

УДК: 577.352.4:612.111.085:547.42

Механизм транспорта ДМСО, глицерина и этиленгликоля через мембраны эритроцитов крысы и кролика

Г.В.Коваленко, И.Ф.Коваленко, Т.П.Линник

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

Определены коэффициенты проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика для молекул диметилсульфоксида, глицерина и этиленгликоля при температурах 25 и 37°C, а также эритроцитов, инкубированных с ртутным сульфгидрильным реагентом (pCMBS) – блокатором белка полосы 3 при 25°C. Рассчитана энергия активации переноса молекул криопротекторов через мембраны эритроцитов крысы и кролика при 25 и 37°C и после инкубации с pCMBS. Показано, что скорость диффузии криопротекторов в эритроциты крысы выше, чем в эритроциты кролика. Диффузия диметилсульфоксида и этиленгликоля в клетки осуществляется двумя альтернативными путями – через гидрофильные водные каналы и непосредственно через липидный бислой. Выявлено, что глицерин обладает самой низкой скоростью диффузии через мембраны эритроцитов крысы и кролика и преимущественно проникает в клетки по гидрофильному пути (до 85–95%), а именно по аквапоринам («акваглицеропоринам» – AQP3, AQP7, AQP9).

Ключевые слова: криопротекторы, проницаемость мембран, белковые каналы, эритроциты животных, аквапорины.

Механізм транспорту ДМСО, гліцерину і етиленгліколю через мембрани еритроцитів щура і кролика

Г.В.Коваленко, І.Ф.Коваленко, Т.П.Ліннік

Визначено коефіцієнти проникності мембран нативних еритроцитів щура і кролика для молекул диметилсульфоксиду, гліцерину та етиленгліколю при температурах 25 і 37°C, а також еритроцитів, інкубованих із ртутним сульфгидрильним реагентом (pCMBS) – блокатором білка смуги 3 при 25°C. Розраховано енергію активації переносу молекул криопротекторів через мембрани еритроцитів щура і кролика при 25 і 37°C і після інкубації з pCMBS. Показано, що швидкість дифузії криопротекторів в еритроцити щура вище, ніж в еритроцити кролика. Показано, що дифузія диметилсульфоксиду та етиленгліколю у клітини здійснюється двома альтернативними шляхами – через гідрофільні водні канали і безпосередньо через ліпідний бішар. Виявлено, що гліцерин має найнижчу швидкість дифузії через мембрани еритроцитів щура і кролика і переважно проникає в клітини по гідрофільному шляху (до 85–95%), а саме по аквапоринам («аквагліцеропоринам» – AQP3, AQP7, AQP9).

Ключові слова: криопротектори, проникність мембран, білкові канали, еритроцити тварин, аквапорини.

The mechanism of DMSO, glycerol and ethylene glycol transport across rat and rabbit erythrocyte membranes

G.V.Kovalenko, I.F.Kovalenko, T.P.Linnik

The coefficients of permeability of native erythrocytes membranes to dimethyl sulfoxide, glycerol and ethylene glycol at 25°C and 37°C have been determined as well as erythrocytes incubated with mercury reagent (pCMBS) – the blocator of 3-band peptide at 25°C. The energy of activation of the cryoprotectors molecules transport via rat and rabbit erythrocytes membranes at 25°C and 37°C and after incubation with pCMBS has been calculated. It has been shown that the rate of cryoprotectors diffusion into rat erythrocytes is higher than into rabbit erythrocytes. It has been shown that dimethyl sulfoxide and ethylene glycol diffusion into cells is realized by two alternative ways: via hydrophilic aqua channels and across lipid bilayer immediately. It has been determined that glycerol possesses the lowest rate of diffusion across rat and rabbit erythrocytes membranes and permeates the cells mainly by hydrophilic way (85–95%) via aquaporines (aquaglyceroporines – AQP3, AQP7, AQP9).

