

Нові флуоресцентні барвники як зонди для дослідження сперматозоїдів собак у криозахисних середовищах

UDC 611. 013. 11: 636. 082. 11. 57.043

M.I. EGOROV^{1*}, T.S. DYUBKO¹, T.P. LINNIK¹, A.P. BELONOZHKO¹,
I.G. ERMOLENKO², O.N. SEMENOVA², L.D. PATSENKER², V.G. PIVOVARENKO³, E.A. POVROZIN²

New Fluorescent Dyes as Fluorescent Probes for Examination of Canine Spermatozoa in Cryoprotective Media

Методами флуоресцентної спектроскопії і мікроскопії досліджували можливості застосування флуоресцентних барвників ДСМ, Є-176, 3-ДАБ, ФМЕ для вивчення впливу криозахисних речовин на сперматозоїди собаки. Установлено, що барвники ФМЕ і 3-ДАБ придатні для розв'язання поставленої задачі, а барвники ДСМ і Є-176 мають обмеження внаслідок достатньо сильної флуоресценції розчинів криопротекторів. Показано, що досліджувані флуоресцентні барвники по-різному впливають на рухомість клітин.

Ключові слова: сперматозоїди собак, диметилформамід, етиленгліколь, флуоресцентні зонди, ДСМ, Є-176, 3-ДАБ, ФМЕ

Методами флуоресцентной спектроскопии и микроскопии исследовали возможности флуоресцентных красителей ДСМ, Е-176, 3-ДАБ, ФМЕ для изучения влияния криозащитных веществ на сперматозоиды собаки. Установлено, что красители ФМЕ и 3-ДАБ применимы для решения поставленной задачи, а ДСМ и Е-176 имеют ограничения в результате достаточно сильной флуоресценции растворов криопротекторов. Показано, что исследуемые флуоресцентные красители по-разному влияют на подвижность клеток.

Ключевые слова: сперматозоиды собак, диметилформамид, этиленгликоль, флуоресцентные зонды, ДСМ, Е-176, 3-ДАБ, ФМЕ.

Possibilities of using DSM, E-176, 3-DAB, FME fluorescent dyes for examining the effect of cryoprotective agents on canine spermatozoa were studied with the methods of fluorescent spectroscopy and microscopy. FME and 3-DAB dyes were found to be capable of solving the tasks set and DSM, E-176 ones had a limitation due to quite a strong fluorescence of cryoprotectants' solutions. Studied fluorescent dyes were demonstrated as differently affecting cell motility.

Key-words: canine spermatozoa, dimethyl formamide, ethylene glycol, fluorescent probes, DSM, E-176, 3-DAB, FME.

Підбір оптимальних криопротекторів (КП), придатних для довготривалого низькотемпературного зберігання сперматозоїдів, проводиться емпірично, бо механізми захисної дії цих речовин на молекулярному рівні недостатньо вивчені. Метод флуоресцентних зондів (ФЗ), завдяки своїй високій чутливості, має перспективи в дослідженні молекулярних механізмів впливу на клітини різного походження фізико-хімічних факторів [5, 10, 16], у тому числі захисної дії КП.

Можливість використання методу ФЗ раніше вивчалась на сперматозоїдах свавців. Так, було показано, що флуоресцентні зонди ДСМ і АНС зв'язуються зі сперматозоїдами хряка і реагують на зміни їх стану [10]. Однак на сперматозоїдах собаки такі дослідження не проводили.

Флуоресцентні зонди, які використовуються для дослідження клітин, повинні мати високі сольвато-

Selection of optimal cryoprotectants enabling the sperm preservation for a long term is empirically performed because of poor studying a protective effect mechanism for these agents at molecular level. The method of fluorescent probes (FP) due to its high sensitivity is prospect one in examining molecular mechanisms of the effect on cells of various origins of physical and chemical factors [5, 10, 16], in particular, a cryoprotectant protective effect.

Possibility to use the FP method was previously investigated in mammalian sperm. Therefore it has been demonstrated that DMS and ANS probes bind the hog spermatozoa and respond the alterations of their state [10]. However in canine spermatozoa there were no studies performed.

Fluorescent probes used for studying cells should have high solvate-chromic properties and significant rise in quantum yield when being bound with biological

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Інститут синтіляційних матеріалів НТК "Інститут монокристалів" НАН України, м. Харків

³Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.:+38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

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

²Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

³Taras Shevchenko Kiev National University, Kiev, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

хромні властивості і значне зростання квантового виходу при зв'язуванні з біологічним об'єктом і реагувати на зміну мікрооточення. Оскільки найбільш розповсюджені ФЗ не в повному обсязі задовольняють цим вимогам, необхідно шукати і випробувати нові ФЗ.

У роботі досліджується можливість застосування флуоресцентних барвників, що є похідними різних типів органічних речовин (ДСМ, Е-176, ФМС, 3 ДАБ) для вивчення змін стану сперматозоїдів собаки під дією КП диметилформаміду (ДМФА).

Матеріали і методи

Сперму для досліджень було отримано від 3-х клінічно здорових кобелів породи ротвелер при кімнатній температурі (20°C) за допомогою масажу передміхурової залози в присутності естральної самиці. Еякулят сперми собак складається з трьох фракцій, які виділяються окремо з невеликим інтервалом у часі. Це дозволяє в експерименті отримати всі фракції еякуляту окремо і уникнути передчасної активації сперматозоїдів собак під впливом третьої фракції, яка є секретом передміхурової залози [17].

Отриманий матеріал (перша і друга фракції сперми) розділяли на 4 аліквоти, центрифугували в пластикових ампулах об'ємом 1 мл при 400 г впродовж 3 хв. Центрифугування проводили для відокремлення плазми еякуляту собак, білки якої можуть зв'язувати зонди. Осадок сперматозоїдів ресуспендували середовищем, яке містило 0,2 М тріс-буфера (Trizma pH 7,2, Sigma, США), 0,05 М фруктози (осмотичність середовища становила 320 мОсмоль, pH 7,2), до концентрації 10^6 клітин в 1 мл.

Було використано 7 еякулятів. Концентрацію сперматозоїдів в еякулятах і процент рухливих клітин визначали візуально під мікроскопами "Біолар" (x250) (Польща) і "Люмам МП-4" (x1000) (ЛОМО, Росія) за допомогою відеозапису. Відеозапис проводився з використанням відеокамери Panasonic WV-CP 470, з'єднаної з мікроскопом. На цій же установці досліджували локалізацію флуоресцентних барвників в сперматозоїдах із застосуванням світوفільтрів марок BC-8-2, SZS-24-4, SS-15-2.

Для вивчення впливу ФЗ на рухливість сперматозоїдів у часі суспензії клітин витримували в термостаті при температурі 38°C, яка відповідає фізіологічній нормі собаки. Оцінку рухливості сперматозоїдів давали через кожні 10 хв.

Для дослідження впливу КП на спектри флуоресценції ФЗ зразки сперматозоїдів після центрифугування і ресуспендування, а також розчини КП попередньо охолоджували на протязі

object and response to the change in microenvironment. Since the most spread FPs do not meet completely the requirements one should search and examine new ones.

