

## Зависимость проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул криопротекторов от температуры

UDC 57.043:579.2:57.086.8

N.A. CHERNOBAY, I.F. KOVALENKO, S.V. KOSCHIY, S.E. KOVALENKO, L.F. ROZANOV\*

### Temperature Dependence of SPEV Cell Membranes Permeability for Molecules of Cryoprotectants

Методом волюмометрии определены коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул этиленгликоля (ЭГ), 1,2-бутандиола (1,2-БД), глицерина, диметилсульфоксида (ДМСО) и диметилформамида (ДМФА) при температурах 35, 20 и 5°C. Значения энергии активации процесса переноса молекул ЭГ, 1,2-БД и ДМСО через плазматическую мембрану в диапазоне температур 35...5°C близки и примерно в 3 раза выше, чем энергия активации транспорта глицерина. При 5°C коэффициенты проницаемости глицерина и 1,2-БД практически одинаковы, ДМСО и ЭГ примерно в 3 раза больше, а ДМФА выше на четыре порядка. При 35°C проницаемость ДМФА сравнима с проницаемостью воды, а коэффициент проницаемости глицерина на порядок меньше, чем коэффициенты проницаемости ЭГ, 1,2-БД и ДМСО.

**Ключевые слова:** коэффициент проницаемости, энергия активации, клетки СПЭВ, волюмометрия.

Методом волюмометрії визначені коефіцієнти проникності мембран клітин СПЕВ для молекул етиленгліколю (ЕГ), 1,2-бутандіолу (1,2-БД), гліцерину, диметилсульфоксиду (ДМСО) та диметилформаміду (ДМФА) при температурах 35, 20 та 5°C. Значення енергії активації процесу переносу молекул ЕГ, 1,2-БД та ДМСО крізь плазматичну мембрану в діапазоні температур 35...5°C близькі та приблизно у три рази вище, ніж енергія активації транспорту гліцерину. При 5°C коефіцієнти проникності гліцерину та 1,2-БД практично не відрізняються, ДМСО та ЕГ приблизно у три рази більші, а ДМФА вище на чотири порядки. При 35°C проникність ДМФА може бути порівняна з проникністю води, а коефіцієнт проникності гліцерину на порядок менший, ніж коефіцієнти проникності ЕГ, 1,2-БД та ДМСО.

**Ключові слова:** коефіцієнт проникності, енергія активації, клітини СПЕВ, волюмометрія.

Using the method of volumetry the permeability coefficients of SPEV cell membranes for molecules of ethylene glycol (EG), 1,2-butane diol (1,2-BD), glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) and dimethyl formamide (DMFA) at 35, 20 and 5°C have been determined. The activation energy values of transport for molecules of EG, 1,2-BD and DMSO through the plasma membrane in temperature range of 35...5°C are close and approximately three times as higher than the activation energy of glycerol transport. The permeability coefficients at 5°C for glycerol and 1,2-BD are almost the same, for DMSO and EG are approximately three times as higher, and the permeability coefficient for DMFA is four orders higher. The permeability for DMFA molecules at 35°C is comparable with permeability of molecules of water, and the permeability coefficients for glycerol are one order lower, than the ones for EG, 1,2-BD and DMSO.

**Key words:** permeability coefficients, activation energy, SPEV cells, volumetry.

Проницаемость плазматических мембран для молекул воды и криопротекторов является важнейшей криобиологической характеристикой, определяющей в процессе криоконсервирования осмотическое поведение клеток, от которого зависит их выживаемость после отогрева и переноса в изотоническую среду [2]. Известно, транспорт веществ в клетку зависит как от их структурной организации и геометрических параметров молекул [3, 8], так и от структурной организации биомембран [4, 12], обусловленной видовой и тканевой специфичностью клеток. В работе [13] определены коэффициенты проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для ряда криопротекторов в зоне температур 35...5°C. Цель исследования – определить коэффициенты проницаемости мемб-