Key words: cryoprotectors, permeability of membranes, aqua channels, erythrocytes of animals, aquaporine.

Введение

Диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин (Гл), этиленгликоль (ЭГ) относятся к проникающим криопротекторам и за последние 50 лет получили широкое распространение при криоконсервировании биологических объектов разного уровня организации (Актуальные проблемы

криобиології, 1981; Наук и др., 1991). Исследование транспорта криопротекторов (КП) через мембраны, в частности определение их коэффициента проницаемости, а также влияния КП на проницаемость мембран для воды, относятся к одним из важнейших этапов при целенаправленной оптимизации методов криоконсервирования биологических объектов.

Установлено (Черницкий, Воробей, 1981), что пассивный транспорт веществ в клетку зависит от химической структуры и геометрических параметров их молекул. С другой стороны, скорость диффузии веществ через мембрану зависит от ее структурной организации, состава, характеристик отдельных компонентов и интегральных свойств, таких, например, как текучесть. Естественно, что физико-химические и функциональные свойства биологических мембран обусловлены видовой специфичностью клеток. Этот момент освещен в литературе значительно слабее, хотя гипотез выдвинуто достаточно (Черницкий, Воробей, 1981; Балли и др., 1989).

В данной работе изучены скорость и механизм транспорта ДМСО, Гл и ЭГ через мембраны нативных и проинкубированных с ртутным сульфидрильным реагентом (блокатором белковых водных каналов) эритроцитов крысы и кролика в зависимости от температуры.

Объект и методы исследования

Для исследований были использованы глицерин (Гл), этиленгликоль (ЭГ) и диметилсульфоксид (ДМСО). Вещества Гл и ЭГ марки «х.ч.» дополнительно очищали (Протива, 1966) и проверяли чистоту общепринятыми методами. ДМСО марки «х.ч.» дополнительно очищали по методу (Копейка и др., 2002).

Коэффициент распределения (K_p) веществ определяли в системе «вода-н-октанол» при 25°C по методу (Кейл, 1966). Геометрические параметры молекул рассчитывали для транс-изомеров на основе моделей Стюарта-Бриггса (Физер, Физер, 1970) по компьютерной программе "Nurag Snet Pro v. 5.1".

Кровь исследуемых животных получали у крысы путем пункции хвостовой вены, у кролика – надреза или прокола краевой вены уха (Западнюк и др., 1974), заготавливали на консерванте «Глюцир».

Коэффициенты проницаемости определяли по методу (Гордиенко и др., 1998), который основан на физико-математической модели гемолиза в водных растворах проникающих криопротекторов (Гордиенко та ін., 1998), при температурах 25 и 37°C.

Кинетику гемолиза регистрировали методом малоуглового рассеивания света с длиной волны 1000 нм. Интенсивность рассеянного суспензией эритроцитов света измеряли под углом 9° в направлении падающего пучка. Прибор снабжен устройством для поддержания необходимой температуры в кюветной камере. Рассчитывали энергию активации процесса переноса молекул веществ через мембрану эритроцитов животных (Гордиенко, Пушкарь, 1994).

Для блокирования водных каналов использовали р-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt (pCMBS) фирмы "Sigma". Инкубацию эритроцитов крысы и кролика с блокатором проводили по методу (Conlon, Outhred, 1978) с 2 мМ pCMBS в течение 30 мин при 25°C. После инкубации эритроциты отмывали фосфатным буферным раствором при pH 7,4.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований определены коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для ЭГ, Гл и ДМСО в нативном состоянии при 25 и 37°C и инкубированных с pCMBS при 25°C. Полученные данные и рассчитанная энергия активации переноса молекул перечисленных КП через мембрану эритроцитов для температур 25 и 37°C и после инкубации клеток с pCMBS – блокатором белковых водных каналов (белок полосы 3) приведены в табл. 1 и 2.

