідратний шар полярних “голівків” фосфоліпідів, які утворюють міжмолекулярні водневі зв'язки.

**Ключові слова:** собака, сперматозоїди, ліпіди, криопротектори, флуоресцентний зонд, ФМЕ.

The mechanism of interaction between the cryoprotective agents (CPAs): ethylene glycol (EG), glycerol and N,N-dimethylformamide (DMFA) with lipid bilayer of liposomes formed from total lipids of canine spermatozoa by fluorescent spectroscopy using new fluorescent probe of flavonoid origin: 3-hydroxy-4'-(N,N-dimethylamine)flavon (FME). It has been established that among the studied CPAs (glycerol, EG, DMFA) the highest effect on the form of FME fluorescence spectrum associated to lipid bilayer is rendered by DMFA. The effect rate of the studies CPAs on liposomes is determined by hydrophobic-hydrophilic balance of their molecules. DMFA predominantly affects lipid bilayer by hydrophobic interaction, and glycerol and EG mainly influence hydrate layer of polar “heads” of phospholipids by forming intermolecular hydrogen bonds.

**Key-words:** dog, spermatozoa, lipids, cryoprotectants, fluorescent probe, FME.

Существуют несколько методов криоконсервирования сперматозоидов собаки (СС) [9, 10, 12, 13, 17, 21], отличающихся условиями подготовки клеток и режимами охлаждения в присутствии одного криопротектора – глицерина. Однако установлено, что глицерин не является оптимальным криопротектором (КП) для криоконсервирования СС [9, 15, 17-20], поскольку негативно влияет на клеточные мембраны.

Предприняты попытки исследовать криозащитную активность других КП, в частности этиленгликоля (ЭГ) и диметилсульфоксида (ДМСО), при криоконсервировании СС [13, 17]. Установлено существенное повреждающее действие этих веществ на мембраны СС, однако при изучении данного вопроса авторы не пришли к единому мнению.

There are several cryopreservation methods for canine sperm (CS)[9, 10, 12, 13, 17, 21] differing by the protocols of cell preparing and cooling regimens in the presence of glycerol as a cryoprotectant. However it is established that glycerol is not optimal cryoprotective additive (CPA) for CS cryopreservation [9, 15, 17-20], since it negatively affects cell membranes.

There were attempts to study cryoprotective activity of other CPA in particular ethylene glycol (EG) and dimethylsulfoxide (DMSO) during CS cryopreservation [13, 17]. Significant damaging effect on CS membranes was found, however when studying this question the authors' opinion did not coincide. Till now the molecular mechanisms of CPAs effect on CS during freeze-thawing have not been elucidated yet [12, 18, 19], therefore the choice of effective CPA is still actual.

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко

\* 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: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Kiev National University named by Taras Shevchenko, 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: cryo@online.kharkov.ua

До настоящего времени не выяснены молекулярные механизмы влияния КП на СС в процессе замораживания-оттаивания [12, 18, 19], поэтому выбор эффективных КП остается актуальным.

Перспективным направлением является изучение молекулярных механизмов взаимодействия КП с клеточными мембранами с помощью флуоресцентных зондов [2]. Поскольку для СС, как и для сперматозоидов других млекопитающих, характерны сложная морфология, неоднородная структура цитоскелета и гетерогенная цитоплазматическая мембрана, отличающаяся составом и свойствами на разных участках [5], то интерпретация данных, полученных методом флуоресцентных зондов на целых клетках, достаточно сложна. В связи с этим целесообразно применение модельных систем, например липосом [3].

Цель настоящей работы – исследование влияния КП: ЭГ, N,N-диметилформамида (ДМФА), глицерина на искусственные мембраны (липосомы), сформированные из суммарных липидов СС методом флуоресцентных зондов.

### Материалы и методы

Сперму 3-х клинически здоровых кобелей породы ротвейлер получали при комнатной температуре (20°C) с помощью массажа предстательной железы в присутствии эстральной самки [7]. Концентрацию сперматозоидов определяли визуально под микроскопом “Биолар” (Польша). Для получения суммарных липидов СС эякуляты объединяли и отмывали от спермальной плазмы трехкратным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Липиды экстрагировали из СС по модифицированной методике [4].

Однослойные липосомы со средним диаметром 80-100 нм получали из предварительно растворенных в 10%-м растворе спирта суммарных липидов СС инъекционным методом с последующим диализом против физиологического раствора с 5 мМ натрий-фосфатным буфером [2]. Концентрация липидов в опытах составляла 4,7 мг/мл.

Криопротекторы марки “х.ч.” или “ч.д.а.” (“Реакхим”, Россия) дополнительно очищали. Глицерин и ДМФА подвергали двукратной вакуумной перегонке, ЭГ очищали тем же способом, но с предварительной обработкой активированным углем марки “А” [1]. Концентрацию КП выражали в объемных процентах.

В работе использовали новый флуоресцентный зонд 3-гидрокси-4'--(N,N-диметиламино)флавонон (ФМЕ) класса гидроксифлавонолов [11] (рис. 1), который применяли в виде спиртового раствора ( $7 \times 10^{-4}$  М), добавляли в суспензию липосом до конечной концентрации  $3,6 \times 10^{-6}$  М за 15 мин до начала измерений.

Perspective direction is the studying of molecular mechanisms of CPAs interaction with cell membranes using fluorescent probes [2]. Since for CS the same as for all other mammalian spermatozoa a complicated morphology, non-uniform cytoskeletal structure and heterogenous cytoplasm membrane, differing by the composition and properties at different sites [5], are characteristic, then the interpreting of data obtained by means of fluorescent probes in the solid cells is quite difficult. Herewith it is expedient to apply model systems, for instance liposomes [3].

The research aim was to investigate the effect of CPAs: EG, N,N-dimethylformamide (DMFA), glycerol, on artificial membranes (liposomes) formed from total lipids of CS by means of fluorescent probes.