The paper covers the possibility to use fluorescent dyes being the derivatives of various types of organic substances (DSM, E-176, FME, 3-DAB) to investigate the state changes of canine spermatozoa under the effect of dimethyl formamide (DMFA).

Materials and methods

Sperm for research was obtained from 3 clinically healthy male dogs of Rottweiler breed at room temperature (20°C) by massaging the prostate in presence of female in estrus. Canine sperm ejaculate comprises three fractions which are separately secreted with slight time interval. This enables in experiment to obtain all ejaculate fractions separately and avoid untimely activation of dogs' spermatozoa under the influence of the third fraction which is secreted by prostate [17].

Obtained material (first and second sperm fractions) were divided into 4 aliquots, centrifuged in 1ml plastic ampoules at 400g for 3 min. Centrifugation was performed to separate canine ejaculate plasma the protein of which may bind the probes. Spermatozoa sediment was re-suspended with the medium comprised 0.2 M tris-buffer (Trizma pH 7.2, Sigma, USA), 0.05 M fructose (medium osmolality made 320 mOsm, pH 7.2), to the concentration of 10^6 cells per 1 ml.

There were used 7 ejaculates. Spermatozoa concentration in ejaculates and percentage of motile cells were visually found with "Biolar" (x250) microscope (Poland) and "Lumam MP-4" (x1000) (LOMO, Russia) by video recording. It was performed with Panasonic WV-CP 470 video camera combined with microscope. At the same assembly there was examined the localization of florescent dyes in spermatozoa using light filters BC-8-2, SZS-24-4, SS-15-2.

To study the effect of FP on the motility of spermatozoa in time cell suspensions were maintained in thermostat at 38°C that is physiological norm for dogs. Evaluation of spermatozoa motility was conducted every 10 min.

To examine the effect of cryoprotectants on FP fluorescence spectra the samples of spermatozoa after centrifugation and re-suspending as well as solutions of cryoprotectants were pre-cooled for 10 min down to 4°C. Solutions of cryoprotectants (DMFA or EG) under final concentration of 5% were added to cell suspension directly before measuring.

Fluorescent probes DSM (4-(N-dimethylamino-styryl)-1-methyl pyridine-N-toluolsulfonat), E-176 and 3-DAB (commercial names) were synthesized at the Department of organic luminophores and dyes of the

10 хв до температури 4°C. Розчини кріопротекторів (ДМФА або ЕГ) у кінцевій концентрації 5% додавали до суспензії клітин безпосередньо перед вимірюваннями.

Флуоресцентні зонди ДСМ (4-N-диметил-аміностирил 1-метилпіридиній-N-толуолсульфонат), Є-176 і 3-ДАБ (комерційні назви) були синтезовані у відділі органічних люмінофорів і барвників Інституту сцинтиляційних матеріалів НТК “Інституту монокристалів” НАН України. Зонд ФМС (3-гідрокси-4’-(N,N-диметиламінофлаво) синтезовано по методу [23]. В експериментах використовували розчини барвників, приготованих на двічі дистильованій воді. Концентрація барвників у суспензії клітин при мікроскопічних дослідженнях становила 40-70, а при спектральних вимірюваннях – 4-7 мкмоль/л. Спектральні параметри флуоресцентних барвників наведено в табл. 1.

Кріопротектори марки “х.ч.” або “ч.д.а.” (“Реакхім”, Росія) додатково очищали: ДМФА – двократною вакуумною перегонкою [1], ЕГ – тим же способом, але з попередньою витримкою над окисом алюмінію чи активованим вугіллям марки “А” [12].

Спектри флуоресценції вимірювали на спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Varian) з їх автоматичною корекцією. Ширина вхідної і вихідної щілин монохроматорів становила 5 нм. Спектри флуоресценції ФМС збуджували світлом з довжиною хвилі 405, ДСМ і 3-ДАБ – 460; Є-176 – 425 нм. Для усунення концентраційного гасіння при флуориметричних вимірюваннях зразки розводили так, щоб їх оптична щільність на довжині хвилі збудження флуоресценції не перевищувала 0,1. Усі спектральні вимірювання виконували при 20°C в стандартних кварцевих кюветах 1×1×3 см. Квантовий вихід флуоресценції ДСМ, 3-ДАБ і Є-176 визначали, використовуючи як еталон 2-(4-метоксисулфофеніл)-5-(4-диметиламінофеніл)-оксазол-1,3 [13], квантовий вихід якого в спирті дорівнює 0,27.

Статистичну обробку результатів виконували з використанням методу Стьюдента [6].

Результати та обговорення

Проведені дослідження показали, що всі вивчені флуоресцентні барвники зв’язуються зі сперматозоїдами собаки, але відрізняються за місцями своєї локалізації (рис. 1, б, в, г). ФМС локалізується переважно в ділянці голівок (рис. 1, б), при цьому спостерігаються два різних за кольором світіння (зелене і руде) з перевагою

Institute of Scintillation Materials of State Technology Concern “Institute of Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine. FME probe (3-hydroxy-4’-(N,N-dimethylaminoflavone)) was synthesized as in the method reported [23]. In experiments there were used the solutions of dyes prepared with double distilled water. Dye concentration in cell suspension during microscopic studies made 40-70 and during spectral measurements it was 4-7 $\mu\text{mol/l}$. Spectral parameters of fluorescent dyes are described in Table 1.

Cryoprotectants of the grades “chemically pure” and “pure for analysis” (“Reakhim”, Russia) were additionally purified: DMFA with double vacuum [1], the same way for EG but with pre-exposure over aluminum oxide or activated carbon of “A” grade [12].

Fluorescent spectra were measured with Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian) with their automated correction. Input and output width of monochromators’ slits made 5 nm. Fluorescence spectra FME were light excited with wave length 405, 460 for and 3-DAB; 425 nm for E-176. To eliminate concentration quenching during fluorimetric measuring the samples were diluted in such a way that their optical density on wavelength of fluorescence excitation does not exceed 0.1. All spectral measurement were done at 20C in standard 1×1×3 cm quartz cuvettes. Quantum yield of fluorescence of DSM, 3-DAB and E-76 was examined using as etalon 2-(4-metoxysulfophenil)-5-(4-dimethyl aminophenyl)-oxasol-1.3 [13], which quantum yield in alcohol is 0.27.

The results were statistically processed using Student’s method [6].

Results and discussion

The results of this research have shown that all studied fluorescent dyes are bound with canine

Таблиця 1. Спектральні параметри барвників в етанолі
Table 1. Dye spectra characteristics in ethanol

Флуоресцентний барвник Fluorescent dye	$\lambda_{\text{макс. погл.}}^{\text{НМ}}$ $\lambda_{\text{adsorb max}}^{\text{НМ}}$	$\epsilon, \text{МОЛЬ}^{-1}\text{СМ}^{-1}$ $\epsilon, \text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{макс. фл.}}^{\text{НМ}}$ $\lambda_{\text{fluor max}}^{\text{НМ}}$	QY
ФМС [23] FME [23]	407	49000	520	0,27
Є-176 E-176	415	13332	543	0,02
ДСМ DSM	478	44700	602	0,02
3-ДАБ 3-DAB	470	10250	666	0,11

Примітки: $\lambda_{\text{макс. погл}}$ – положення максимуму спектру поглинання; $\lambda_{\text{макс. фл.}}$ – положення максимуму спектру флуоресценції; ϵ – коефіцієнт молярної екстинкції; QY – квантовий вихід флуоресценції.