Из представленных данных видно, что все изученные КП проникают через мембрану эритроцитов крысы достоверно быстрее, чем через мембрану эритроцитов кролика, в среднем в 1,5–2,5 раза, как при 25 и 37°C, так и после обработки клеток блокатором pCMBS. Подобная закономерность выявлена ранее (Коваленко и др., 2007) для диолов и амидов и объясняется, по нашему мнению, разной текучестью (величиной, обратной вязкости) мембран эритроцитов крысы и кролика. Так, индексы двойных связей суммарных липидов для мембран эритроцитов крысы и кролика равны 1,7 и 1,2, содержание холестерина в % – 26,1 и 29,9, отношение фосфатидилхолина к сфингомиелину (ФХ:СМ) – 3,91 и 1,78 соответственно (Черницкий, Воробей, 1981).

Выявленная температурная зависимость проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для изученных веществ согласуется с теоретическими представлениями (Черницкий, Воробей, 1981) и ранее полученными нами данными (Коваленко и др., 2007). Значения

коэффициентов проницаемости изученных КП снижаются в среднем на 50% в диапазоне температур от 37 до 25°C.

Таблица 1.
Коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов крысы для криопротекторов и энергия активации транспорта молекул

Вещество	Коэффициент проницаемости $K_1 \times 10^6$, м/с			Энергия активации, E_a , кДж/моль, 25–37°C	Энергия активации с рСМБС, E_a , кДж/моль, 25°C
	нативные эритроциты		с рСМБС		
	37°C	25°C			
Гл	0,335±0,012	0,160±0,017	0,133±0,021	47,27	59,09
ЭГ	13,95±1,36	6,81±1,15	3,77±0,71	45,87	83,70
ДМСО	12,27±0,85	5,49±0,22	3,51±0,27	51,45	80,07

Примечание: разница между коэффициентами проницаемости эритроцитов при 25 и 37°C, а также нативных и проинкубированных с рСМБС при 25°C для всех веществ достоверна при $p < 0,05$.

Таблица 2.
Коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов кролика для криопротекторов и энергия активации транспорта молекул

Вещество	Коэффициент проницаемости $K_1 \times 10^6$, м/с			Энергия активации, E_a , кДж/моль, 25–37°C	Энергия активации с рСМБС, E_a , кДж/моль, 25°C
	нативные эритроциты		с рСМБС		
	37°C	25°C			
Гл	0,209±0,008	0,111±0,014	0,109±0,011	40,48	41,65
ЭГ	5,21±0,27	2,64±0,17	2,04±0,19	43,48	59,98
ДМСО	7,51±0,47	3,09±0,13	2,21±0,23	56,81	78,25

Примечание: разница между коэффициентами проницаемости эритроцитов при 25 и 37°C, а также нативных и проинкубированных с рСМБС для всех веществ достоверна при $p < 0,05$.

Как видно из представленных результатов (табл. 1 и 2), наиболее медленно проникает внутрь эритроцитов животных Гл по сравнению с ЭГ и ДМСО, при этом в эритроциты крысы в среднем в 26–42 раза, в эритроциты кролика – в 20–35 раз медленнее в зависимости от условий эксперимента.

Значения энергии активации переноса молекул изученных КП через мембрану эритроцитов крысы при изменении температуры от 25 и 37°C находятся в диапазоне от 46 до 51 кДж/моль (табл. 1), через мембрану эритроцитов кролика – в интервале от 40 до 57 кДж/моль (табл. 2). Считается (Черницкий, Воробей, 1981), что если значения энергии активации переноса молекул через мембрану находятся в пределах указанного выше диапазона, то низкомолекулярные вещества преимущественно диффундируют по белковым водным каналам. При этом необязательно, чтобы молекула вещества при переходе из растворителя в мембрану теряла гидратную оболочку, последний момент обусловлен размерами гидрофильных пор и геометрическими параметрами молекул веществ. Допускается также и обмен гидратной оболочки с молекулами воды внутри поры.