### Materials and methods

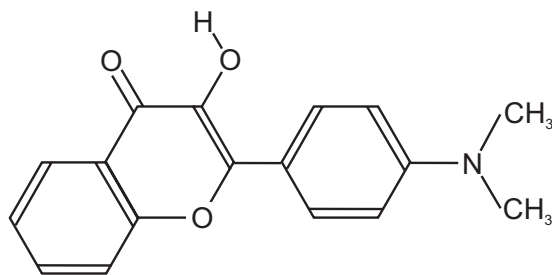
The sperm from 3 clinically healthy male dogs of Rottweiler breed were obtained at room temperature (20°C) by means of prostate massage in presence of estrum female [7]. Spermatozoa concentration was visually found with microscope (“Biolar”, Poland). To obtain total CS lipids the ejaculates were joined and washed-out from sperm plasma with three-fold centrifugation at 3000 rot/min for 10 min. Lipids were extracted from CS according to the modified method [4].

Monolayer liposomes with average diameter of 80-100 nm were obtained from preliminary dissolved in 10% alcohol solution of total CS lipids by injection method with following dialysis vs. physiological solution with 5 mM sodium-phosphate buffer [2]. Lipid concentration in the experiments made 4.7 mg/ml.

Cryoprotectants of “chemically pure” and “pure for analysis” grade (“Reakhim”, Russia) were additionally purified. Glycerol and DMFA were subjected to two-fold vacuum distillation, EG was purified in the same manner but using a preliminary treatment with activated carbon of grade “A” [1]. CPAs concentration was expressed in % (v/v).

In the research we used 3-hydroxy-4'--(N,N-dimethylamino)flavon (FME), the new fluorescent probe of hydroxyflavonol class [11] (Fig. 1), which was used as an alcohol solution ( $7 \times 10^{-4}$  M) and added to suspension of liposomes up to final concentration of  $3.6 \times 10^{-6}$  M 15 min prior to the beginning of the measurements.

Fluorescence spectra were recorded with spectrofluorimeter (Cary Eclipse, Varian, USA) with an automated correction. The width of entrance and exit slits of monochromators made 5 nm. Fluorescence spectra of FME were excited with the light of wave length of 405 nm and registered in the area of 410-650 nm. The probe excitation spectra were recorded at the wave lengths of 500 and 567 nm in the areas of maxima of fluorescence bands of its normal (N\*) and tautomeric



**Рис. 1.** Структурная формула ФМЕ.  
**Fig. 1.** Structural formula of FME.

Спектры флуоресценции регистрировали 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 длинах волн 500 и 567 нм в областях максимумов полос флуоресценции его нормальной ( $N^*$ ) и таутомерной ( $T^*$ ) форм. Все спектральные измерения проводили в стандартных кварцевых кюветках  $1 \times 1 \times 3$  см при температуре  $20^\circ\text{C}$ .

Спектральные кривые анализировали по программе "Microcal Origin 6.0". Положение  $N^*$ -полосы флуоресценции ФМЕ уточняли с помощью вторых производных спектров флуоресценции. При статистической обработке результатов использовали метод Стьюдента с программным пакетом "Statgraf".

### Результаты и обсуждение

Флуоресцентный зонд ФМЕ при электронном возбуждении способен изомеризоваться, образуя  $N^*$ - и  $T^*$ - формы. Данная реакция обусловлена внутримолекулярным фотопереносом протона [11, 14]. Каждая из форм обладает флуоресцентными свойствами, поэтому в спектре ФМЕ можно наблюдать полосы зелено-голубой ( $N^*$ -форма) и желтой эмиссии ( $T^*$ -форма). Положение и интенсивность этих полос эмиссии зависят от химической структуры зонда, в частности от способности образовывать межмолекулярные водородные связи, а также от полярности и вязкости микроокружения. В липидном бислое ФМЕ располагается в области фосфатных головок и начале глицерольных остатков липидов [14, 16]. Высокая восприимчивость этого красителя к параметрам микроокружения обусловила его применение в исследовании мембран различных клеток.

В физиологическом и водном растворах КП флуоресценция ФМЕ тушится водой, при этом спектр флуоресценции представлен одной полосой. При связывании зонда с липидным бислоем липосом, образованных из суммарных липидов СС, наблюдаются многократное возрастание интенсив-

( $T^*$ ) форм. All spectral measurements were done in standard quartz cuvettes  $1 \times 1 \times 3$  cm at  $20^\circ\text{C}$ .

Spectral curves were analyzed according to "Microcal Origin 6.0" software. The position of  $N^*$ -FME fluorescence band was specified using second derivatives of fluorescent spectra. During statistical processing of the results the Student's method with "Statgraph" software was used.

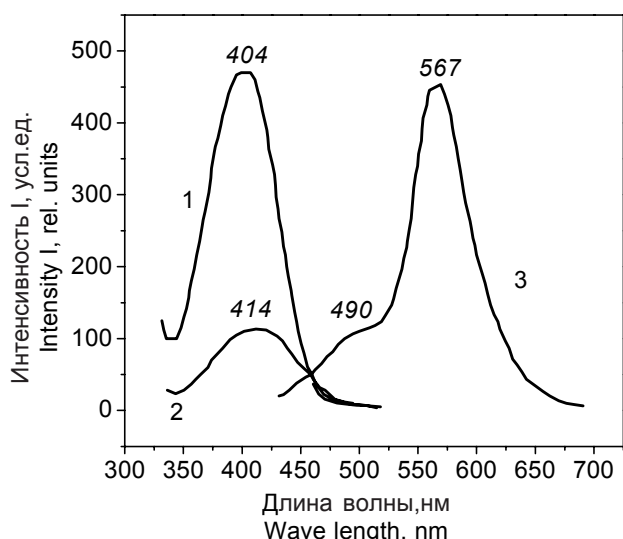
### Results and discussion

FME fluorescent probe at electron excitation is capable of isomerisation by forming  $N^*$  and  $T^*$  forms. This reaction is stipulated with intramolecular photo-transfer of a proton [11, 14]. Each of the forms has fluorescent properties therefore in FME spectrum may be observed the bands of green-blue ( $N^*$  form) and yellow ( $T^*$  form) emission. The position and intensity of these emission bands depend on chemical structure of the probe, in particular on the ability to form intermolecular hydrogen bonds, as well as on the polarity and viscosity of microenvironment. In lipid bilayer FME is localized in the area of phosphate heads and the edge of lipid glycerol residues [14, 16]. High susceptibility of this dye to microenvironment parameters stipulated its application in the study of membranes of various cells.