Notes: $\lambda_{\text{adsorb max}}$ – maximum of the adsorbtion spectrum; $\lambda_{\text{fluor max}}$ – maximum of the fluorescence spectrum; ϵ – molar extinction coefficient; QY – fluorescence quantum yield.

яскраво-зеленої флуоресценції. ДСМ зв'язується з усією поверхнею клітин, але більш висока інтенсивність світіння спостерігається в ділянці голівок (рис.1, в), менша – шийок; в його спектрі переважає червоно-руда флуоресценція. Є-176 зв'язується з усією поверхнею клітин і світиться в жовто-зеленій ділянці з майже однаковою інтенсивністю з різних ділянок клітин. 3-ДАБ має червоно-руду флуоресценцію і локалізується переважно в ділянці голівок (на рис. 1 не показано).

На рис. 2 наведено результати впливу ФЗ на рухливість сперматозоїдів собаки впродовж 40 хв, в контролі вона при цьому становила $65 \pm 3\%$. Зонд ДСМ через 10 хв після додання до суспензії клітин не впливає на їх рухливість, і тільки через 30 хв кількість рухливих клітин знижується на 5%. Одним з основних показників цитотоксичної дії речовин на сперматозоїди є падіння їх рухливості у часі. Тому можна дійти висновку, що ДСМ не впливає на морфофункціональний стан клітин на відміну від 3-ДАБ, у присутності якого вже через 10 хв практично всі сперматозоїди стають нерухомими.

spermatozoa, but differ on the sites of their localization (Fig. 1, b, c, d). FME is mainly localized in head sites (Fig 1, b) herewith there are observed two different by color luminescences (green and orange) with predominance of bright green fluorescence. DSM is bound with the whole surface of cells however higher intensity of luminescence is noted in head sites (Fig. 1, c), lower one was found in those of neck; in its spectrum red-orange fluorescence prevails. E-176 is bound with the whole cell surface and luminescent in yellow-green area with almost the same intensity from different cell sites. 3-DAB has red-orange fluorescence and is localized mainly in head sites (not presented in Fig. 1).

Fig. 2 shows the FP effect results on motility of canine spermatozoa for 40 min, it made $65 \pm 3\%$ in the control. DSM probe 10 min after being added to cell suspension does not affect their motility. And only 30 min later the number of motile cells reduces by 5%. One of cytotoxic effect main indices of substances on spermatozoa is a decrease in their motility with time. Therefore one can conclude that DSM does not affect

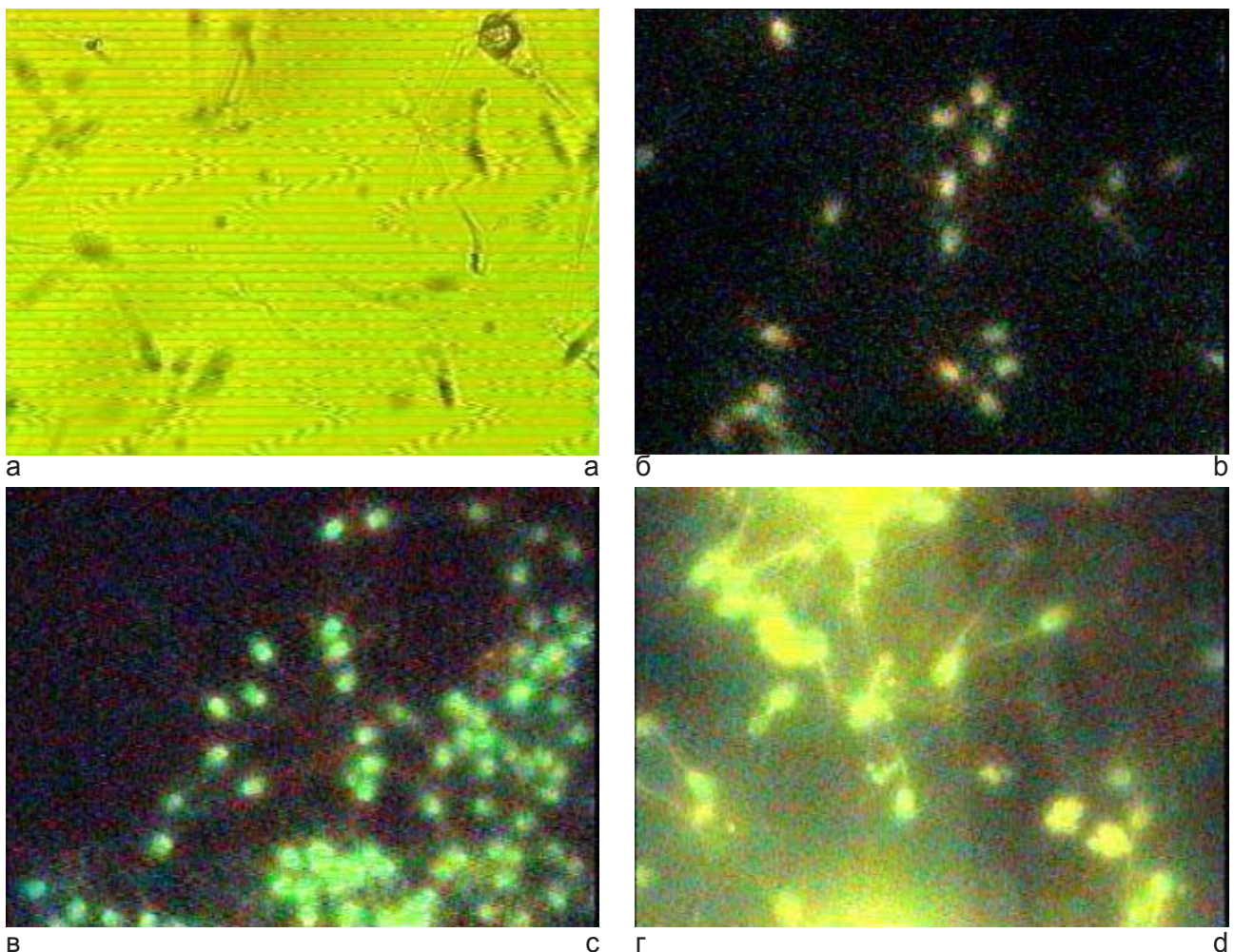


Рис. 1. Локалізація флуоресцентних барвників, які було досліджено, в сперматозоїдах собаки: а – контроль (клітини в проминаючому світлі без барвників); б – ДСМ; в – ФМЕ; г – Є-176. $\times 1000$.

Fig. 1. Localization of fluorescent dyes studied in canine spermatozoa: а – control (cells in light microscopy with no dyes); б - DSM, с – FME, d – E-176. $\times 1000$.

Незначно знижує рухливість сперматозоїдів Є-176, тобто він, як і ДСМ, не виявляє виразної цитотоксичної дії на сперматозоїди собаки. У присутності ФМЄ через 10 хв кількість рухливих клітин не перевищує $30 \pm 5\%$, тобто цей барвник має помірний пошкоджуючий вплив на клітини.