В табл. 3 приведены структурные формулы, геометрические параметры и коэффициент распределения изученных криопротекторов в системе «вода-н-октанол» (K_p).

Известно (Черницкий, Воробей, 1981), что энергия активации коррелирует с числом водородных связей, образуемых молекулой КП с водой. При этом энергия активации тем выше, чем большее число Н-связей разрушается при вхождении вещества в мембрану, и тем более низкая скорость трансмембранной диффузии вещества. Вероятно, одной из причин малых значений коэффициента проницаемости Гл через мембрану эритроцитов крысы и кролика является наличие трехмерной пространственной решетки из водородных связей в водных растворах Гл, плотность которых в 3 раза выше, чем в одноатомных спиртах, и в 1,5 раза выше, чем в двухатомных (Джапаридзе, Догонадзе, 1977). Как следует из табл. 3, Гл является полностью гидрофильным веществом, сложно допустить для него альтернативный путь транспорта через мембрану, даже через липидные «поры», которые возникают как следствие дефектов в упаковке липидного бислоя.

Размер таких «пор» может достигать 10 Å (Антонов, 1998). Следовательно, Гл проникает внутрь эритроцитов исключительно по белковым водным каналам. Значение коэффициента проницаемости Гл через мембрану эритроцитов кролика после инкубации с рСМБС при 25°C практически не изменилось, уменьшилось всего на 2%, через мембрану эритроцитов крысы – на 17%. Учитывая, что рСМБС блокирует белок полосы 3, а также, что в эритроцитах крысы его 25,3%, а в эритроцитах

кролика 23,8%, можно предположить, что незначительная доля Гл (не более 10–16 %) проникает через эритроцитарную мембрану крысы этим путем. Остальная часть Гл проникает внутрь эритроцитов крысы и особенно кролика другим путем, а именно через аквапорины. Утверждается (Verkman, Mitra, 2000), что в ряде биологических объектов, в частности ооцитах некоторых видов животных, гепатоцитах и др., обнаружены аквапорины (AQP3, AQP7, AQP9), которые служат непосредственно для транспорта Гл через мембраны. Они получили название «акваглицеропорины» и отличаются от семейства аквапоринов, по которым в основном диффундирует вода, тем, что содержат два дополнительных пептида. Более того, известно (Verkman, Mitra, 2000), что блокаторами транспорта воды и низкомолекулярных веществ через аквапорины являются ртутные сульфгидрильные вещества, которые не относятся к цистеин-связывающим реагентам, в отличие от рСМБС. На основании этого можно предположить, что Гл проникает внутрь эритроцитов крысы и особенно кролика по аквапоринам, при этом становится понятным, почему транспорт Гл через мембрану практически не блокируется рСМБС. Гл проникает внутрь эритроцитов преимущественно по гидрофильному пути, при этом 85–90 % вещества, вероятно, диффундирует через аквапорины (акваглицеропорины (Verkman, Mitra, 2000)) и не более 15% – через белок полосы 3.

Таблица 3.

Структурные формулы, геометрические параметры и коэффициент распределения криопротекторов

Вещество	Структурная формула	М.м.	Геометрические параметры молекул		K _p
			D, Å	V, Å ³	
Гл	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	92,1	4,7	90,2	0,005
ЭГ	HO – CH ₂ – CH ₂ – OH	62,1	2,6	27,6	0,040
ДМСО	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	78	3,2	36,92	0,243

Примечание: М.м. – молекулярная масса вещества; D – диаметр молекул; V – объем молекул; K_p – коэффициент распределения в системе «вода-н-октанол».