In physiological and aqueous solutions of CPAs the FME fluorescence is quenched by water, herewith the fluorescence spectrum is represented with one band. During binding of the probe with lipid bilayer of liposomes formed from total lipids of CS multiple rise in the intensity of fluorescence and change in the shape of spectrum curve are observed, where long wave  $T^*$  fluorescence band with the maximum at  $567 \pm 1$  and short wave  $N^*$  band about  $490 \pm 2$  nm (Fig. 2) are distinctly observed. The value of intensity ratio of FME's  $N^*$  and  $T^*$  fluorescence bands (found as  $I_{490}/I_{567}$  ratio) in liposomes of this type makes  $0.24 \pm 0.01$  in combination with short wave position of  $N^*$  band is stipulated by the presence in liposomes of significant cholesterol amount and formation of resistant complexes between cholesterol and some kinds of phospholipids [20].

The obtained results have shown that all studied CPAs reduce the fluorescence quantum yield of FME, bound with lipid bilayer however they affect in different extent the intensity and position of  $N^*$  and  $T^*$  fluorescence bands. Fig. 3 demonstrates the example of FME titration by DMFA in liposomes formed from total CS lipids. Fig. 4 shows the normalized spectra of FME fluorescence during titration differing most of all on their chemical structure CPAs: glycerol and DMFA.

In investigated concentration area of the glycerol renders the least effect on the shape of spectrum of FME fluorescence: spectrum keeps two-band structure when increasing the glycerol content in the medium up to 14% (Fig. 4, a). Similar effect on FME fluorescence spectrum is also rendered by EG. In contrast



**Рис. 2.** Спектры возбуждения (1, 2) и флуоресценции (3) зонда ФМЕ в липосомах из суммарных липидов СС:  $\lambda_{\text{рег}}=567$  нм;  $\lambda_{\text{рег}}=500$  нм;  $\lambda_{\text{возб}}=405$  нм.

**Fig. 2.** Spectra of excitation (1, 2) and fluorescence (3) of FME probe in liposomes from total CS lipids:  $\lambda_{\text{рег}}=567$  нм;  $\lambda_{\text{рег}}=500$  нм;  $\lambda_{\text{xc}}=405$  нм.

ности флуоресценции и изменение формы кривой спектра, в котором отчетливо проявляются длинноволновая T\*-полоса флуоресценции с максимумом при  $567 \pm 1$  нм и коротковолновая N\*-полоса около  $490 \pm 2$  нм (рис. 2). Величина отношения интенсивностей N\*- и T\*-полос флуоресценции ФМЕ (определяемого как соотношение  $I_{490}/I_{567}$ ) в липосомах данного вида составляет  $0,24 \pm 0,01$ . Вероятно, столь низкая величина  $I_{490}/I_{567}$  в сочетании с коротковолновым положением N\*-полосы обусловлена присутствием в липосомах значительного количества холестерина и образованием устойчивых комплексов между холестерином и некоторыми видами фосфолипидов [20].

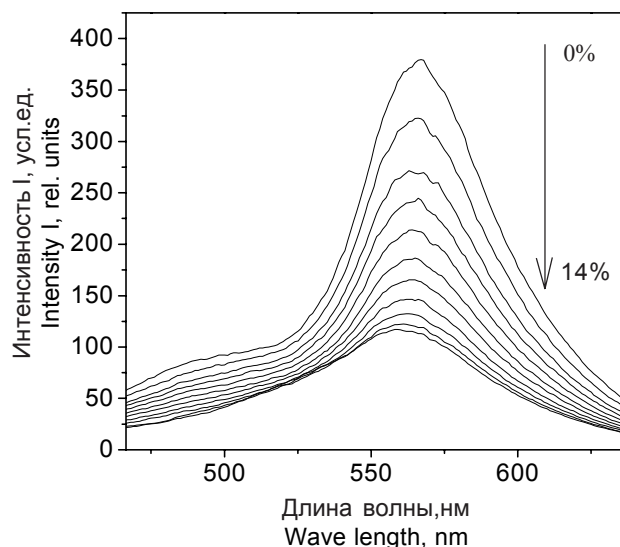
Полученные результаты показали, что все исследованные КП снижают квантовый выход флуоресценции ФМЕ, связанного с липидным бислоем, однако они в различной степени влияют на интенсивность и положение N\*- и T\*-полос флуоресценции. На рис. 3 представлен пример титрования диметилформамидом ФМЕ в липосомах, сформированных из суммарных липидов СС. На рис. 4 приведены нормированные спектры флуоресценции ФМЕ при титровании наиболее отличающимися по своей химической структуре КП – глицерином и ДМФА.

В исследованной области концентраций глицерин оказывает наименьшее влияние на форму спектра флуоресценции ФМЕ: спектр сохраняет двухполосную структуру при увеличении содержания глицерина в среде до 14% (рис. 4, а). Сходное влияние на спектры флуоресценции ФМЕ оказывает также ЭГ. В отличие от этих КП влияние

to these CPAs the DMFA effect is strengthened with a rise in its concentration in the solution (Fig. 4b). Herewith the FME spectrum shape approaches to single-band and its maximum shifts towards short wave side by  $2.5 \pm 0.5$  nm at 14% DMFA content in the medium. Similar changes of the shape and localization of FME fluorescence spectrum bands are characteristic for the probe being in the solution.