Permeability of plasma membranes for water molecules and cryoprotectants is the most important cryobiological feature determining the cell osmotic behavior during cryopreservation, which affect cell viability after thawing and transfer into isotonic medium [2]. The transport of substances into a cell is known to depend on their molecular structure and geometrical parameters [3, 8], as well as on the biological membrane structure [4, 12], determined by cell origin (species, tissues, etc.). Recently we determined the permeability coefficients of testes interstium cell membranes for some cryoprotectants within the temperature range 35...5°C [13]. The aim of this research is to determine permeability coefficients of cell membranes of SPEV finite cell culture under the same experimental conditions (35...5°C).

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-38-71, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereiaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ран клеток перевиваемой клеточной культуры СПЭВ в тех же экспериментальных условиях (35...5°C).

### Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки перевиваемой клеточной культуры СПЭВ (эмбриональная почка свиньи). Перевиваемая клеточная линия СПЭВ была выращена при 37°C в культуральных матрасах в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 ед/мл канамицина [5]. В работе использовали 1М растворы 1,2-бутандиола (1,2-БД), глицерина, этиленгликоля (ЭГ), диметилсульфоксида (ДМСО) и диметилформамида (ДМФА), приготовленные на 0,15 М NaCl из очищенных криопротекторов.

Все указанные вещества применяются в практике криоконсервирования. Глицерин, испытанный в различных схемах криозащиты, практически используется в низкотемпературных банках крови [7], ЭГ входит в состав криозащитных сред эмбрионов и яйцеклеток млекопитающих [10], ДМСО широко применяется при консервировании стволовых и стероидпродуцирующих клеток, клеточных культур и эмбрионов [1, 9, 14, 15]. ДМФА проявляет высокую эффективность при криоконсервировании спермы птиц [6].

Микроскопические исследования проводили на микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с термостатируемым столиком при температурах 35, 20 и 5°C.

Осмотические реакции клеток СПЭВ изучали, фотографируя их с регистрацией времени контакта с исследуемыми растворами. Для определения геометрических параметров клеток использовали данные морфометрии. Полученные данные представляли в виде зависимостей относительных объемов ( $V/V_0$ ,  $V_0$  – начальный объем) отдельных клеток от времени экспозиции в исследуемых растворах.

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток СПЭВ для молекул криопротекторов ( $K_1$ ) определяли, сопоставляя экспериментальные зависимости относительных объемов клеток от времени  $y(t)$  с решениями уравнений теоретической модели для заданных экспериментальных условий [2]. Энергию активации ( $E_A$ ) процесса переноса веществ через мембраны клеток СПЭВ рассчитывали из зависимостей  $\ln K_1(1/T)$ , наклон которых согласно уравнению Аррениуса равен  $E_A/R$ , где  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

### Результаты и обсуждение

На рисунке приведены характерные экспериментальные зависимости объемов клеток СПЭВ

### Materials and methods

The research objects were the cells of finite SPEV cell culture (porcine embryonic kidney cells). Finite SPEV cell line was grown at 37°C in cultural flasks in medium 199 supplemented with 10% fetal calf serum and 100 units/ml of kanamycine [5]. The solutions of 0.15 M NaCl supplemented with 1 M of purified cryoprotectants 1,2-butane diol (1,2-BD), ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO) and dimethyl formamide (DMFA) were used in the study.

All mentioned substances are applied in cryopreservation practice. Glycerol was thoroughly tested in various protocols of cryoprotection and now is used in practice of low-temperature blood banks [7], EG is applied as a part of cryoprotective media for mammal embryos and oocytes [10], DMSO is widely used during cryopreservation of stem cells, steroid-producing cells, cell cultures and embryos [1, 9, 14, 15]. DMFA is reported to be highly efficient during cryopreservation of avian sperm [6].

