УДК 577.352.462/464:57.089.32:547.422 *UDC 577.352.462/464:57.089.32:547.422*

Влияние концентрации этиленгликоля на проницаемость мембран одно- и двухклеточных эмбрионов мыши

О.В. Пишко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Ethylene Glycol Concentration on Membrane Permeability of One- and Two Cell Murine Embryos

O.V. Pishko

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

Определены коэффициенты проницаемости одно- и двухклеточных эмбрионов для молекул этиленгликоля (ЭГ) и воды с использованием метода волюмометрии и физико-математической модели, описывающей процессы массообмена между клеткой и окружающей ее средой. Показано, что дробление не отражается на транспортных характеристиках мембран, но повышает их устойчивость к действию увеличенных концентраций криопротектора.

Ключевые слова: эмбрион, этиленгликоль, коэффициент проницаемости.

Визначено коефіцієнти проникності одно- та двоклітинних ембріонів миші для молекул етиленгліколю та води з використанням методу волюмометрії і фізико-математичної моделі, яка описує процеси масообміну між клітиною та оточуючим її середовищем. Показано, що дроблення не впливає на транспортні характеристики мембран, але підвищує їх стійкість до дії збільшених концентрацій кріопротектора.

Ключові слова: ембріон, етиленгліколь, коефіцієнт проникності.

The permeability coefficients for one- and two-cell embryos for ethylene glycol (EG) and water molecules using the volumetry method and physical-chemical model, describing the mass exchange processes between a cell and its environment, were determined. The cleavage was shown as not affecting the transport characteristics of membranes, but augmenting their resistance to the increased cryoprotectant concentration effect.

Key-words: embryo, ethylene glycol, permeability coefficient.

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток для молекул криопротекторов и воды, наряду с поверхностно-объемным отношением, осмотически неактивным объемом клеток и их концентрацией в суспензии, определяют как осмотическое поведение, так и конечную сохранность клеток при криоконсервировании [2].

Изменения осмотического давления внеклеточной среды, вызываемые процедурой криоконсервирования, отражаются на содержании внутриклеточной воды в клетках, величине клеточного объема и степени деформации мембранных структур [1, 6, 8, 9]. На этапе добавления криопротектора клетки могут погибнуть от гипертонического стресса [7-9], на этапе удаления – в результате постгипертонического стресса [2]. При замораживании дегидратация может стать как причиной повреждения в результате гипертонического стресса, так и способом предотвращения внутриклеточного кристаллообразования [1, 9]. Определение коэффициентов проницаемости клеток для криопротекторов и воды является необходимым условием прогнозирования осмотического поведения клеток в процессе криоконсервирования. Такое прогнозирование позволит

Адрес для корреспонденции: Пишко О.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 772-88-71, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Permeability coefficients for cell plasmatic membranes of cryoprotectant and water molecules along with a surface-volume ratio, osmotically inactive cell volume and their concentration in a suspension, determine both an osmotic behaviour and a final cell integrity during cryopreservation [2].

The changes in an osmotic pressure of extracellular medium, caused by cryopreservation procedure, affect the content of intracellular water in cells, a value of cell volume and a degree of membrane structure deformation [1, 6, 8, 9]. At the stage of a cryoprotectant addition the cells can die because of a hypertonic stress [7-9], and as a result of a posthypertonic stress when removing [2]. Under freezing the dehydration can be both the cause of a damage as a result of hypertonic stress and a preventive way for intracellular crystal formation [1, 9]. The determination of cell permeability coefficients for cryoprotectants and water is an important condition to forecast an osmotic behaviour of cells during cryopreservation. Such a forecasting will allow to avoid the reaching by a cell of extreme states or to reduce the time of its staying under these states.

The bases for a quantitative description of cell osmotic behaviour as well as for determination of the cell membrane permeability coefficients for water and

Address for correspondence: Pishko O.V., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 7728871, fax: +38 (057) 7720084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

избежать достижения клеткой экстремальных состояний или сократить время ее нахождения в этих состояниях.

Основой для количественного описания осмотического поведения клеток, равно как и для определения коэффициентов проницаемости клеточных мембран для воды и криопротекторов, служат физико-математические модели, описывающие транспорт через клеточную мембрану растворенного вещества (проникающего криопротектора) и растворителя (воды). Теоретическое описание осмотического поведения клеток на основных этапах криоконсервирования возможно путем подстановки в уравнения модели известных коэффициентов проницаемости и параметров, характеризующих предполагаемые условия эксперимента. Для определения коэффициентов проницаемости динамика осмотического поведения клеток, изученная в конкретно заданных условиях, аппроксимируется решением уравнений модели при наиболее оптимальных значениях искомых коэффициентов методом наименьших квадратов.