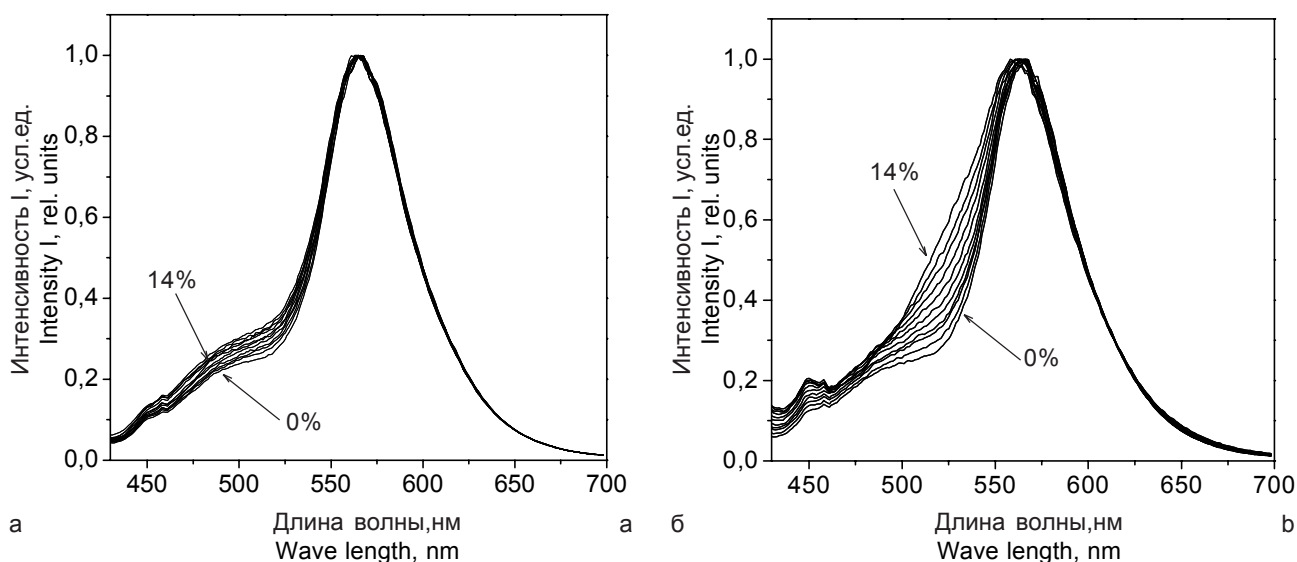
Additional information on the effect of CPAs on lipid bilayer may be obtained from probe excitation spectra (Fig. 5). Insignificant changes of the position and half-width of FME excitation spectra bands after introduction of glycerol and EG testify to the fact that probe microenvironment in the presence of these CPAs alters slightly. In DMFA presence there is observed slight long wave shift of excitation spectra bands (by  $\sim 2.5$  nm) as well as their broadening speaking about the rise in heterogeneity of FME microenvironment in membranes. The obtained data enable the supposing that glycerol and EG affect only hydrate layer of liposomes surrounding the area of lipid polar heads in contrast to them DMFA is capable of penetrating deeper competing with FME for the site of binding in liposomes.

Since FME is capable of embedding into lipid bilayer of into both the area of polar heads and the edge of lipid carbohydrate tails, it is important to estimate the effect of the studied CPAs on the ratio of  $I_{490}/I_{567}$ , reflecting polarity and heterogeneity of probe environment in membranes. In the presence of all the studied CPAs there is observed the growth of  $I_{490}/I_{567}$  ratio the most manifested in case of DMFA (Fig. 6). The data on the effect of CPAs under 14% concentration on the ratio of N\* and T\* bands of FME fluorescence in lipid bilayer are presented in the Table: glycerol and



**Рис. 3.** Титрование встроенного в липосомы ФМЕ возрастающими концентрациями ДМФА.

**Fig 3.** Titration of FME embedded into liposomes with increasing DMFA concentrations.



**Рис. 4.** Влияние глицерина (а) и ДМФА (б) в концентрациях 0-14% на нормированные спектры флуоресценции ФМЕ в липосомах из суммарных липидов СС.

**Fig. 4.** Effect of glycerol (a) and DMFA (b) under concentrations of 0-14% on leveled FME fluorescence spectra in liposomes from total CS lipids.

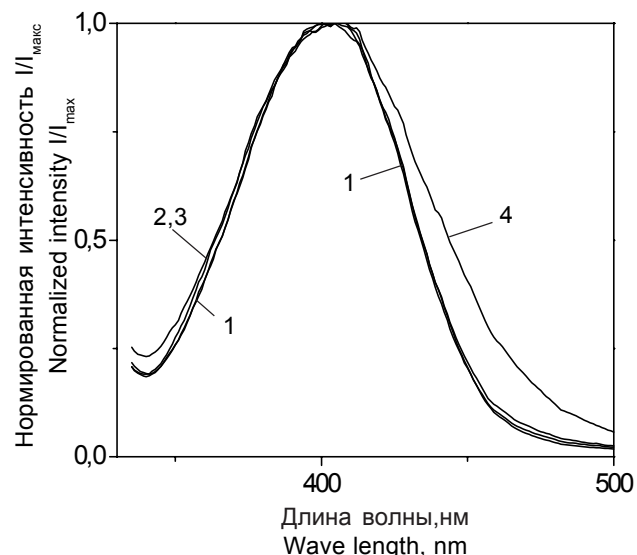
ДМФА усиливается по мере увеличения его концентрации в растворе (рис. 4, б). При этом форма спектра ФМЕ приближается к однополосной, а его максимум сдвигается в коротковолновую сторону на  $2,5 \pm 0,5$  нм при содержании ДМФА в среде 14%. Подобные изменения формы и положения полос спектра флуоресценции ФМЕ характерны для зонда, находящегося в растворе.

Дополнительную информацию о влиянии КП на липидный бислой можно получить из спектров возбуждения зонда (рис. 5). Незначительные изменения положения и полуширины полос спектров возбуждения ФМЕ после введения глицерина и ЭГ свидетельствуют о том, что микроокружение зонда в присутствии этих КП изменяется несущественно. В присутствии ДМФА наблюдаются небольшое длинноволновое смещение полос спектров возбуждения (на  $\sim 2,5$  нм) и их уширение, свидетельствующее о повышении гетерогенности микроокружения ФМЕ в мембранах. На основании полученных данных можно предположить, что глицерин и ЭГ влияют только на гидратный слой липосом, окружающий область полярных головок липидов, в отличие от них ДМФА способен проникать глубже, конкурируя с ФМЕ за места связывания в липосомах.