Катіонний зонд ДСМ (табл. 1) є похідним піридину [4]. Завдяки наявності гнучкого ланцюга, який з'єднує метилпіридинове кільце з аніліновим, цій молекулі притаманні властивості полієнів і вона легко піддається конформаційній ізомеризації в полярних середовищах, яка веде до безвипромінювальної конверсії $S_1 \rightarrow S_0$, що супроводжується зниженням квантового виходу флуоресценції. У гливких середовищах, а також при зв'язуванні з біомембранами або білками, навпаки, флуоресценція ДСМ може зростати в 10 і більше разів. ДСМ відомий як потенціалозалежний зонд, який застосовується для визначення поверхневого потенціалу клітин. У той же час у різних клітинах він може проявляти як "червону" (610 нм), так і "зелену" (560 нм) флуоресценцію [4]. При зв'язуванні з ДНК можна бачити лише червону смугу, в бактеріях, покритих оболонкою, на поверхні якої розташований шар негативно зарядженого ліпополісахариду – в основному зелену, а в інших мембранах чи білках можуть бути присутні обидві [2, 3, 11] форми флуоресценції барвника.

Флуоресценція ДСМ, який знаходиться в суспензії сперматозоїдів, практично повністю обумовлена його зв'язаною формою (рис. 3), що суттєво спрощує аналіз спектрів. Положення максимуму спектра ($\lambda_{\text{фл}} \approx 600$ нм) свідчить про поверхневу локалізацію основної маси зв'язаного з клітинами ДСМ [4]. У спектрах присутнє також плече при 550 нм, яке може віддзеркалювати зв'язування зонда в неполярних ділянках мембран.

У середовищі, що містить ЕГ, зонд ДСМ має інтенсивну флуоресценцію (рис. 3), хоча і в дещо більш довгохвильовій ділянці, ніж в нативних сперматозоїдах ($\lambda_{\text{макс}}$ знаходиться біля 607-608 нм). При цьому інтенсивність флуоресценції зонда близька до інтенсивності його світіння в клітинах, що ускладнює аналіз спектрів ДСМ у сперматозоїдах у присутності ЕГ. У розчині більш гідрофобного КП (ДМФА) інтенсивність спектрів флуоресценції ДСМ перевищує їх інтенсивність в нативних сперматозоїдах. Це практично унеможливує застосування цього зонда в розчинах КП, які мають більшу гідрофобність у порівнянні з ЕГ.

Таким чином, зонд ДСМ може використовуватися для дослідження стану сперматозоїдів, які зазнали дії різних факторів (наприклад, температури, іонного складу середовища, лазерного або іонізуючого опромінення тощо), але можливості його застосування для вивчення сперматозоїдів у

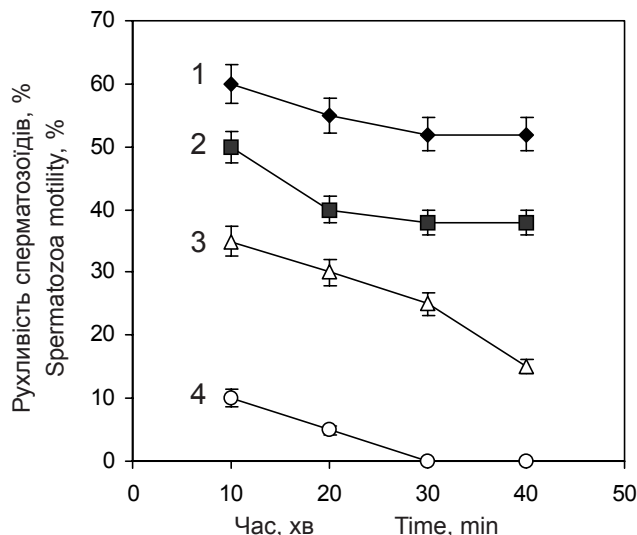


Рис. 2. Вплив флуоресцентних барвників, які було досліджено, на рухливість сперматозоїдів собаки: 1 – ДСМ; 2 – Є-176; 3 – ФМЄ; 4 – 3-ДАБ.

Fig. 2. Effect of fluorescent dyes studied for canine spermatozoa motility: 1 – DSM; 2 – E-176; 3 – FME; 4 – 3-DAB.

morphofunctional status of cells in contrast to 3-DAB in presence of which even 10 min later quite all spermatozoa are getting immotile. E-176 decreases slightly spermatozoa motility, i.e. as well as DSM does not demonstrate a pronounced cytotoxicity effect on canine spermatozoa. In FME presence in 10 min the number of motile cells does not exceed $30 \pm 5\%$, that is this dye has a moderate impairing influence on cells.

DSM cation probe (Table 1) is pyridine derivative [4]. Due to the presence of flexible link joining methyl pyridine ring with aniline one this molecule is characterized with polyenes properties and easily underwent conformational izomerization in polar media leads to non-illuminating conversion $S_1 \rightarrow S_0$, accompanied with the reduction of fluorescence quantum yield. In viscous media and during binding with biological membranes or proteins as contrary DSM fluorescence may be increased 10 times and higher. DSM is known as potential-dependent probe used for examining cell surface potential. At the same time in various cells it may manifest both "red" (610 nm) and "green" (560 nm) fluorescence [4]. During binding with DNA one may observe only red band in bacteria covered with membrane on surface of which there is a layer of negatively charged liposaccharide, basically green color and for other membranes two dye fluorescence forms may be present [2, 3, 11].

DSM fluorescence, being in spermatozoa suspension is quite completely stipulated by its bound form (Fig. 3), that significantly simplifies spectra analysis. Spectrum maximum position ($\lambda_{\text{fl}} = 600$ nm) testifies to surface localization of bulk DSM bound with cells [4]. There is a shoulder at 550 nm as well, which may indicate probe binding in non-polar membrane sites.

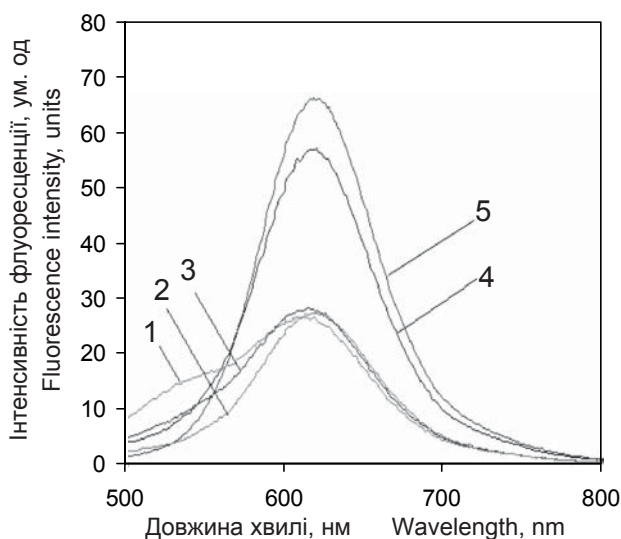


Рис. 3. Спектри флуоресценції ДСМ в сперматозоїдах собаки в присутності ЕГ і ДМФА: 1 – сперматозоїди + ДСМ; 2 – середовище + ЕГ + ДСМ; 3 – сперматозоїди + ЕГ + ДСМ; 4 – середовище + ДМФА + ДСМ; 5 – сперматозоїди + ДМФА + ДСМ. Концентрація ДСМ – $6,8 \times 10^{-6}$ моль/л.