Цель данной работы – определение коэффициентов проницаемости одно- и двухклеточных эмбрионов мыши для молекул воды и ЭГ с оценкой возможного влияния [4] на эти коэффициенты концентрации криопротектора.

Материалы и методы

Объектами исследования служили одно- и двухклеточные эмбрионы мыши линии СВА 6-, 8-недельного возраста. Для получения большого количества клеток использовали метод суперовуляции [3]. Самкам проводили внутрибрюшинную инъекцию 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (Folligon, "Intervet", Holland) и 7.5 МЕ человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) (Folligon, "Intervet", Holland) с интервалом 46-48 ч. После введения чХГ самок подсаживали к самцам той же линии для осеменения.

Эмбрионы получали промыванием отпрепарированных яйцеводов самок мышей физиологической средой Дюльбекко при комнатной температуре по стандартной методике [3]: одноклеточные эмбрионы получали через 20-22, а 2-клеточные – через 48 ч после введения чХГ. Для удаления клеток кумулюса у одноклеточных эмбрионов использовали кратковременную эквилибрацию клеток в растворе гиалуронидазы (0,1 мг/л). Полученные эмбрионы трижды отмы-вали в среде Дюльбекко и сразу же использовали в эксперименте.

В работе применяли 10-, 20-, 30%-е (объем/объем) растворы ЭГ, приготовленные на физиологической среде Дюльбекко. Кинетику осмотической реакции клеток в указанных растворах исследовали при комнатной температуре (18-19°С) методом световой микроскопии.

cryoprotectants are the physical and mathematical models, describing the transport of a solute (penetrating cryoprotectant) and a solvent (water) through a membrane. A theoretical description of cell osmotic behaviour at the principal stages of cryopreservation is possible via the introduction into the model equations of known permeability coefficients and the parameters, characterising the supposed experimental conditions. In order to determine the permeability coefficients the dynamics of cell osmotic behaviour, studied under properly set conditions, is approximated by solving the model equations under the most optimal values for the coefficients to be found using the method of least squares.

The aim of this work was to determine the permeability coefficients of one- and two-cell murine embryos for water and EG molecules with the evaluation of a possible effect [4] on these coefficients of a cryoprotectant concentration.

Materials and methods

The research objects were one- and two-cell embryos of 6-8 weeks' CBA mice. In order to procure a big number of cells there was used the superovulation method [3]. The females were intraperitoneally injected with 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (Folligon, "Intervet", Holland) and 7.5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) (Folligon, "Intervet", Holland) with 46-48 hrs' interval. After hCG injection the females were placed together with males of the same line for insemination.

The embryos were obtained by washing out of prepared oviducts of murine females with Dulbecco's physiological solution under room temperature according to the routine methods [3]: one-cell embryos were procured in 20-22 hrs and two-cell ones in 48 hrs after hCG introduction. In order to remove cumulus cell in one-cell embryos there was used a short-time cell equilibration in hyaluronidase solution (0.1 mg/l). The obtained embryos were thrice washed out in Dulbecco's medium and at once used in the experiment.

In the work there were used 10-, 20- and 30% (volume/volume) EG solutions, prepared in Dulbecco's physiological solution. The kinetics of cell osmotic reaction in the mentioned solutions were studied under room temperature (18-19°C) using the method of light microscopy.

The embryo in a small drop of physiological medium (10-15 μl) was placed in to a plastic Petri dish, put on a subject table of light inverted microscope MBI-13. The embryo fixing under microscope was performed with a manipulator (Fig.1). The kinetics of blastomere osmotic responce to the addition of a tested solution was studied by means of video recording with following measuring the squares of obtained pictures. Cell volume was calculated by assuming them to be spheric.

When determining the permeability coefficients of murine embryos (2nd stage) for cryoprotectant (k_p) and

Эмбрион в малой капле физиологической среды (10-15 мкл) помещали в пластиковую чашку Петри, установленную на предметном столике светового инвертированного микроскопа МБИ-13. Фиксацию эмбриона под микроскопом осуществляли с помощью микроманипулятора (рис. 1). Кинетику осмотической реакции бластомеров на добавление исследуемого раствора изучали путем кинорегистрации с последующим измерением площадей полученных изображений. Объемы клеток рассчитывали в приближении их сферичности.