Поскольку ФМЕ способен встраиваться в липидный бислой не только в область полярных “головок”, но и в область начала углеводородных “хвостов” липидов, важно оценить влияние изучаемых КП на отношение  $I_{490}/I_{567}$ , отражающее полярность и гетерогенность микроокружения зонда в мембранах. В присутствии всех исследованных КП наблюдается рост отношения  $I_{490}/I_{567}$ , наиболее

EG increase the value of  $I_{490}/I_{567}$  in respect to the control by 20 and 24%, correspondingly and DMFA by 44%. These data also confirm the fact that DMFA actively interacts with liposomes by significantly changing the shape and position of FME fluorescence spectrum bound with artificial membrane.

Additional criterion of the probe microenvironment properties in lipid bilayer is the position of fluorescence bands. The position of T\* form of the probe is shifted towards short-wave area by 2 nm approximately with



**Рис. 5.** Влияние КП в концентрации 14% на нормированные спектры возбуждения флуоресценции ФМЕ в липосомах из суммарных липидов СС: 1 – контроль; 2 – глицерин; 3 – ЭГ; 4 – ДМФА.

**Fig. 5.** Effect of 14% CPAs on normalized excitation spectra of  $I_{490}/I_{567}$  FME fluorescence in liposomes form total CS lipids: 1 – control; 2 – glycerol; 3 – EG; 4 – DMFA.

выраженный в случае ДМФА (рис.6). Данные о влиянии КП в концентрации 14% на отношение N\*- и T\*-полос флуоресценции ФМЕ в липидном бислое приведены в таблице: глицерин и ЭГ повышают величину  $I_{490}/I_{567}$  по отношению к контролю на 20 и 24 % соответственно, а ДМФА – на 44 %. Эти данные также подтверждают, что ДМФА активно взаимодействует с липосомами, значительно изменяя форму и положение полос спектра флуоресценции ФМЕ, связанного с искусственной мембраной.

Дополнительным критерием свойств микроокружения зонда в липидном бислое является положение полос флуоресценции. Положение T\*-формы зонда смещается в коротковолновую область приблизительно на 2 нм при увеличении концентрации глицерина и ЭГ до 14 %, а в случае ДМФА – на 5 нм (рис. 7, б). В то же время положение N\*-полосы при возрастающих концентрациях КП (глицерин, ЭГ и ДМФА) до 9% практически не изменяется (в пределах ошибки эксперимента) и резко сдвигается в длинноволновую сторону при концентрациях ДМФА более 9% (рис.7, а). Взаимное сближение положения N\*- и T\*-полос флуоресценции ФМЕ в липидном бислое, наблюдаемое в присутствии ДМФА при концентрации более 9%, возможно свидетельствует об увеличении содержания в окружении зонда доноров водородной связи (молекул воды или самого криопротектора) [2, 11]. Вероятно, при этих концентрациях начинает проявляться заметное “разупорядочивающее” влияние ДМФА на структуру липосом, приводящее к увеличению количества молекул воды или криопротектора в начале неполярной области липидного бислоя. Возможна конкуренция ДМФА с ФМЕ за места связывания на мембране, при этом криопротектор частично вытесняет зонд из липосом в раствор.

Учитывая, с одной стороны, различия липофильности исследуемых КП (коэффициенты распределения в системе вода-октанол составляют 0,005; 0,040; 0,233 для глицерина, ЭГ и ДМФА соответственно [5]), можно предположить, что наиболее “гидрофобный” ДМФА (по сравнению с глицерином и ЭГ) способен к гидрофобному взаимодействию с липидами бислоя. С другой стороны, все исследуемые КП образуют сильные водородные связи с молекулами воды и могут влиять на структуру не только свободной, но и связанной с полярными головками липидов (гидратной) воды [5]. Значения дипольного момента у глицерина – 2,56, ЭГ – 2,28, ДМФА – 3,86 Д. Таким образом, по полярности эти вещества можно расположить в ряд: ДМФА>глицерин>ЭГ. Из исследованных КП только в молекуле ДМФА не имеется протондонорных центров, в то время как глицерин имеет наибольшее

Влияние КП (14%) на отношение N\*- и T\*- полос флуоресценции ФМЕ в липосомах из суммарных липидов СС

Effect of CPAs (14%) on the ratio of N\* and T\* bands of FME fluorescence in liposomes from total CS lipids

КП Cryoprotectant	$I_{490}/I_{567}$	Изменение по отношению к контролю, % Change vs. the control, %
ГЛ Glycerol	0,30±0,02	20
ЭГ EG	0,31±0,02	24
ДМФА DMFA	0,36±0,01	44

the increase in concentrations of glycerol and EG up to 14% and by 5% in case of DMFA (Fig. 7,b). At the same time the position of N\* band under increasing concentrations of CPAs (glycerol, EG and DMFA) up to 9% practically did not change (within error of experiment) and sharply shifted towards long wave side under DMFA concentrations, exceeding 9% (Fig. 7, a). Mutual approaching of the positions of FME N\* and T\* fluorescence bands in lipid bilayer observed in the presence of DMFA under the concentration higher than 9% likely testifies to an increase in the content of hydrogen bond donor (either water molecules, or cryoprotectant itself) in probe environment [2, 11]. Under these concentrations a remarkable DMFA “disordering” effect on the structure of liposomes, resulting in the rise of amount of water molecules or

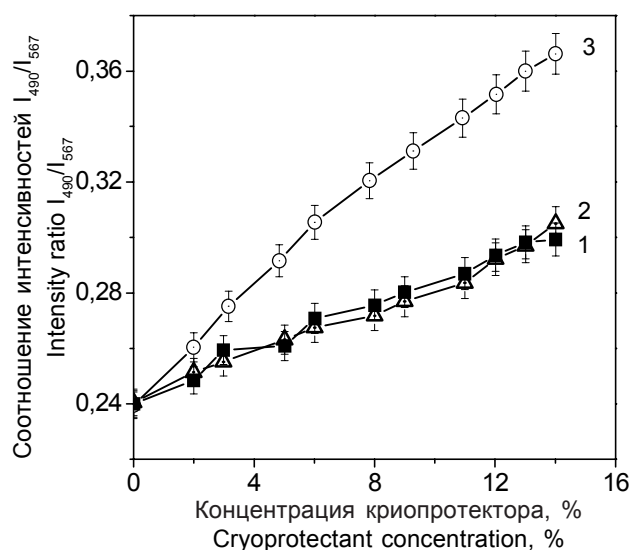


Рис. 6. Влияние КП на отношение полос флуоресценции ФМЕ  $I_{490}/I_{567}$  в липосомах из суммарных липидов СС: 1 – глицерин; 2 – ЭГ; 3 – ДМФА.