Fig. 3. Fig. 3. DSM fluorescence spectra in canine spermatozoa in EG and DMFA presence: 1 – spermatozoa + DSM; 2 – medium+EG+DSM; 3- spermatozoa+EG+DSM; 4- medium+DMFA+DSM; 5- spermatozoa+DMFA+DSM; DSM concentration is 6.8×10^{-6} mol/l.

присутності органічних речовин, зокрема КП, обмежені. Зонд не можна використовувати для дослідження впливу на сперматозоїди КП, більш гідрофобних, ніж ЕГ.

Молекула Є-176 формально нейтральна. Однак в слабкокислих, нейтральних і лужних середовищах карбоксигрупа зазнає дисоціації, і молекула зонда перетворюється в негативно заряджений іон.

У нейтральному середовищі, яке звичайно використовують для інкубації сперматозоїдів, максимум спектра флуоресценції барвника Є-176 знаходиться при 547 нм. При зв'язуванні зі сперміями максимум флуоресценції барвника дещо зрушує в короткохвильовий бік (до 536 нм), а її інтенсивність зростає майже в 2 рази (рис. 4). При доданні КП до середовища інкубації зростає інтенсивність світіння вільного барвника (тобто того, який знаходиться у розчині) і барвника, зв'язаного з клітинами, причому більше для ДМФА, ніж для ЕГ, без суттєвих змін положення спектрів. У присутності КП інтенсивності флуоресценції молекул зонда, зв'язаних з клітинами і тих, що знаходяться у розчині, відрізняються на 38 ± 5 і $5 \pm 2\%$ для ЕГ і ДМФА відповідно. Таким чином, барвник Є-176 має обмеження при дослідженні впливу КП на сперматозоїди. Як і ДСМ, його можна використовувати лише для КП з гідрофобністю, яка не перевищує або дорівнює гідрофобності ЕГ.

In the medium with EG DSM probe has an intensive fluorescence (Fig. 3), however in somewhat long wave area than in native spermatozoa (λ_{\max} is near 607-608 nm).

Herewith the intensity of fluorescence probe is close to the one of its luminescence in cells that makes difficult the analysis of DSM spectra in spermatozoa in EG presence. In solution of more hydrophobic DMFA the fluorescence intensity exceeds its intensity in native spermatozoa. This makes practically impossible the use of this probe in the solutions of cryoprotectants which are more hydrophobic than EG.

Thus DSM probe may be used to examine state of spermatozoa underwent different effects (e.g. temperature, medium ionic composition, laser or ionizing radiation etc.) but the possibilities of its application to investigate spermatozoa in presence of organic substances, in particular cryoprotectants, are limited. The probe could not be used to investigate the effect on spermatozoa of the cryoprotectants which are more hydrophobic than EG.

E-176 molecule is formally neutral. However in slightly acid, neutral and alkaline media carboxy group is dissociated and probe molecule transforms into negatively charged ion.

In neutral medium which is usually used for spermatozoa incubation the maximum of E-176 dye fluorescence spectrum is at 547 nm. During binding with spermatozoa dye fluorescence spectrum maximum is shifted towards short waves (up to 536 nm) and its intensity is increased almost twice (Fig. 4). When adding cryoprotectants to incubation medium the luminescence intensity of free dye (i.e. the one being in the solution) increased and that bound with cells more over in greater extent for DMFA than for EG with no considerable changes in spectra. In cryoprotectants' presence fluorescence intensities of probe molecules bound with cells and those being in solution are different by 38 ± 5 and $5 \pm 2\%$ for EG and DMFA, correspondingly. Thus E-176 dye has limitations during studying the effect of cryoprotectants on spermatozoa. The same as for DSM it could be used only for cryoprotectants with hydrophobicity not exceeding or equal to that for EG.

FME as a new fluorescent probe of flavonols class, may have two bands in fluorescence spectrum as a result of the fact that its excited state makes two isomere forms: normal (N*) and tautomeric (T*) [23]. Each of these forms has own fluorescence that leads to the fact that in spectrum of FME there are observed two bands: green-blue (N*) and yellow-orange (T*). Position and intensity of these bands depend on polarity, proton-donor ability and viscosity of the medium [14, 15, 20]. FME is advantageously different among other classes of fluorescent probes because it is capable of simultaneous identifying such environ-

Новий флуоресцентний зонд класу флавонолів ФМС може мати дві смуги в спектрі флуоресценції внаслідок того, що у збудженому стані він утворює дві ізомерні форми: нормальну (N*) і таутомерну (T*) [23]. Кожна з цих форм має власну флуоресценцію, внаслідок чого в спектрі ФМС спостерігаються дві смуги – зелено-блакитна (N*) і жовто-руда (T*). Положення і інтенсивність цих смуг залежать від полярності, протондонорної здатності і гливкості середовища [14, 15, 20]. ФМС вигідно вирізняється серед інших класів флуоресцентних зондів тим, що дозволяє одночасно визначати такі фізичні параметри оточення, як локальна діелектрична проникність середовища і коефіцієнт рефракції, а також надає можливість відрізнити полярність оточення, яку спричинено утворенням водневих зв'язків, від неспецифічних міжмолекулярних взаємодій [20]. Дані про флуоресцентні властивості зонда ФМС дозволяють з високою точністю описувати зміни, що відбуваються в його мікрооточенні [21].

На рис. 1, в спостерігається змішана флуоресценція обох форм N* і T* смуг, що підтверджується спектрами флуоресценції цих зразків. Із спектрів, наведених на рис. 5, а, можна бачити, що при зв'язуванні зі сперматозоїдами зонд ФМС має двосмугову флуоресценцію з максимумом при 564 нм (відповідає емісії форми T*) і плечем у ділянці 501 нм (форма N*). У цілому сполучення ФМС з різними ділянками спермальної клітини призводить до збільшення інтенсивності його світіння і проявлення двох смуг в спектрі флуоресценції.

У присутності КП інтенсивність флуоресценції ФМС, який знаходиться у розчині, зростає, однак залишається майже на порядок менше, ніж аналогічний показник для ФМС, зв'язаного зі сперматозоїдами внаслідок меншої гливкості мікрооточення. Спектр вільного зонда в усіх випадках залишається односмуговим, що свідчить про високу концентрацію молекул води в оточенні зонда.

При доданні КП до суспензії сперматозоїдів двосмугова форма спектра ФМС зберігається. Це свідчить про те, що барвник залишається зв'язаним з клітинами. При цьому змінюються співвідношення інтенсивностей смуг N* і T* флуоресценції ФМС, а також положення їх максимумів: довгохвильова смуга T* зсувається в короткохвильовий бік, а короткохвильова N* в присутності ЕГ – приблизно на 2 нм в довгохвильову сторону, а при наявності ДМФА змінюється ще менше. Подібні зміни у положенні спектральних смуг характерні для зростання концентрації води в мікрооточенні зонда, зв'язаного з клітинними структурами [21], і можуть бути використані для оцінки впливу різних КП на гідратацію клітин.

mental physical parameters as local dielectric permeability of medium refraction coefficient as well as it enables to differentiate the polarity of environment caused by the creation of hydrogen bonds from intermolecular interactions [20]. Data on fluorescent properties of FME probe allow with a high accuracy to describe the changes in its environment [21].