При определении коэффициентов проницаемости эмбрионов мыши (в 2 этапа) для молекул криопротектора k_p и воды L_p в качестве теоретической основы использовали модель Е. А. Гордиенко [2]. На первом этапе определяли L_p, добиваясь совпадения теоретической кривой с участком экспериментальной кривой, соответствующим фазе дегидратации. На втором этапе установленное значение L_p подставляли в уравнения модели и добивались наилучшего совпадения решения теоретической модели с участком экспериментальной кривой, соответствующим фазе регидратации, подбирая и определяя таким образом значения k_p. Статистическую обработку данных (полученных для отдельных клеток коэффициентов проницаемости) проводили методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены характерные зависимости относительного объема бластомеров одно- и двухклеточных эмбрионов мыши от времени эквилибрации в растворах ЭГ 10-30%-й концентрации. На рисунке экспериментальные данные представлены точками, а аппроксимирующие их теоретические зависимости – сплошными линиями. Можно видеть, что теоретическая зависимость достаточно хорошо аппроксимирует экспериментальные данные. При близких значениях коэффициентов проницаемости, полученных для двухклеточного эмбриона в растворах различных концентраций, время восстановления относительного клеточного объема с увеличением концентрации возрастает. Такой зависимости не наблюдается для одноклеточного эмбриона. Представленные в таблице средние значения коэффициентов проницаемости мембран одно- и двухклеточных эмбрионов для ЭГ и воды в зависимости от концентрации криопротектора показывают, что для молекул воды они достоверно не отличаются. Не имеется достоверных отличий и для молекул ЭГ (в растворах 10%-й концентрации). Однако проницаемость одноклеточных эмбрионов заметно повышается в 20- и 30%-х растворах ЭГ, при этом наблюдается значительный разброс количественных значений k_p. Интересно заметить, что возрастание потока ЭГ в одноклеточный эмбрион, как

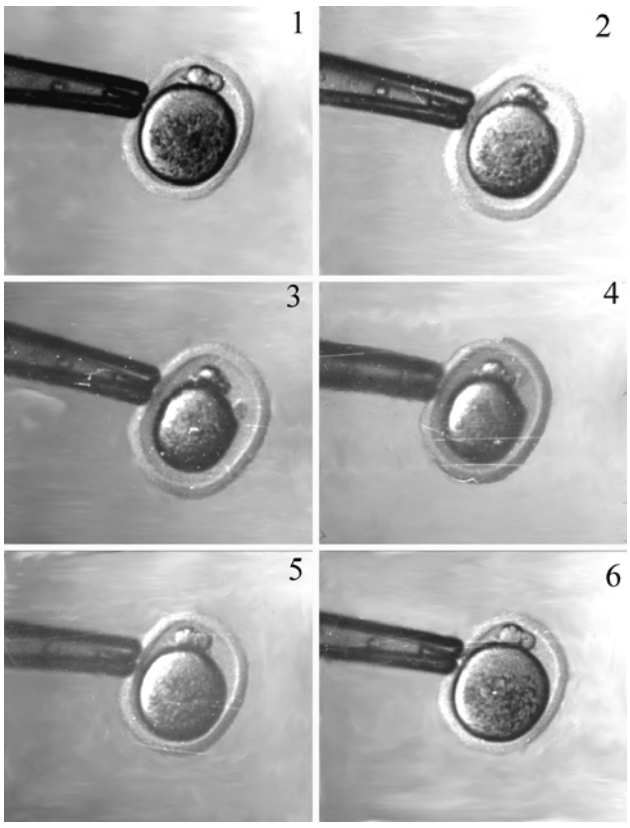

Рис. 1. Осмотическая реакция одноклеточного эмбриона мыши при эквилибрации в 10%-м растворе ЭГ: 1 – натив; 2 – 15 с; 3 – 30 с; 4 – 1 мин; 5 – 5 мин; 6 – 20 мин эквилибрации.