ЭГ, как видно из табл. 1 и 2, не имеет столь однозначного механизма транспорта через мембрану эритроцитов крысы и кролика, как Гл. Во-первых, наблюдается значимое повышение энергии активации переноса ЭГ через мембраны эритроцитов, инкубированных с рСМБС при 25°C до уровня 83% (эритроциты крысы) и до уровня 60% (эритроциты кролика) (табл. 1 и 2). Во-вторых, снижение скорости диффузии ЭГ через мембраны эритроцитов крысы и кролика после инкубации с рСМБС значительно больше по сравнению с Гл. Значения коэффициентов проницаемости мембран инкубированных с рСМБС эритроцитов крысы для ЭГ снижаются на 45%, эритроцитов кролика – на 23%. Вышесказанное позволяет предположить наличие двух альтернативных путей транспорта этого вещества через мембраны клеток. Но предположить диффузию ЭГ непосредственно через липидный матрикс мембран вряд ли возможно. ЭГ, также как и Гл, относится к гидрофильным веществам, его способность к гидрофобным взаимодействиям крайне низкая или полностью отсутствует. Отсюда следует, что около 23–45 % вещества проникает по белковому водному каналу (блокирование рСМБС белка полосы 3), остальная часть ЭГ, вероятно, диффундирует через мембраны эритроцитов по аквапоринам или через липидные поры, возникающие в результате тепловых флуктуаций или при образовании структурных дефектов в мембране. При этом такая липидная пора внутри может быть гидрофильной за счет полярных головок липидов, выстилающих стенки, и достигать значительных размеров (Антонов, 1998).

На рис. 1 и 2 представлена зависимость скорости диффузии через мембрану крысы и кролика ДМСО, Гл и ЭГ от коэффициента их распределения в системе «вода-н-октанол».

Все три вещества являются отличными КП, но по физико-химическим свойствам и структуре они значительно отличаются. Гл и ЭГ относятся к гидрофильным соединениям, в то время как ДМСО является дифильным. С одной стороны, он проявляет ярко выраженные гидрофильные свойства (∞ растворимость, высокая энергия Н-связи с молекулами воды). С другой стороны, наличие в молекуле

двух метильных групп обеспечивает его способность активно взаимодействовать с липидными компонентами мембран, о чем свидетельствует значение коэффициента распределения ДМСО в системе «вода-н-октанол» ($K_p=0,243$), в группе изученных веществ самое высокое.

Полученные экспериментальные результаты трансмембранной диффузии ДМСО в эритроциты крысы и кролика позволяют предполагать существование двух альтернативных путей транспорта через мембрану. Доказательством этого является: во-первых, повышение энергии активации переноса молекул ДМСО через мембрану инкубированных с рСМБС эритроцитов крысы и кролика до величины 78–80 кДж/моль; во-вторых, уменьшение значений коэффициента проницаемости ДМСО после обработки клеток блокатором рСМБС на 28–36 % (табл. 1 и 2). Следовательно, можно утверждать, что ДМСО способен проникать внутрь клеток как по белковым водным каналам (до 36%), так и непосредственно через липидный матрикс (от 65 до 75%). На рис. 1 и 2 видно, что ЭГ несколько быстрее, чем ДМСО, проникает в эритроциты крысы, в то время как в эритроциты кролика достоверно быстрее диффундирует ДМСО. При этом следует обратить внимание, что через мембрану эритроцитов кролика большая часть ДМСО (до 72%) проходит непосредственно через липидный бислой и только небольшая доля (до 28%) – по белковым водным каналам.