Fig. 1 shows mixed fluorescence of both forms N* and T* bonds that is confirmed with the fluorescence spectra of these samples. The spectra demonstrated in Fig. 5, a, show that during binding with spermatozoa FME probe has two-band fluorescence with the maximum at 564 nm (corresponds to T* form emission)

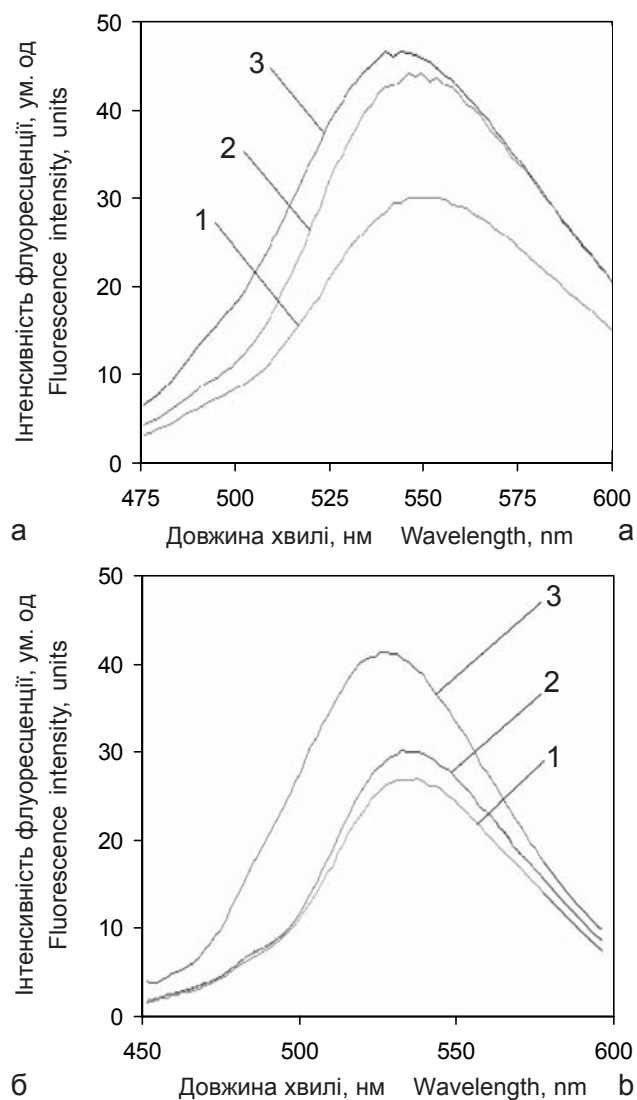


Рис. 4. Спектри флуоресценції зонда E-176 в сперматозоїдах собаки в присутності ДМФА і ЕГ: а) 1 – середовище + E-176; 2 – середовище + E-176+ДМФА; 3 – сперматозоїди + E-176 + ДМФА; б) 1 – середовище + E-176; 2 – середовище + E-176 + ЕГ; 3 – сперматозоїди + E-176 + ЕГ. Концентрація E-176 – $4,5 \times 10^{-6}$ моль/л.

Fig. 4. E-176 fluorescence probe spectra in canine spermatozoa in DMFA and EG presence: a) 1 – medium + E-176; 2 – medium + E-176 + DMFA; 3 – spermatozoa + E-176 + DMFA; b) 1 – medium + E-176; 2 – medium + E-176 + EG; 3 – spermatozoa + E-176 + EG; E-176 concentration is 4.5×10^{-6} mol/l

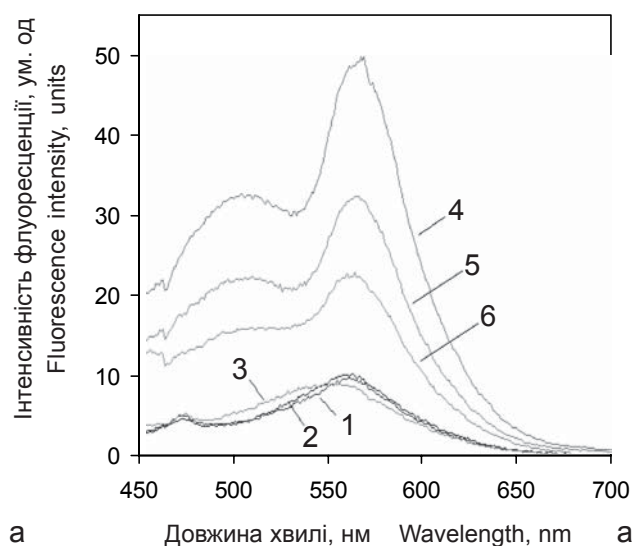
Новий барвник 3-ДАБ, який є похідним бензантрон, має двосмугову флуоресценцію як в середовищі інкубації сперматозоїдів, так і при зв'язуванні з клітинами (рис. 5, б). В останньому випадку переважає короткохвильова смуга флуоресценції з максимумом при 590-596 нм. Інтенсивність обох смуг майже однакова для зонда, який знаходиться в розчині більш гідрофобного КП ДМФА. При зв'язуванні зі сперматозоїдами спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції майже в 3,5 рази без суттєвих змін положення спектра. Враховуючи, що зонд має в своїй структурі гідрофобні бензолні кільця, можна припустити, що він локалізується на початку неполярної ділянки ліпідів мембран клітин. У присутності досліджених КП в спектрах флуоресценції 3-ДАБ на фоні загального зниження інтенсивності флуоресценції спостерігаються зміни внеску в спектр довгохвильової смуги, що вказує на зміни кількості молекул води в мікрооточенні зонда. Ці результати збігаються з даними, отриманими за допомогою зонда ФМС, і дозво-

and shoulder in the area of 501 nm (N* form). Generally FME binding with various areas of sperm cell results in an increase in its luminescence intensity and revealing two bands in fluorescence spectrum.

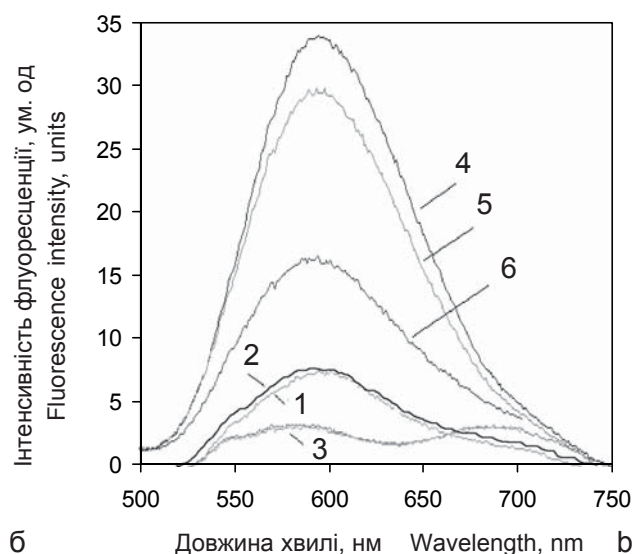
In cryoprotectant presence FME fluorescence intensity being in a solution enhances but it is kept almost one order less than analogous index for FME of bound with spermatozoa due to lower viscosity of micro-environment. Spectrum of free probe in all cases remains one-band that testifies to a high concentration of water molecules in probe environment.