Microscopic investigations were performed using microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) with thermostated table at 35, 20 and 5°C.

Osmotic reactions of SPEV cells were studied using the image recording and controlling the time of contact of cells with the investigated solutions. For determination of cell geometrical parameters the morphometrical data were used. The findings were presented as the dependencies of normalized volumes ( $V/V_0$ ,  $V_0$  is an initial volume) of single cells vs. time of exposure in the investigated solutions.

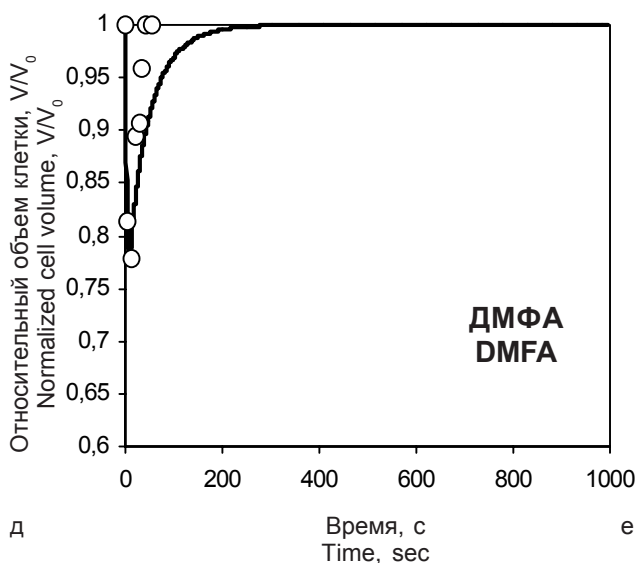
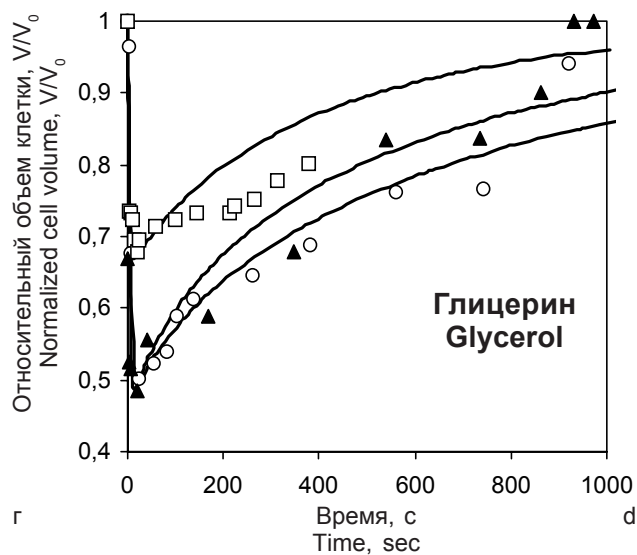