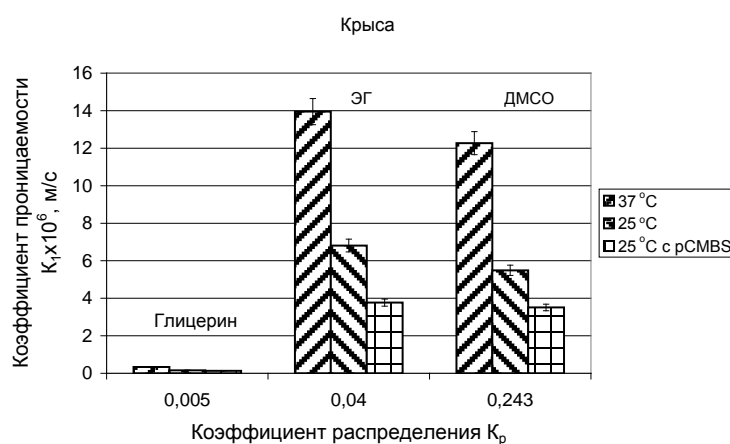


Рис. 1. Зависимости коэффициентов проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы при 37 и 25°C и проинкубированных с рСМБС при 25°C для Гл, ЭГ и ДМСО от их коэффициента распределения в системе «вода-н-октанол»

Соотношение альтернативных путей транспорта ДМСО через мембрану эритроцитов крысы несколько отличается: около 40% ДМСО диффундирует по гидрофильному пути (белок полосы 3), 60% – через липидный бислой, несмотря на то, что текучесть мембран эритроцитов крысы выше, чем у кролика. Вероятно, что столь большая доля ДМСО, проникающая через мембраны эритроцитов по липидному пути, обусловлена транспортом не только через липидный матрикс, но и через липидные поры, возникающие как следствие дефектов в упаковке липидного бислоя.

Чтобы проверить данное предположение, на световом инвертированном микроскопе Observer.Z1 (Carl Zeiss) отслежена кинетика гемолиза эритроцитов кролика после добавления 1 М водных растворов Гл, ЭГ и ДМСО. Полученные результаты представлены на рис. 3 и 4. Как видно из рис. 3, через 20 с в присутствии ЭГ форма эритроцитов изменилась незначительно, наблюдаются нормоциты, дискоциты и единичные стоматоциты I (рис. 3, а), в то время как после введения ДМСО в суспензию через 20 с картина другая (рис. 3, б), форма эритроцитов значительно изменилась. В поле зрения не обнаружены дискоциты, видно значительное набухание клеток, основная масса клеток приобрела форму сфероцитов. Через 30 с наблюдаются одни сфероциты, т.е. основная часть клеток уже потеряла гемоглобин. И через 50 с в присутствии ДМСО – только тени эритроцитов кролика и единичные сфероциты. С ЭГ через 60 с еще наблюдается наличие значимого количества сфероцитов, но также преобладают клетки, потерявшие гемоглобин (тени эритроцитов) (рис. 3, а).

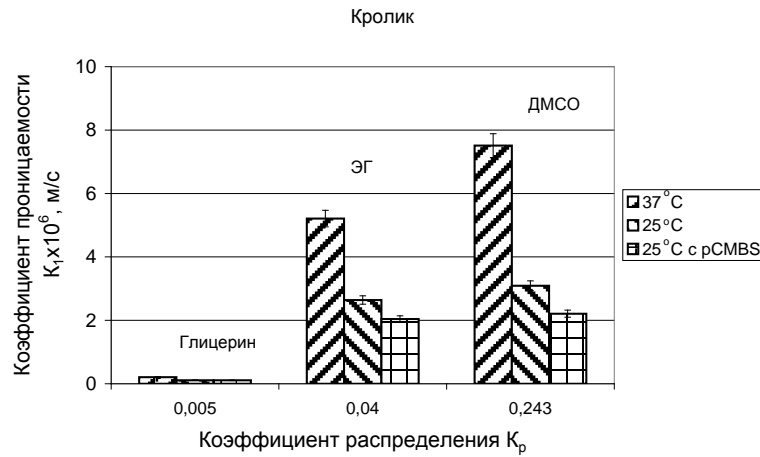
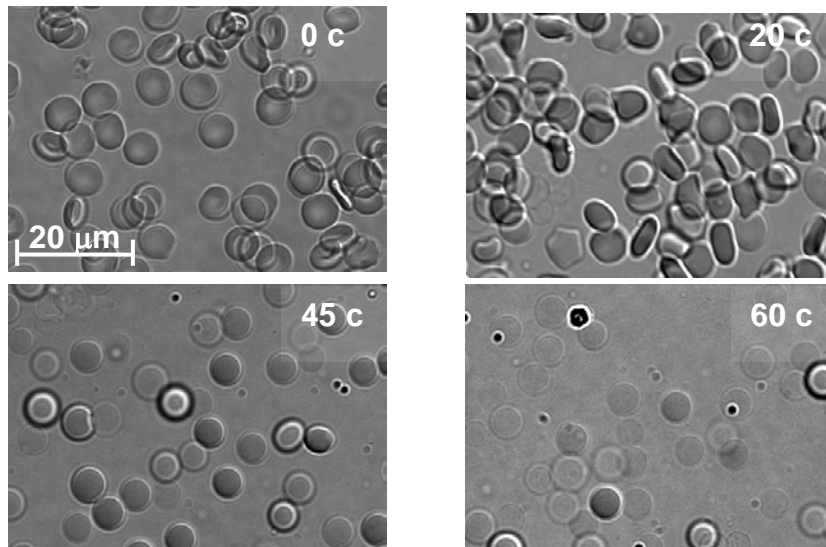