Fig. 1. Osmotical reaction of one-cell murine embryo during equilibration in 10% EG solution: 1 – native; 2 – 15 s; 3 – 30 s; 4 – 1 min 30 s; 5 – 5 min; 6 – 20 min of equilibration.

water (L_p) molecules we have used as a theoretic ground the E.A. Gordienko's model [2]. At the 1st stage we determined L_p, by approaching the coincidence of theoretical curve with the site of experimental curve, corresponding to dehydration phase. At the second stage the found L_p value was introduced into the model equation, and afterwards the best fitting of theoretical curve and experimental data was reached by k_p value selection – the best fit corresponds to the proper k_p value. The data statistical processing (obtained for some cells permeability coefficients) was done using the Student's method.

Results and discussion

The Fig. 2 shows the typical dependencies of a relative volume of blastomeres in one- and two-cell murine embryos on the equilibration time in EG solutions of 10-30% concentration. In the figure the experimental data are presented by points, and the approximating them theoretical dependencies by solid lines. Theoretical dependency can be seen, to quite well approximate the experimental data. Under close values of permeability coefficients, obtained for two-cell embryos in the solutions with different concentrations

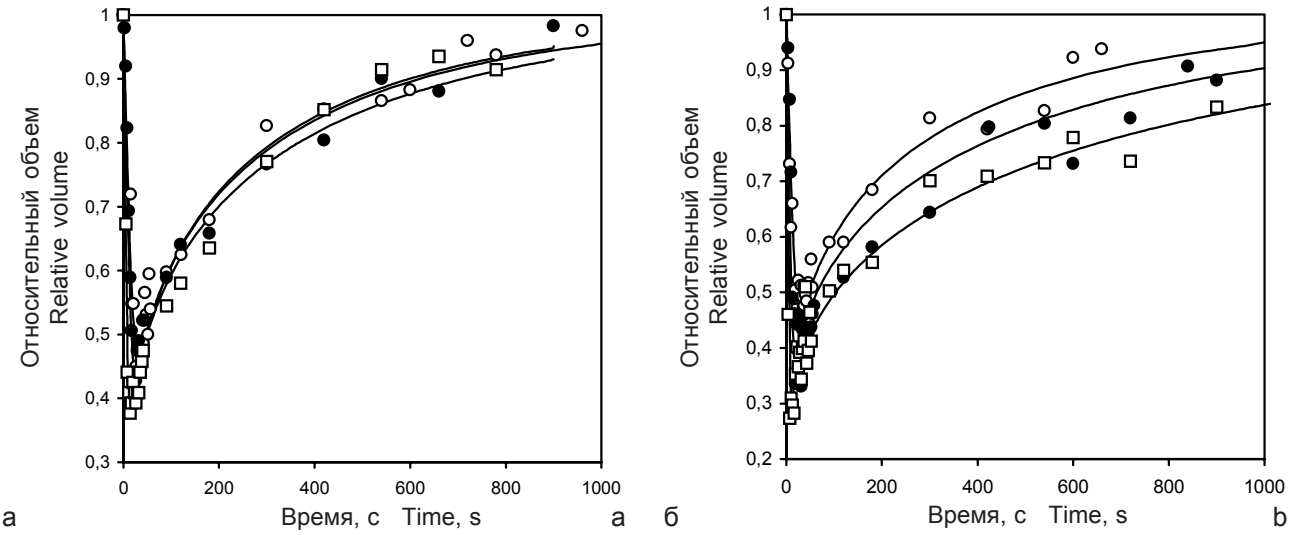

Рис. 2. Экспериментальные точки и теоретические зависимости относительного объема эмбрионов мыши от времени экспозиции в растворах этиленгликоля: а – одноклеточные; б – двухклеточные эмбрионы; ○ – 10%-го ЭГ; ● – 20%-го ЭГ; □ – 30%-го ЭГ.

Fig. 2. Experimental and theoretical dependencies of a relative volume of murine embryos on the exposure time in EG solutions: a – one-cell embryos; b – two-cell embryos; ○ – 10%; ● – 20%; □ – 30%.

правило, не сопровождалось набуханием бластомеров. Полученные данные позволяют предположить, что эквилибрация одноклеточных эмбрионов в растворах ЭГ с концентрациями выше 10% приводит к нарушениям избирательных свойств плазматических мембран под действием осмотического стресса[8]. Мембраны двухклеточных эмбрионов оказались более устойчивыми к повышенным концентрациям ЭГ, что свидетельствует об отсутствии зависимости коэффициентов проницаемости их мембран от концентрации внеклеточного криопротектора. Тем не менее и двухклеточные эмбрионы в 20- и 30%-х растворах ЭГ иногда отклонялись от нормального осмотического поведения. Случаи нормального и аномального осмотического поведения бластомеров двухклеточных эмбрионов представлены на рис 3. Характерным для аномального поведения было наличие фазы резкого увеличения объема в начальной стадии регидратации.