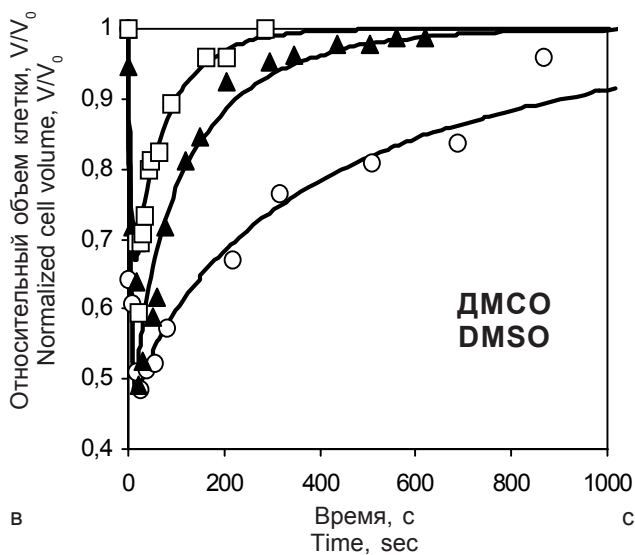
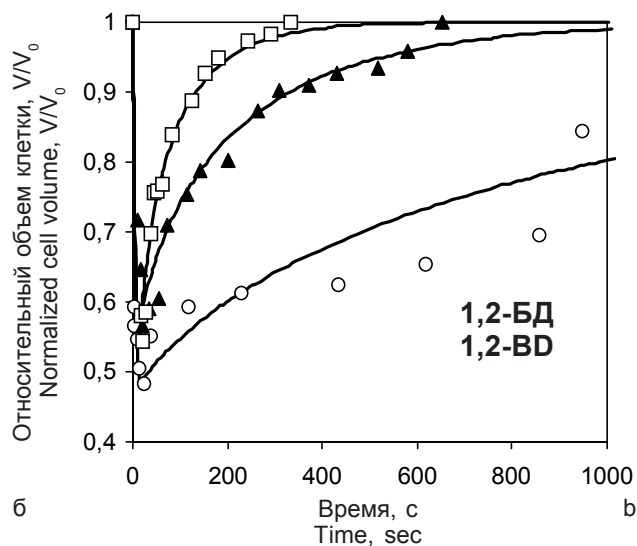
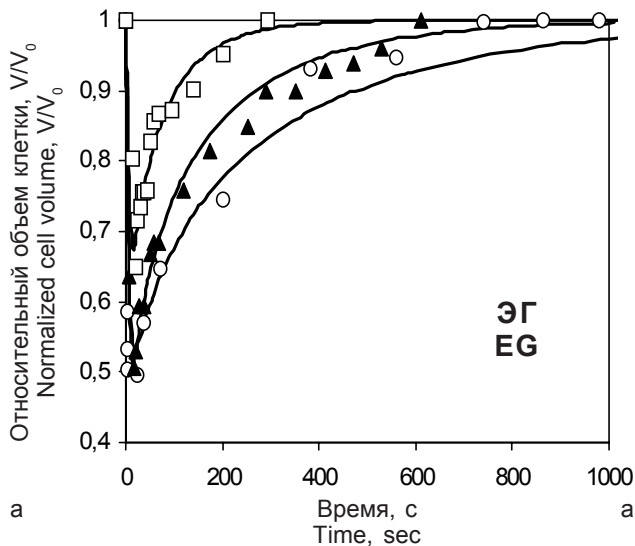
Permeability coefficients of SPEV cell plasma membranes for cryoprotectant molecules ( $K_1$ ) were determined fitting the experimental dependencies of cell normalized volumes vs. time  $y(t)$  and the curve resulted from data of solved theoretical model equations in given experimental conditions [2]. Activation energy ( $E_A$ ) of the transfer of substances through SPEV cell membranes were calculated using  $\ln K_1(1/T)$  dependencies, which slope according to Arrhenius equation is equal to  $E_A/R$ , where  $R$  is universal gas constant.