Fig. 6. Effect of CPAs in respect of FME fluorescence bands in liposomes form total CS lipids: 1 – glycerol; 2 –EG; 3 – DMFA.

количество протондонорных центров и потенциально способен к образованию 9-ти водородных связей. Следует отметить, что ДМФА может образовывать Н-связи исключительно с протондонорными функциональными группами ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $=\text{NH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ) липидов или молекулами воды.

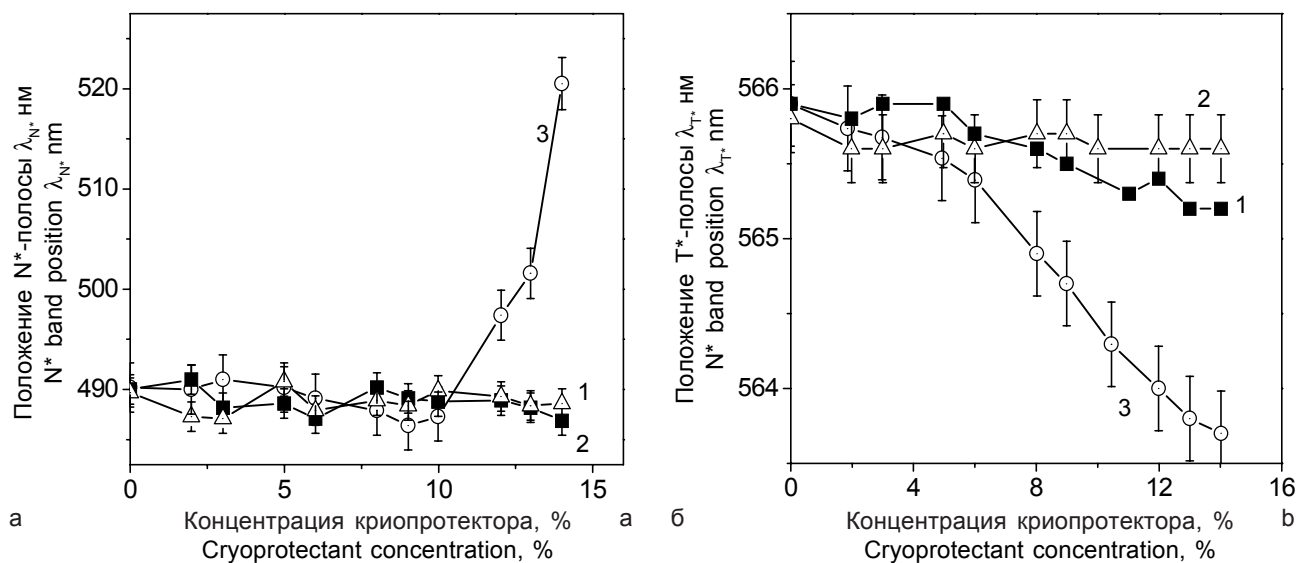
В составе суммарных липидов СС, из которых сформированы липосомы, преобладают фосфатидилхолин (ФХ) ( $27,5 \pm 1,0\%$ ), фосфатидилэтанолламин (ФЭ) ( $20,1 \pm 0,9\%$ ), в меньшей степени представлены сфингомиелин (СМ) ( $18,3 \pm 2,0\%$ ) и этаноламин плазмалоген (ЭП) ( $15,3 \pm 0,9$ ) [9]. Известно, что СМ и ФХ – нейтральные липиды, а ФЭ и ЭП – “кислые” [8]. Содержание всех нейтральных липидов в СС составляет 49,4% от общего количества фосфолипидов, а их фосфолипидные головки практически не содержат протондонорных групп. Поэтому можно предположить, что ДМФА в меньшей степени связывается с полярной областью липидного бислоя липосом и преимущественно встраивается в начало его неполярной области путем гидрофобного взаимодействия. Однако наличие “кислых” липидов (35,4%), имеющих протондонорные группы, не исключает возможности образования водородных связей ДМФА с ними. Поэтому, даже при высоких концентрациях ДМФА, сохраняется флуоресценция ФМЕ, связанного с липосомами, что подтверждает лишь частичное вытеснение зонда в раствор под влиянием этого КП.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ДМФА оказывает наибольшее воздействие на липидный бислой липосом. По изменению положения  $N^*$ - и  $T^*$ -полос зонда и интенсивности их флуоресценции после введения ДМФА в суспензию липосом можно предположить, что

cryoprotectant is getting manifested on the edge of non-polar lipid bilayer area. The competition between DMFA and FME is possible because of the binding site on membrane, herewith cryoprotectant partially displaces probe from liposomes into the solution.

Taking into account from one hand the differences in lipophilicity of the studied CPAs (distribution coefficients in water-octanol system makes 0.005; 0.040; 0.233 for glycerol, EG and DMFA, correspondingly [5]) it may be supposed that as the most “hydrophobic” DMFA (if compared with glycerol and EG) is capable of hydrophobic interaction with bilayer lipids. Form another hand, all studied CPAs form strong hydrogen bonds with water molecules and may affect the water structure both free one and bound with lipid polar heads [5]. Values of dipole moment in glycerol are 2.56, 2.28 for EG and 3.86 for DMFA. Thus on polarity these substances may be placed in the row:  $\text{DMFA} > \text{glycerol} > \text{EG}$ . From the studied CPAs only in the molecule of DMFA there are no proton-donor centers, whilst as glycerol has a big number of proton-donor centers and potential ability of forming 9 hydrogen bonds. It should be noted that DMFA can form H-bonds exceptionally with lipid proton-donor functional groups ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $=\text{NH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ) or water molecules.