Аппроксимация данных волюмометрии решением теоретической модели позволяет не только определить искомые коэффициенты проницаемости для криопротектора и воды, но и оценить динамику изменения концентрации криопротектора в клетке (рис. 4). Оценка показывает, что время 95%-го насыщения одно- и двухклеточных эмбрионов мыши ЭГ не превышает 5 мин.

Следует отметить, что, несмотря на широкое применение ЭГ при криоконсервировании эмбрионов млекопитаю-

the recovery time of a relative cell volume with the concentration augmentation increases as well. Such a dependency is not observed for one-cell embryo.

The presented in the Table average values about membrane permeability coefficients of one- and two-cell embryos for EG and water depending on a cryoprotectant concentration demonstrate, that for water molecules they do not statistically and significantly differ. There are no statistically significant differences for EG molecule, measured in solution with 10% concentration. However the permeability of one-cell embryos considerably increases in 20 and 30% EG solutions, at the same time there is observed a considerable spread of K_p quantitative values. It is

Коэффициенты проницаемости мембран одно- и двухклеточных эмбрионов для воды (L_p) и криопротектора (k_p), измеренные в растворах ЭГ 10-, 20- и 30%-й концентраций

Coefficients of membrane permeability of one- and two-cell embryos for water (L_p) and cryoprotectant (k_p), measured in EG solutions of 10-, 20- and 30% concentrations

Концентрация ЭГ EG concentration		Одноклеточный эмбрион One – cell embryo		Двухклеточный эмбрион Two – cell embryo	
%	мОсм mOsm	$L_p \times 10^{14}$, $м^3/Н \times с$ $m^3/N \times s$	$k_p \times 10^7$, м/с m/s	$L_p \times 10^{14}$, $м^3/Н \times с$ $m^3/N \times s$	$k_p \times 10^7$, м/с m/s
10	2573	4,26±0,78	1,12±0,60	3,43±0,17	1,25±0,10
20	5146	4,58±1,48	4,88*±2,21	3,99±0,19	1,37±0,42
30	7719	4,25±1,35	6,88*±3,19	3,94±0,46	1,26±0,32

Примечание: * – статистически достоверные различия по сравнению с данными для 10%-й концентрации, $p<0,05$.

Note: * – statistically significant changes comparing to data for 10% concentration, $p<0.05$.

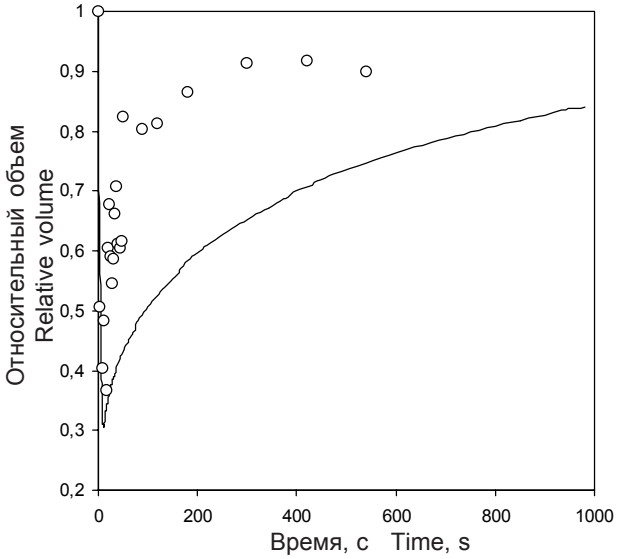

Рис. 3. Осмотическое поведение двухклеточных эмбрионов мыши в 30%-м растворе ЭГ: —— – теоретическая зависимость относительного объема бластомеров, построенная для средних значений коэффициентов проницаемости; ○ – экспериментальная зависимость относительного объема бластомеров, демонстрирующая отклонения от нормального осмотического поведения.

Fig. 3. Osmotic behaviour of two-cell murine embryos in 30% EG solution: —— – a theoretical dependency of a relative blastomere volume, built for average means of permeability coefficients; ○ – an experimental dependency of a relative blastomere volume, demonstrating deviations from normal osmotic behaviour.