Statistical processing of experiment results was made by Student-Fisher method.

### Results and discussion

The Figure represents the characteristic experimental dependencies of SPEV cell volumes vs. time of contact with 1 M solutions of EG, 1,2-BD, DMSO, DMFA and glycerol at 35, 20, and 5°C as well as theoretical curves extrapolating the osmotic behavior of cells.

Experimental dependencies of normalized cell volume vs. time of exposure in the solutions of investigated cryoprotectants are well approximated by the curves resulted from utilized theoretical model [2] after performing the proper selection of permeability coefficients of cell membranes for water and cryoprotectant molecules.



Экспериментальные зависимости относительных объемов клеток СПЭВ от времени контакта с 1М раствором ЭГ (а), 1,2-БД (б), ДМСО (в) глицерина (г), ДМФА (д) и теоретические кривые (линии), экстраполирующие осмотическое поведение клеток при температурах 35 (□); 20 (▲) и 5°C (○).

Experimental dependencies of SPEV cell normalized volumes vs. time of contact with 1 M EG (a), 1,2-BD (b), DMSO (c), glycerol (d), DMFA (e) solutions and theoretical curves (solid lines), extrapolating osmotic behavior of cells at temperatures 35 (□); 20 (▲) and 5°C (○).

от времени контакта с 1 М растворами ЭГ, 1,2-БД, ДМСО, ДМФА и глицерина при температурах 35, 20 и 5°C, а также экстраполирующие осмотическое поведение клеток теоретические кривые.

Экспериментальные зависимости относительного объема клеток от времени экспозиции в растворах исследуемых криопротекторов хорошо аппроксимируются решениями используемой нами теоретической модели [2] при соответствующем подборе коэффициентов проницаемости клеточных мембран для молекул воды и криопротектора.

Как видно из рисунка, после помещения клеток в 1М растворы исследуемых веществ объем клеток уменьшается за счёт их обезвоживания. После этого регистрируется увеличение объема клеток – регидратация, которая приводит к полному восстановлению исходных значений объемов, причем этот процесс протекает тем быстрее, чем выше температура исследуемого раствора. Скорость восстановления объема клеток лимитируется скоростью поступления криопротектора в клетку.

В результате проведенных исследований определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток СПЭВ для криопротекторов при температурах 35, 20 и 5°C. Результаты экспериментов, рассчитанная энергия активации переноса молекул криопротекторов через мембрану клеток СПЭВ, а также соответствующие коэффициенты распределения исследуемых веществ в системе “вода-октанол” приведены в таблице.

Из представленных в таблице данных следует, что при температуре 5°C осмотическое поведение клеток СПЭВ в растворах 1,2-БД и глицерина отличается незначительно. ЭГ и ДМСО проникают в клетки СПЭВ быстрее, коэффициенты их проницаемости примерно в 3 раза выше. Проникающая способность молекул ДМФА оказалась чрезвычайно высокой, коэффициент проницаемости плазматических мембран для этого криопротектора при 5°C на четыре порядка превышал коэффициент проницаемости для ДМСО. В 1М растворе ДМФА при температуре 5°C обезвоженные клетки восстанавливают исходный объем на 95% менее чем за 1 мин. При температурах 20 и 35°C значимых изменений объема клеток не зафиксировано, что может свидетельствовать о том, что при этих температурах проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул ДМФА сравнима с проницаемостью молекул воды.

При 5°C криопротекторы по проникающей способности через мембраны клеток СПЭВ образуют ряд: ДМФА >> ЭГ > ДМСО > глицерин ≈ 1,2-БД. При 35°C коэффициент проницаемости для 1,2-БД на порядок выше, чем для глицерина. Наименьшим значением энергии активации (если исключить ДМФА, значение энергии активации переноса молекул которое нам определить не удалось) ха-

As Figure shows, after placing the cells in 1 M solutions of investigated substances a cell volume decreases due to cell dehydration. Then an increase of cell volume is recorded and it leads to a complete restoration of initial volume values, moreover, the higher is temperature of investigated solution the more rapid is this process. The rate of cell volume restoration is limited by the rate of entering of the cryoprotectant molecules into the cell.

As a result of carried-out investigations the permeability coefficients of SPEV cell plasma membranes for cryoprotectants at 35, 20 and 5°C are determined. The results of experiments, calculated activation energy of cryoprotectant molecules' transfer through SPEV cell membrane as well as corresponding distribution coefficients of investigated substances in “water-octanol” system are presented in the Table.