Рис. 2. Зависимости коэффициентов проницаемости мембран нативных эритроцитов кролика при 37 и 25°C и проинкубированных с pCMBS при 25°C для Гл, ЭГ и ДМСО от их коэффициента распределения в системе «вода-н-октанол»

а



б

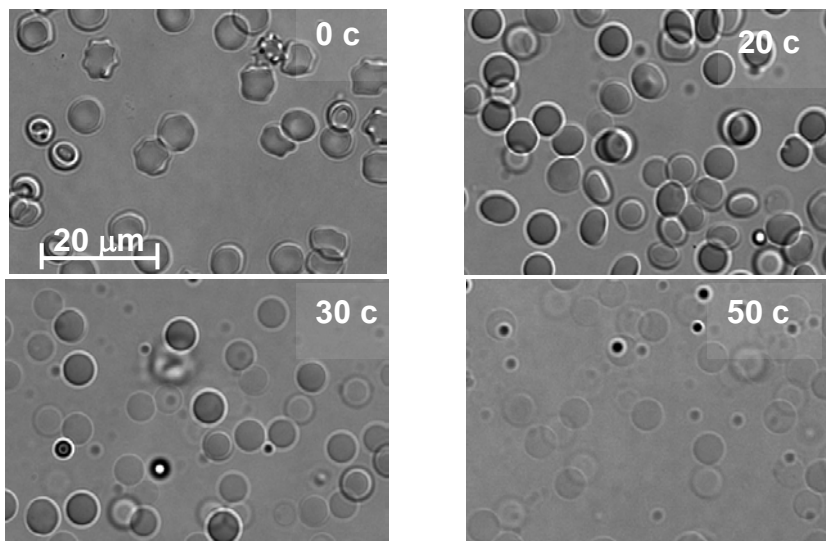


Рис. 3. Гемолиз эритроцитов кролика в 1 М растворах этиленгликоля (а) и ДМСО (б)

На рис. 4 представлена кинетика гемолиза эритроцитов кролика после добавления 1 М водного раствора Гл. Видно, что изменение формы эритроцитов протекает более медленно, даже через 720 с наблюдается присутствие единичных сфероцитов.