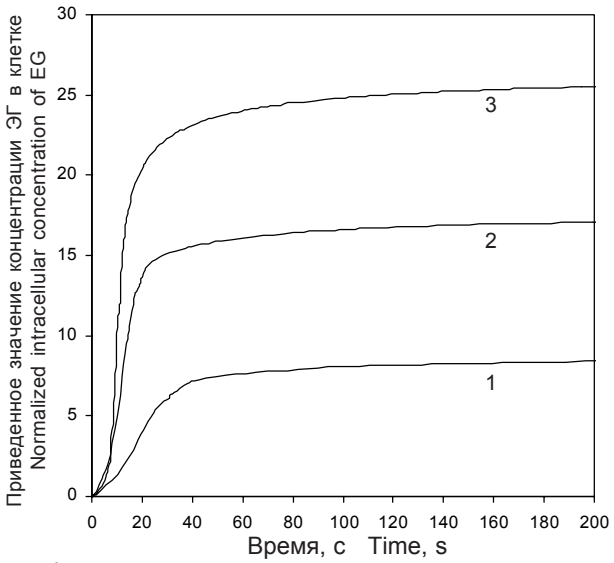

Рис. 4. Динамика насыщения криопротектором двухклеточных эмбрионов мыши при различных концентрациях ЭГ: 1 – 10%-й; 2 – 20%-й; 3 – 30%-й.

Fig. 4. Dynamics of saturation with a cryoprotectant of two-cell murine embryos under different EG concentrations: 1 – 10%; 2 – 20%; 3 – 30%.

щих, вопрос о влиянии стадии развития и его исходной концентрации на транспортные характеристики плазматических мембран клеток остается открытым. Так, в работе [10] были определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран неоплодотворенных яйцеклеток мыши для молекул ЭГ при их эквилиб-рации в 1,5М растворе этого криопротектора (0,9±0,05 м/с). Сопоставление данных этой работы с данными проницаемости плазматических мембран одно- и двухклеточных эмбрионов мыши для ЭГ, полученными нами для 10%-го раствора ЭГ (близкого по тоничности 1,5М раствору), позволяет предположить, что ни оплодотворение, ни дробление в пределах первых двух стадий не оказывает существенного влияния на способность ЭГ проникать через плазматическую мембрану ооцитов и эмбрионов ранних стадий развития, что существенно отличает ЭГ от других криопротекторов, применяемых для криоконсервирования эмбрионов млекопитающих [5]. Механизм этого явления требует дальнейшего изучения.

Выводы

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что ранние эмбрионы мыши

interesting to note that the increase in EG influx into zygote as a rule was not accompanied with swelling of blastomeres. Obtained data allow the supposing that the equilibration of one-cell embryos in EG solutions with the concentrations exceeding 10% results in impairments of selective properties of plasma membranes under the effect of osmotic stress [8]. Membranes of two-cell embryos occurred to be more resistant to EG increased concentrations, that testifies to the absence of the dependency of their membranes' permeability coefficients on the concentration of extracellular cryoprotectant. Nevertheless two-cell embryos in 20-30% EG solutions sometimes deviated from normal osmotic behavior. The cases of normal and abnormal osmotic behavior of blastomeres of two-cell embryos are presented in Fig. 3. The presence of the phase of sharp increase in the volume at initial stage of rehydration was characteristic for abnormal behavior.

Approximation of the volumetric data by theoretical model solving permits not only to investigate the permeability coefficients to be determined for cryoprotectant and water, but as well to estimate the dynamics of change in cryoprotectant concentration in a cell (Fig. 4). The evaluation shows that the time of 95% saturation of one- and two-cell mice embryos with EG does not exceed 5 min.

It should be noted that despite a wide application of EG under cryopreservation of mammalian embryos, the question about the effect of development stage and its initial concentration on transport characteristics of their plasma membranes remained to be open. Thus, in the paper [10] there were found the permeability

первых двух стадий деления дробления демонстрируют различную осмотическую устойчивость в гипертонических растворах ЭГ. Проницаемость плазматических мембран одно- и двухклеточных эмбрионов мыши для молекул воды и криопротекторов не зависит от стадии развития. Однако следует отметить более высокую устойчивость двухклеточных эмбрионов в высококонцентрированных растворах ЭГ по сравнению с устойчивостью одноклеточных эмбрионов, которая может быть обусловлена изменением поверхностно-объемного отношения клеток вследствие дробления.