It proceeds from the data of the presented Table that at 5°C the osmotic behavior of SPEV cells in 1,2-BD solutions and glycerol differs insignificantly. EG and DMSO penetrate into SPEV cells more quickly, their permeability coefficients are approximately 3 times higher. Permeability of DMFA molecules occurred to be extremely high, and permeability coefficient of plasma membranes for this cryoprotectant at 5°C is 4 orders higher than the permeability coefficient for DMSO. In 1 M solution of DMFA at 5°C the dehydrated cells restore the 95% initial volume less than in 1 min. At 20 and 35°C no significant changes of cell volume were recorded, testifying to the fact that at these temperatures the permeability of SPEV cell membranes for DMFA molecules is comparable with permeability for water molecules.

At 5°C the cryoprotectants form the following series in accordance with their parameters of permeability through SPEV cell membranes: DMFA >> EG > DMSO > glycerol ≈ 1.2-BD. At 35°C permeability coefficient for 1.2-BD is higher than for glycerol. The lowest value of activation energy (without considering DMFA, which activation energy of molecule transfer we did not succeed to determine) has glycerol, and activation energy values for transferring the molecules of EG, 1,2-BD and DMSO are almost equal to each other. The low value of glycerol molecule transfer activation energy allows the suggestion that the decrease of temperature insignificantly influences the conductivity of glycerol transport “channel”. Stated differently, the penetration of other cryoprotectants is occurred through a lipid bilayer, aggregate state of which significantly depends on temperature, or through the channels changing their conductivity due to temperature variations, whereas the channels of SPEV cell through which the glycerol penetrates are characterized by low conductivity for glycerol, but their structure is not changed significantly within the studied temperature range. Nowadays the presence of this type of channels is shown for the variety of cells [11].



рактируется глицерин, значения энергии активации переноса молекул ЭГ, 1,2-БД и ДМСО близки. Низкая энергия активации транспорта молекул глицерина позволяет предположить, что понижение температуры слабо влияет на проводимость “канала” его переноса. Иными словами, если проникновение других криопротекторов осуществляется через липидный бислой, агрегатное состояние которого существенно зависит от температуры, или каналы, изменяющие свою проводимость при изменении температуры, то каналы клеток СПЭВ, через которые преимущественно проникает глицерин, отлича-

ются низкой проводимостью для глицерина, но существенно не изменяют своей структуры при изученных температурах. В настоящее время наличие такого типа каналов показано для целого ряда клеток [11]. Эти каналы формируют белковые структуры – акваглицеропорины. Обращает на себя внимание отсутствие корреляции в выбранном ряду криопротекторов между коэффициентами проницаемости для их мембран и коэффициентами распределения криопротекторов в системе “октанол-вода”. В частности, корреляцию нарушает ДМФА, что позволяет предположить особый путь его прохождения через клеточную мембрану. В отношении возможности проникновения ЭГ через мембранные поры предположения уже высказывались [3], остается только неясным, почему проводимость этих пор с понижением температуры снижается.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов нам удалось не только оценить значения проницаемости исследуемых веществ через мембраны клеток СПЭВ, но и сделать предположение о путях их проникновения.

## Выводы

1. Проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул исследованного ряда криопротекторов снижается в диапазоне температур 35–5°C. При этом значения энергии активации процесса переноса через мембрану молекул ЭГ, 1,2-БД и ДМСО примерно в 3 раза выше, чем значение энергии активации транспорта глицерина.

2. При 5°C коэффициенты проницаемости глицерина и 1,2-БД практически одинаковы, коэффи-

Коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для криопротекторов и энергия активации процесса переноса в интервале температур 35...5°C  
Permeability coefficients of SPEV cell membranes for cryoprotectants and activation energy of transfer within temperature interval of 35...5°C

Криопротектор Cryoprotectant	Коэффициент проницаемости, ×10 <sup>7</sup> , м/с Permeability coefficient, ×10 <sup>7</sup> , m/s			Энергия активации, кДж/моль Activation energy, kJ/mol	Коэффициент распределения* Distribution coefficient*
	5°C	20°C	35°C		
Глицерин Glycerol	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,19 ± 0,05	23,31	0,005
ЭГ EG	0,24 ± 0,09	0,33 ± 0,11	4,03 ± 1,20	67,14	0,04
ДМФА DMFA	196,5 ± 21,9	–	–	–	0,233
ДМСО DMSO	0,19 ± 0,08	0,50 ± 0,16	3,40 ± 1,30	68,44	0,243
1,2-БД 1,2-BD	0,07 ± 0,01	0,34 ± 0,03	1,17 ± 0,35	66,99	0,308