When adding cryoprotectant to suspension of spermatozoa the FME spectrum two-band form is kept. This testifies to the fact that dye remains cell-bound. Herewith the ratio of intensities for FME fluorescence N* and T* is altered, bands as well as position of their maxima: long wave band T* is shifted towards short waves and the short-wave one N* in EG presence towards long wave one approximately by 2 nm and in DMFA presence is even less changed. Similar changes in position of spectral bands are characteristic for rising in concentration of water in probe microenvironment bound with cell structures [2] and may be used to estimate the influence of various cryoprotectants on cell hydration.

New dye 3-DAB being benzatron derivative has two-band fluorescence both in the incubation medium of spermatozoa and during binding with cells (Fig. 5, b). In latter case fluorescence short-wave band prevails with the maximum at 590-596 nm. Intensity of both bands is quite similar for the probe being in the solution of more hydrophobic DMFA. During binding with spermatozoa there is observed the rise in fluorescence intensities almost in 3.5 times with no essential changes in spectrum position. Taking into account that the probe in its structure has hydrophobic benzol rings one may suppose that it is localized at the beginning of non-polar site of cell membrane lipids. In the presence of examined cryoprotectants in 3-DAB fluorescence spectra on a background of general decrease in fluorescence intensity there are found the changes of the contribution into spectrum of long wave band that points to the alterations in the number of water



а



б

Рис. 5. Вплив кріопротекторів на спектри флуоресценції ФМС (а) і 3-ДАБ (б) в середовищі інкубації і сперматозоїдах собак: 1 – середовище інкубації; 2 – середовище + 5% ЕГ; 3 – середовище + 5% ДМФА; 4 – сперматозоїди (контроль); 5 – сперматозоїди + 5% ЕГ; 6 – сперматозоїди + 5% ДМФА. Концентрація барвників: ФМС – $4,1 \times 10^{-6}$ моль/л, 3-ДАБ – $7,3 \times 10^{-6}$ моль/л.

Fig. 5. Effect of cryoprotectants on fluorescents spectra of FME (a) and 3-DAB (b) in incubation medium and canine sperm: 1 – incubation medium; 2 – medium + 5% EG; 3 – medium + 5% DMFA; 4 – spermatozoa (control); 5 – spermatozoa + 5% EG; 6 – spermatozoa + 5% DMFA. Concentration of dyes: FME – 4.1×10^{-6} mol/l, 3-DAB – 7.3×10^{-6} mol/l.

Таблиця 2. Зміни спектрів флуоресценції барвників в середовищі інкубації сперматозоїдів собаки під впливом КП

Table 2. Changes in fluorescent dyes spectra in incubation media of canine spermatozoa under cryoprotectant effect

Зонд Probe	Середовище Medium		Клітини Cells		Середовище + ЕГ Medium + EG		Клітини + ЕГ Cells + EG		Середовище + ДМФА Medium + DMFA		Клітини + ДМФА Cells + DMFA	
	F _m	λ _m	F _m	λ _m	F _m	λ _m	F _m	λ _m	F _m	λ _m	F _m	λ _m
ДСМ DSM	—	—	26	599	24	607	29	605	55	608	64	607
Є-176 E-176	31	547	13	536	34	547	47	540	45	545	47	540
3-ДАБ 3-DAB	11	596	38	596	9	593	31	593	5 5	580 685	17	591
ФМС FME	10 —	560 —	32 48	501 564	10 —	559 —	22 32	503 563	9 —	550 —	16 22	500 561

Примітки: F_m – інтенсивність флуоресценції, ум. од.; λ_m – положення максимуму спектра, нм. Похибка у визначенні положення максимумів спектрів не перевищувала ±2 нм.

Notes: F_m – fluorescence intensity, rel. units; λ_m - spectrum maximum position, nm; deviation in spectra maxima positions did not exceed ±2 nm.

ляють розглядати 3-ДАБ як зонд, придатний для вивчення гідратації сперматозоїдів у присутності КП. Причому з зондом 3-ДАБ спектральні ефекти, спричинені гідратацією, виражені більше.

Вплив КП на основні спектральні параметри досліджуваних барвників в середовищі інкубації і в сперматозоїдах собаки показано в табл. 2.

Висновки

Проведені дослідження показали, що похідні 3-гідроксифлавонолу (новий мультипараметричний зонд ФМС) і бензантрон (новий барвник 3-ДАБ) мають перспективи для вивчення молекулярних механізмів впливу криозахисних додатків на сперматозоїди собаки. У той же час похідна піридину – зонд ДСМ і новий барвник Є-176 мають обмеження при використанні їх для дослідження сперматозоїдів у розчинах КП внаслідок досить сильної фонові флуоресценції.

Виявлений вплив барвників на рухливість сперматозоїдів, на наш погляд, не є фактором, який обмежує їх застосування для оцінки молекулярних механізмів взаємодії КП із структурними елементами клітин, тим більше, що КП часто здатні спричиняти токсичну дію на клітини [7-9]. При необхідності ефект зниження рухливості сперматозоїдів у присутності флуоресцентних барвників може бути суттєво знижений як зменшенням концентрації барвників у суспензії клітин, так і скороченням часу інкубації клітин з барвниками.

Робота виконана при підтримці НАН України (грант 0104U003916).

molecules in probe microenvironment. These results are in accordance with the data obtained with FME probe and enable to consider 3-DAB as the probe capable of examining spermatozoa hydration in presence of cryoprotectants. Moreover with 3-DAB probe the hydration-caused spectral effects are more manifested.

The effect of cryoprotectants on basic spectral parameters of the studied dyes in incubation medium and in canine spermatozoa is presented in Table 2.

Conclusions

The researches performed have shown that 3-hydroxyflavone derivatives (new multi-parameter probe FME) and benzantron (new dye 3-DAB) are perspective for studying molecular mechanisms of the effect of cryoprotective additives on canine spermatozoa. At the same time pyridine derivative, DSM probe and new dye E-176 have limitations if they are used to examine spermatozoa in solutions of cryoprotectants because of quite strong background fluorescence.

Revealed influence of dyes on spermatozoa motility from our point of view is not the factor restricting their use to estimate molecular mechanisms of interaction of cryoprotectants with structural elements of cells, moreover that they frequently are capable of toxic effect on cells [7-9]. If necessary the effect of spermatozoa motility decrease may be significantly reduced with both diminishing the concentration of dyes in suspension of cells and with the shortening the incubation time for cells with dyes.