Литература

1. *Белоус А.М., Гордиенко Е. А., Розанов Л.Ф.* Биохимия мембран: замораживание и криопротекция .– М. : Высш. школа,1987.– 80 с.
2. *Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 142 с.
3. *Манк М.* Биология развития млекопитающих. Методы.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
4. *Смольянинова Е.И., Хроменкова О.Б., Жерноклев Г.В.* Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши // Пробл. криобиологии.– 2001.– №2.– С. 49-55.
5. *Jackowsky S., Leibo S.P., Mazur P.* Glycerol permeability of fertilized and unfertilized mouse ova // J. Exp. Zool.– 1980.– Vol. 212.– P. 329-341.
6. *Mazur P.* The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells // Ann. N. Y. Acad. Sci.– 1965.– Vol. 125.– P. 658-652.
7. *Mazur P., Leibo S.P., Chee E.H.A.* A two factors hypothesis of freezing injury // Exp. Cell. Res.– 1972.– Vol. 71.– P. 345-38
8. *Meryman H.T.* Red cell membrane changes produced by extracellular cryoprotectants and allied compounds // Cryobiology.– 1971.– Vol. 8, N4.– P. 401-408.
9. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology.– 1971.– Vol. 8, N5.– P. 489-500.
10. *Paynter S.J., Fuller B.J., Show R.W.* Temperature dependence of Kedem-Katchalsky membrane transport coefficients for mouse oocytes in the presence of ethylene glycol // Cryobiology.– 1999.– Vol.39, N1.– P. 169-176.

Поступила 23.03.2004

coefficients of plasma membranes of non-fertilized mice oocytes for EG molecules under their equilibration in 1.5M solution of this cryoprotectant (0.9±00.5 m/s). The comparing of this work data with those about permeability of plasma membranes of one- and two-cell mice embryos for EG, obtained by us for 10% EG solution (close on tonicity with 1.5M solution), allows the supposing that neither fertilization nor cleavage within the first two stages considerably affects EG capability to penetrate via plasma membrane of oocytes and embryos of early developmental stages, that significantly distinguishes EG from other cryoprotectants, applied for cryopreservation of mammalian embryos [5]. This phenomenon mechanism requires further studying.

Conclusions

Thus obtained by us data testify that early mice embryos of the first two cleavage stages demonstrate various values of osmotic resistance in EG hypertonic solutions. The permeability of plasmatic membranes of one- and two-cell mice embryos for the molecules of water and cryoprotectants does not depend on development stage. However higher resistance of two-cell embryos should be noted in highly concentrated EG solutions in comparison with that for one-cell embryos, which can be stipulated by the change of surface-volume ratio of cells as a result of cleavage.

References

1. *Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F.* Biochemistry of membranes: freezing and cryoprotection.– Moscow: Vysshaya shkola, 1987.– 80 p.
2. *Gordienko E.A., Pushkar N.S.* Physical grounds for cell suspension low temperature preservation.- Kiev: Naukova dumka, 1994.- 142p.
3. *Mank M.* Biology of mammals development. Methods.- Moscow: Mir, 1990.- 406p.
4. *Smolyaninova E.I., Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V.* Influence of various steps of cryopreservation by a method of ultra-rapid freezing on osmotic resistance and morpho-functional integrity of mouse embryos // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2.– P. 49-55.
5. *Jackowsky S., Leibo S.P., Mazur P.* Glycerol permeability of fertilized and unfertilized mouse ova // J. Exp. Zool.– 1980.– Vol. 212.– P. 329-341.
6. *Mazur P.* The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells // Ann. N.Y. Acad. Sci.– 1965.– Vol.125.– P. 658-652.
7. *Mazur P., Leibo S.P., Chee E.H.A.* A two factors hypothesis of freezing injury // Exp. Cell Res.– 1972.– Vol. 71.– P. 345-38.
8. *Meryman H.T.* Red cell membrane changes produced by extracellular cryoprotectants and allied compounds // Cryobiology.– 1971.– Vol. 8, N4.– P. 401-408.
9. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology.– 1971.– Vol. 8, N5.– P. 489-500.
10. *Paynter S.J., Fuller B.J., Show R.W.* Temperature dependence of Kedem-Katchalsky membrane transport coefficients for mouse oocytes in the presence of ethylene glycol // Cryobiology.– 1999.– Vol.39, N1.– P. 169-176.

Accepted in 23.03.2004