**Примечание:** \* – коэффициент распределения в системе “октанол-вода”, использованы данные работы [6].

**Note:** \* – coefficient of distribution in “water-octanol” system, data of the report [6] are used.

These channels are formed by protein structures, the aquaglyceroporines. Of attention is the fact about the absence of correlation in the chosen range of cryoprotectants between permeability coefficients of their membranes and distribution coefficients for cryoprotectants in “octanol-water” system. In particular, DMFA breaks this correlation that allows the suggesting of specific way of its penetration through cell membrane. There is a notion concerning the possible penetration of EG through membrane pores [3], but it remains unclear, why the the conductivity of these pores decreases together with the temperature reduction.

Thus, as a result of carried-out experiments we managed both to evaluate the permeability through SPEV cell membranes for investigated substances and hypothesise the ways of their penetration.

## Conclusions

1. Permeability of SPEV cell membranes for molecules of investigated cryoprotectant range decreases within 35–5°C temperature range. Moreover, the values of activation energy of transfer through SPEV cell membrane for molecules of EG, 1,2-BD and DMSO are approximately 3 times higher than the value of activation energy for transport of glycerol.

2. The permeability coefficients of glycerol and 1,2-BD are almost equal at 5°C, and the permeability coefficients of DMSO and EG are approximately 3 times higher and permeability coefficient of DMFA 4 orders higher.

3. The DMFA permeability at 35°C is almost the same as for water, and permeability coefficient of glycerol is lower than the permeability coefficients of EG, 1,2-BD and DMSO.

циенты проницаемости ДМСО и ЭГ примерно в 3 раза больше, а коэффициент проницаемости ДМФА выше на четыре порядка.

3. При 35°C проницаемость ДМФА сравнима с проницаемостью воды, а коэффициент проницаемости глицерина на порядок меньше, чем коэффициенты проницаемости ЭГ, 1,2-БД и ДМСО.

### Литература

1. Бондаренко Т.П., Легач Е.И. Криоконсервирование адренокортикальной ткани и ее использование в клинике // Клінічна фармація.– 1998.–Т. 3, №2.– С. 112–115.
2. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 143 с.
3. Гордиенко О.І., Ліннік Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Біофізичний вісник.– 2002.– Вип. 2(11)– С. 43–47.
4. Коваленко Г.В., Коваленко И.Ф., Линник Т.П. Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда амидов и диолов // Проблемы криобиологии.– 2007.– Т. 17, №4.– С. 365–373.
5. Криобиология и криотехнология / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1987.– 216 с.
6. Ліннік Т.П. Фізико-хімічні фактори кріопшкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис. ... доктора біол. наук.– Харків, 2003.–36 с.
7. Орлик В.В. Некоторые лабораторно-клинические аспекты сравнительного изучения криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах –40 и –20°C // Гематология и трансфузиология.– 1999.– №6.– С. 17–19.
8. Пирюзян Л.А. Действие физиологических активных соединений на биологические мембраны.– М.: Наука, 1974.– 387 с.
9. Розанов Л.Ф., Высеканцев И.П., Петренко Т.Ф. и др. Чувствительность клеток перевиваемой клеточной линии СПЭВ и грибов *Candida albicans* к процессам вне- и внутриклеточной кристаллизации // Проблемы криобиологии.– 2004.– №3.– С. 18–25.
10. Смольянинова Е.И., Погорелов А.Г., Лисина Е.Г. и др. Влияние среды замораживания на жизнеспособность и катионный состав ранних эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 310.
11. Титовец Э.П. Аквапорины человека и животных: Фундаментальные и клинические аспекты.– Минск: Белорусская наука, 2007.– 239 с.
12. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.– 216 с.
13. Чернобай Н.А., Пахомов А.В., Коваленко И.Ф. и др. Зависимость проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для молекул ряда криопротекторов от температуры // Проблемы криобиологии.– 2010.– Т. 20, №2.– С. 153–158.
14. Skorobogatova N.G., Novikov A.N., Gryschuk V.P. et al. Cryopreservation of freshly isolated and expanded mesenchymal stem/progenitor cells derived from human fetal liver // Cryobiology.– 2009.– Vol. 59, N3.– P. 417.
15. Tounson A., Peura A., Freemann L., Kirby C. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos // Fertil. Steril.– 1988.– Vol. 49, N3.– P. 822–826.