As a part of total CS lipids, forming liposomes, phosphatidyl choline (PC) – ( $27,5 \pm 1,0\%$ ), phosphatidyl ethanolamine (PEA) ( $20,1 \pm 0,9\%$ ), predominate, in less extent there presented sphingomyelin (SM) ( $18,3 \pm 2,0\%$ ) and ethanolamine plasmalogen (EP) ( $15,3 \pm 0,9\%$ ) [8]. It is known that SM and PC are neutral lipids, PEA and EP are “acid” ones [9]. The content of all neutral lipids in CS makes 49.4% from total amount of phospholipids and their phospholipid heads do not



**Рис. 7.** Влияние КП на положение  $N^*$ - (а) и  $T^*$ - (б) полос флуоресценции ФМЕ в липосомах из суммарных липидов СС: 1 – глицерин; 2 – ЭГ; 3 – ДМФА.

**Fig. 7.** Effect of CPAs on the position of  $N^*$  (a) and  $T^*$  (b) bands of FME fluorescence in liposomes form total CS lipids: 1 – glycerol; 2 – EG; 3 – DMFA

только ДМФА обладает способностью проникать непосредственно через липидный бислой путем гидрофобного взаимодействия. Резкое изменение формы спектра флуоресценции ФМЕ в липосомах при повышении концентрации ДМФА более 9% может быть доказательством того, что данная концентрация является пороговой для липидного бислоя данного состава, при превышении которой возможны конформационные изменения липидов.

Следует отметить, что оптимальная концентрация ДМФА, используемая для криоконсервирования СС [6] и других биологических объектов [5], не превышает 1 М (7,5%). Поскольку в общую цитотоксичность ДМФА основной вклад вносит не осмотическая, а химическая компонента [5], полученные результаты можно использовать для объяснения механизма влияния КП на мембраны клеток, в частности сперматозоидов. Применение флуоресцентного зонда ФМЕ для изучения механизмов действия КП на модельных объектах (липосомах) позволяет оценить предельно допустимую для криоконсервирования клеток концентрацию КП, при повышении которой могут существенно повреждаться клеточные мембраны, а также определить наиболее вероятный путь проникновения КП через клеточные мембраны и, наконец, более глубоко объяснить механизм как повреждающего, так и криозащитного действия КП на молекулярном и клеточном уровнях.

### Выводы

1. Установлено, что из трех изученных КП (глицерин, ЭГ, ДМФА) наибольшее влияние на форму спектра флуоресценции ФМЕ, который связан с липидным бислоем липосом, приготовленных из суммарных липидов СС, оказывает ДМФА.

2. Показано, что степень влияния изученных КП на липосомы определяется гидрофобно-гидрофильным балансом их молекул: ДМФА преимущественно воздействует на липидный бислой путем гидрофобного взаимодействия, а глицерин и ЭГ влияют на гидратный слой полярных “головок” фосфолипидов, образуя при этом межмолекулярные водородные связи.

### Литература

1. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Роддик Д., Тупс Э. Органические растворители. - М.: Химия, 1968. - 1450 с.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. - М.: Наука, 1989. - 277 с.
3. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. - М.: Наука, 1982. - 224 с.
4. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. - Л.: Наука, 1981. - С. 195-201.
5. Ліннік Т.П. Фізико-хімічні фактори кріопшкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів в циклі низькотем-

practically contain proton-donor groups. Therefore it may be supposed that DMFA in less extent binds polar area by hydrophobic interaction. However the presence of “acid” lipids (35.4%) having proton-donor groups does not exclude the possibility of the formation of hydrogen bonds of DMFA with them. Therefore, even under high DMFA concentrations the fluorescence of FME bond with liposomes was preserved, that confirmed only partial displacement of a probe into solution under DMFA effect.

Obtained results testify to the fact that DMFA renders the highest effect on lipid bilayer of liposomes. On the change in the position of N\* and T\* probe bands and the intensity of their fluorescence after DMFA introduction into liposome suspension it may be supposed that only DMFA is able to penetrate directly via lipid bilayer by means of hydrophobic interaction. Sharp alterations in DME probe fluorescence spectrum shape in liposomes with a rise in DMFA concentration over 9% may prove that this concentration is a threshold one for lipid bilayer of this composition, and if the latter is exceeded the conformational changes of lipids are possible.

It should be noted that optimal concentration of DMFA used for cryopreservation of CS [6] and other biological objects [5] does not exceed 1M (7.5%). Since in to total DMFA cytotoxicity the main contribution is made by not osmotic but chemical component [5], the obtained results can be used for explaining the mechanisms of CPA effect on cell membranes, especially spermatozoa. Application of FME fluorescent probe for studying the mechanisms of CPA effect in model objects (liposomes) enables to estimate the maximum allowed for cell cryopreservation CPA concentration, the exceeding of which leads to significant damage of cell membranes, as well as to find the most probable way of CPA penetration through cell membranes and finally to explain deeply the mechanism of both damaging and cryoprotective effect of CPAs at molecular and cells levels.

### Conclusions

1. It has been established that among three studied CPAs (glycerol, EG, DMFA) the highest effect on the form of FME probe fluorescence spectrum bound with liposome lipid bilayer prepared from total lipids of CS is rendered by DMFA.

2. It has been shown that the effect rate of the studied CPAs on liposomes is determined by hydrophobic-hydrophilic interaction and glycerol and EG affect hydrate layer of polar “heads” of phospholipids by forming herewith intermolecular hydrogen bonds.