The work was supported by National Academy of Sciences of Ukraine (Grant 0104U003916)

Література

1. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Роддик Д., Тупс Э. Органические растворители. – М.: "Химия", 1968.– 1450 с.
2. Горбенко Г.П., Дюбко Т.С. Взаимодействие 4-(N-диметил-аминостирил)-1-метилпиридиний -N-толуолсульфоната с липосомами: анализ спектров флуоресценции // Биофизика.– 1996.– Т. 41, №2.– С. 348-354.
3. Горбенко Г.П., Нардид О.А., Дюбко Т.С. Применение анализа неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ для исследования структурных изменений модельных и природных мембран // Біофізичний вісник.– 1998.– Вип. 1.– С. 86-95.
4. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 277 с.
5. Землянских Н.Г., Бабичук Л.А., Дюбко Т.С. Криоконсервирование эритроцитов с непроникающим криопротектором ПЭО-1500. Изучение взаимодействий криопротектора с мембраной при различных температурах // Гематология і переливання крові (Міжвідомчий збірник).– Вип. 32, Ч. 1.– Харків: НТМТ, 2004.– С. 45-52.
6. Лакін Г.Ф. Биометрия.– М.: Высш. школа, 1990.– 352 с.
7. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. I. Цитотоксичность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №2.– С. 72-79.
8. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. II. Криозащитная активность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №4.– С. 43-51.
9. Линник Т.П. Физико-химические факторы криоповреждения и криозащиты сперматозоидов петухов в цикле низкотемпературного консервирования: Автореф. дис. ... докт. биол. наук.– Харьков, 2003.– 36 с.
10. Лисиченко Н.Л., Ромоданова Э.А., Нардид О.А. и др. Структурные изменения в компонентах спермы хряка при воздействии малых доз лазерного излучения // Фотобиология и фотомедицина.– 2000.– №3-4.– С. 86-89.
11. Нардид О.А., Дюбко Т.С. Изменения центров сорбции ДСМ в тенях эритроцитов после действия низкой температуры // Пробл. криобиологии.– 1999.– №1.– С. 26-31.
12. Протица М. Очистка растворителей // Лабораторная техника органической химии.– М.: Мир, 1966.– С. 591-615.
13. Феюняева И.А., Шершуков В.М. Производные 4-(5-орил-2-оксазолил)бензолсульфокислоты, содержащие диметиламиногруппу // Химия гетероциклических соединений.– 1993.– №2.– С. 234-237.
14. Chou P.-T., Martinez M. L., Clements J.-H. Reversal of excitation behavior of proton-transfer vs. charge-transfer by dielectric perturbation of electronic manifolds // J. Phys. Chem.– 1993.– Vol. 97, N4.– P. 2618-2622.
15. Duportail G., Klymchenko A., Mely Y., Demchenko A. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes // FEBS Letters.– 2001.– Vol. 508, N1 – P. 196-200.
16. Dyubko T.S., Nardid O.A., Gorbenko G.P. Study of structural changes in hepatocyte membranes using inhomogeneous broadening analysis of DSM fluorescence spectra // Functional Materials.– 1996.– Vol. 3, N4.– P. 492-495.
17. England G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review // J. Reprod. Fertil.– 1993.– Vol.47, N1.– P. 243–255.
18. Ercelen S., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin // FEBS Letters.– 2003.– Vol. 538, N1.– P. 25-28.
19. Ercelen S., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities // Anal. Chim. Acta.– 2002.– Vol. 464, N1.– P. 273-287.

References

1. Vajsberg A., Proskauer E., Roddik D., Tups E. Organic solvents.– Moscow: Khimiya, 1968.– 1450p.
2. Gorbenko G.P., Dyubko T.S. Interaction of 4-(N-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridine-N-toluolsulfonat with liposomes: analysis of fluorescence spectra // Biofizika.– 1996.– Vol. 41, N2.– P. 86-95.
3. Gorbenko G.P., Nardid O.A., Dyubko T.S. Application of analysis of inhomogeneous broadening of DSM fluorescence spectra to investigate structural changes in model and natural membranes // Biofizychnyj visnyk.– 1988.– Issue 1.– P. 86-95.
4. Dobretsov G.E. Fluorescent probes in studying cells, membranes and lipoproteins.– Moscow: Nauka, 1989.– 277p.
5. Zemlyanskikh N.G., Babichuk L.A., Dyubko T.S. Cryopreservation of erythrocytes with non-penetrating cryoprotectant PEO-1500. Investigation of interactions of cryoprotectant with membrane at various temperatures // Gematologiya i perelivanie krovi (interdepartmental collection of papers) – Issue 32, part 1.– Kharkiv: NTMT, 2004.– P. 45-52.
6. Lakin G.F. Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1990.– 352 p.
7. Linnik T.P., Bizikina O.V. Cryopreservation of fowl sperm. 1. Cytotoxicity of diols and amides // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2.– P. 72-79.
8. Linnik T.P., Bizikina O.V. Cryopreservation of fowl sperm. 1. Cryoprotective activity of diols and amides // Problems of Cryobiology.– 2001.– N4.– P. 43-51.
9. Linnik T.P. Physical and chemical factors of cryodamage and cryoprotection of fowl spermatozoa in the cycle of low temperature preservation: author's thesis for doctor of biol. sci. degree.– Kharkov, 2003.– 36 p.
10. Lisichenko N.L., Romodanova E.A., Nardid O.A. et al. Structural changes in sperm components of hog at the effect of low irradiation doses // Fotobiologiya i fotomeditsyna.– 2000.– N3-4.– P. 86-89.
11. Nardid O.A., Dyubko T.S. Change in centers of DSM sorption in erythrocyte ghosts after low temperature effect // Problems of Cryobiology.– 1999.– N1.– P. 26-31.
12. Protiva M. Purification of solvents. Laboratory technique of organic chemistry.– Moscow: Mir, 1966.– P. 591-615.
13. Fedyunyaeva I.A., Shershukov V.M. Derivatives of 4-(5-oryl-2oxazoly)benzene sulphonic acid, containing dimethyl amino group // Khimiya geterociklicheskih soyedineniy.– 1993.– Issue 2.– P. 234-237.
14. Chou P.-T., Martinez M. L., Clements J.-H. Reversal of excitation behavior of proton-transfer vs. charge-transfer by dielectric perturbation of electronic manifolds // J. Phys. Chem.– 1993.– Vol. 97, N4.– P. 2618-2622.
15. Duportail G., Klymchenko A., Mely Y., Demchenko A. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes // FEBS Letters.– 2001.– Vol. 508, N1 – P. 196-200.
16. Dyubko T.S., Nardid O.A., Gorbenko G.P. Study of structural changes in hepatocyte membranes using inhomogeneous broadening analysis of DSM fluorescence spectra // Functional Materials.– 1996.– Vol. 3, N4.– P. 492-495.
17. England G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review // J. Reprod. Fertil.– 1993.– Vol.47, N1.– P. 243–255.
18. Ercelen S., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin // FEBS Letters.– 2003.– Vol. 538, N1.– P. 25-28.
19. Ercelen S., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities // Anal. Chim. Acta.– 2002.– Vol. 464, N1.– P. 273-287.
20. Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer // Phys. Chem. Chem. Phys.– 2003.– Vol. 5, N2.– P. 461-468.

20. *Klymchenko A.S., Demchenko A.P.* Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer // *Phys. Chem. Chem. Phys.*– 2003.– Vol. 5, N2.– P. 461-468.
21. *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.
22. *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, N2.– P. 134-142.
23. *Ormsen 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.
21. *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.
22. *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, N2.– P. 134-142.
23. *Ormsen 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.

Accepted in 14.12.2004

Надійшла 14.12.2004