Поступила 13.12.2010  
Рецензент Т.П. Линник

### References

1. Bondarenko T.P., Legach E.I. Cryopreservation of adrenocortical tissue and its application in clinics // Klinichna Farmatsiya.– 1998.– Vol. 3, N2.– P. 112–115.
2. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of cell suspension low-temperature preservation.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 143 p.
3. Gordienko O.I., Linnik T.P. Penetration mechanisms of non-electrolytes of diol chain through erythrocyte membranes // Biophysical Bulletin.– 2002.– Issue 2(11)– P. 43–47.
4. Kovalenko G.V., Kovalenko I.F., Linnik T.P. Permeability of rat and rabbit erythrocyte membranes for cryoprotectants of amides and diols row // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 365–373.
5. Cryobiology and cryotechnology / Ed. by A.A. Tsutsayeva.– Kiev.: Naukova Dumka, 1987.– 216 p.
6. Linnik T.P. Physical-chemical factors of cryodamages and cryoprotection of fowl spermatozoa in low-temperature preservation cycle: Author's abstract of thesis ... of doctor of biological sciences.– Kharkov, 2003.– 36 p.
7. Orlik V.V. Some laboratory-clinical aspects of comparative study of erythrocyte cryopreservation at moderately low temperatures –40 and –20°C // Gematologiya i Transfuziologiya.– 1999.– N6.– P. 17–19.
8. Piruzyan L.A. Influence of physiological active compounds on biological membranes.– Moscow: Nauka, 1974.– 387 p.
9. Rozanov L.F., Vysekantsev I.P., Petrenko T.F. et al. Cell sensitivity of recultured cellular SPEV line and *Candida albicans* fungi to extra- and intracellular crystallization processes // Problems of Cryobiology.– 2004.– N3.– P. 18–25.
10. Smolyaninova E.I., Pogorelov A.G., Lisina E.G. et al. Influence of freezing medium on viability and cationic composition of early mice embryos // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 310.
11. Titovets E.P. Human and mammal aquaporins: Fundamental and clinical aspects.– Minsk: Belorusskaya Nauka, 2007.– 239 p.
12. Chernitsky E.A., Vorobey A.V. Structure and functions of erythrocytic membranes.– Nauka i tekhnika, 1981.– 216 p.
13. Chernobay N.A., Pahomov A.V., Kovalenko I.F. et al. Temperature dependence of testes interstium cell membrane permeability for cryoprotectant molecules // Problems of Cryobiology.– 2010.– Vol. 20, N2.– P. 153–158.
14. Skorobogatova N.G., Novikov A.N., Gryschuk V.P. et al. Cryopreservation of freshly isolated and expanded mesenchymal stem/progenitor cells derived from human fetal liver // Cryobiology.– 2009.– Vol. 59, N3.– P. 417.
15. Tounson A., Peura A., Freemann L., Kirby C. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos // Fertil. Steril.– 1988.– Vol. 49, N3.– P. 822–826.

Accepted in 13.12.2010