### References

1. Veisberger A., Proskauer E., Roddic D., Tups E. Organic solvents. - Moscow: Khimiya, 1968. - 1450 p.



- пературного консервування: Автореф. ... дис. докт. біол. наук.– Харків, 2003.– 36 с.
6. Пат. №8590 Україна, МПК<sup>7</sup>, А61D 19/02, А01N 1/02. Середовище Єгорова для кріоконсервування сперматозоїдів собаки / М.І. Єгоров, В.І. Грищенко, Т.П. Ліннік, О.М. Новіков. Заявлено 10.01.2005. Опубл. 15.08.2005. Бюл. № 8.
  7. Boucher J.H., Foote R.H., Kirk R.W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves // Cornell Vet.– 1959.– Vol. 47.– P. 67-89.
  8. Darin-Bennet A., Poulos A., White I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa // J. Reprod. Fert.– 1974.– Vol. 41, N3.– P. 471-474.
  9. England G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review // J. Reprod. Fert.– 1993.– Vol. 47, N2.– P. 243-255.
  10. Fahrig B.M. Cryopreservation by pellet freezing of epididymal and ejaculated spermatozoa from male dog: B. S. Thesis.– Louisiana State University, 2003.– 312 p.
  11. 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, N4.– P. 2929–2941.
  12. Koutsarova N., Todorov P., Koutsarov G. Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa // J. Reprod. Fert.– 1997.– Vol. 51, N1.– P. 117-121.
  13. Olar T.T., Bower R.A., Pickett B.W. Influence of extender cryopreservation and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws // Theriogenology.– 1988.– Vol. 31, № 2. – P. 134-142.
  14. 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, N1.– P. 65-72.
  15. Pena A., Linde-Forsberg C. Effect of equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa // Theriogenology.– 2000.– Vol. 54, N6.– P. 859-875.
  16. Shynkar V.V., Klymchenko A.S., Mely Y. et al. Anion Formation of 4'-(Dimethylamino)-3-hydroxyflavone in Phosphatidylglycerol Vesicles Induced by HEPES Buffer: A Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Investigation // J. Phys. Chem. B.– 2004.– Vol. 108, N3.– P. 18750-18755.
  17. Solares M.P., Rossi C.A., Mezzalaira A., Cecim M. Ethylene glycol on canine semen cryopreservation // Ciencia Rural.– 2002.– Vol. 32, N 4.– P. 649-655.
  18. Songsasen N., Yu I., Murton S. et al. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 79-90.
  19. Thirumata S., Ferrer M.S., Bruce A. et al. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agent // Cryobiology.– 2003.– Vol. 47, N1.– P. 109-124.
  20. Turkmen Z., Klymchenko A.S., Oncul S. et al. A triterpene oleanolic acid conjugate with 3-hydroxyflavone derivative as a new membrane probe with two-color ratiometric response // J. Biochem. Biophys. Meth.– 2005.– Vol. 64, N1.– P. 1-18.
  21. Yu I., Songsasen N., Godke R.A., Leibo S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 62-78.
  2. Dobretsov G.E. Fluorescent probes in studying cells, membranes and lipoproteins.– Moscow: Nauka, 1989.– 277p.
  3. Ivkov V.G., Berestovsky G.N. Lipid bilayer of biological membranes.– Moscow: Nauka, 182.– 224p.
  4. Kreps E.M. Lipids of cell membranes.– Leningrad: Nauka, 1981.– P.195-201.
  5. Linnik T.P. Physical and chemical factors of cryodamage and cryoprotection of fowl spermatozoa in the cycle of low temperature preservation: Author's abstract of doctor of biol sci.– Kharkov, 2003 – 36p.
  6. Patent 8590, (Ukraine) A61D 19/02, A01N 1/02. Egorov's medium for cryopreservation of canine spermatozoa// M.I. Egorov, V.I. Grishenko, T.P. Linnik, O.M. Novikov; Appl. 10.01.2005; Publ. 15.08.2005, Bul. N 8.
  7. Boucher J.H., Foote R.H., Kirk R.W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves // Cornell Vet.– 1959.– Vol. 47.– P. 67-89.
  8. Darin-Bennet A., Poulos A., White I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa // J. Reprod. Fert.– 1974.– Vol. 41, N3.– P. 471-474.
  9. England G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review // J. Reprod. Fert.– 1993.– Vol. 47, N2.– P. 243-255.
  10. Fahrig B.M. Cryopreservation by pellet freezing of epididymal and ejaculated spermatozoa from male dog: B. S. Thesis.– Louisiana State University, 2003.– 312 p.
  11. 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, N4.– P. 2929–2941.
  12. Koutsarova N., Todorov P., Koutsarov G. Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa // J. Reprod. Fert.– 1997.– Vol. 51, N1.– P. 117-121.
  13. Olar T.T., Bower R.A., Pickett B.W. Influence of extender cryopreservation and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws // Theriogenology.– 1988.– Vol. 31, № 2. – P. 134-142.
  14. 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, N1.– P. 65-72.
  15. Pena A., Linde-Forsberg C. Effect of equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa // Theriogenology.– 2000.– Vol. 54, N6.– P. 859-875.
  16. Shynkar V.V., Klymchenko A.S., Mely Y. et al. Anion Formation of 4'-(Dimethylamino)-3-hydroxyflavone in Phosphatidylglycerol Vesicles Induced by HEPES Buffer: A Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Investigation // J. Phys. Chem. B.– 2004.– Vol. 108, N3.– P. 18750-18755.
  17. Solares M.P., Rossi C.A., Mezzalaira A., Cecim M. Ethylene glycol on canine semen cryopreservation // Ciencia Rural.– 2002.– Vol. 32, N 4.– P. 649-655.
  18. Songsasen N., Yu I., Murton S. et al. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 79-90.
  19. Thirumata S., Ferrer M.S., Bruce A. et al. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agent // Cryobiology.– 2003.– Vol. 47, N1.– P. 109-124.
  20. Turkmen Z., Klymchenko A.S., Oncul S. et al. A triterpene oleanolic acid conjugate with 3-hydroxyflavone derivative as a new membrane probe with two-color ratiometric response // J. Biochem. Biophys. Meth.– 2005.– Vol. 64, N1.– P. 1-18.
  21. Yu I., Songsasen N., Godke R.A., Leibo S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 62-78.

Поступила 04.10.2005

Accepted in 04.10.2005