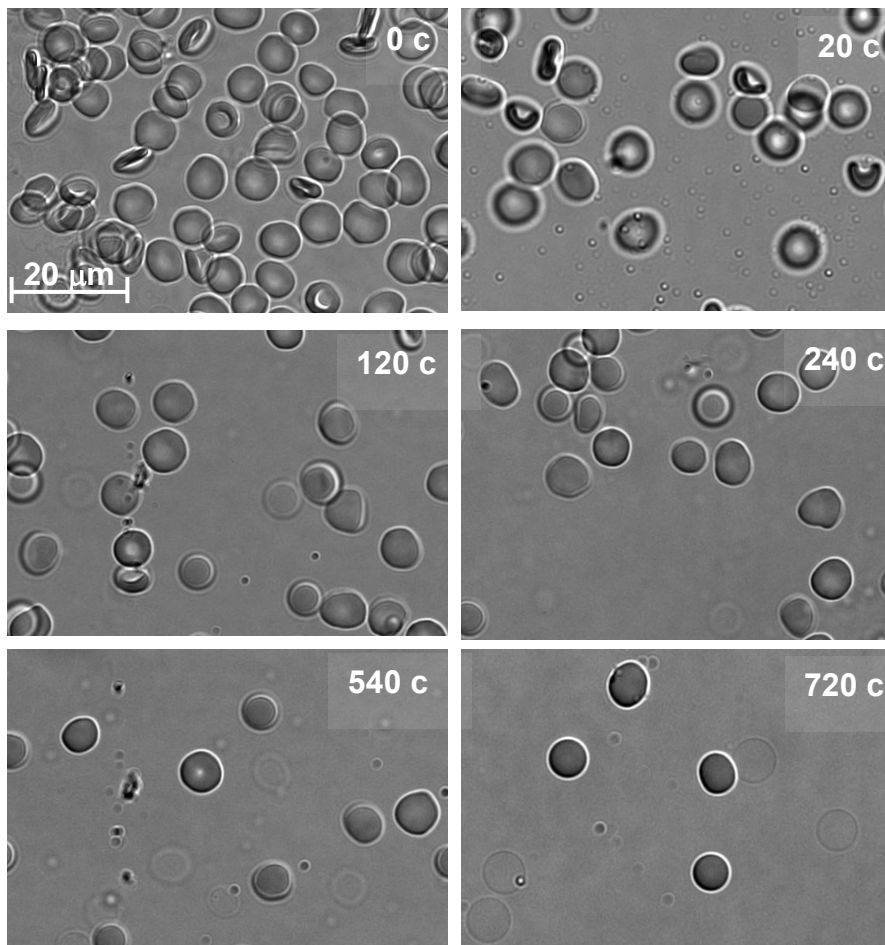


Рис. 4. Гемолиз эритроцитов кролика в 1 М растворе глицерина

Таким образом, можно считать, что дефекты в упаковке липидов мембран эритроцитов кролика возникают через 20 с после введения ДМСО в суспензию. Следовательно, ДМСО может диффундировать внутрь клеток через липидные «поры». Видимо, этим объясняется, почему такая большая часть ДМСО (до 72%) проникает внутрь эритроцитов кролика по липидному пути.

Выводы

В результате проведенных исследований определены коэффициенты проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика для Гл, ЭГ и ДМСО при температурах 25 и 37°C, а также эритроцитов, инкубированных с ртутным сульфгидрильным реагентом (pCMBS) – блокатором белковых водных каналов (белок полосы 3) при 25°C. Рассчитаны энергии активации переноса молекул изученных веществ через мембраны нативных эритроцитов крысы и кролика в диапазоне температур 25 и 37°C и через мембраны инкубированных с pCMBS эритроцитов при 25°C.

Установлено, что проницаемость изученных веществ через мембрану эритроцитов крысы выше, чем через мембрану эритроцитов кролика, что обусловлено более высокой текучестью мембран эритроцитов крысы.

Полученные данные свидетельствуют, что механизм проницаемости изученной группы веществ через мембраны эритроцитов крысы и кролика различается. Пассивная диффузия ДМСО и ЭГ в эритроциты крысы и кролика осуществляется двумя альтернативными путями – через гидрофильные водные каналы (данные ингибирования с блокатором pCMBS) и непосредственно через липидный бислой (зависимость их диффузии от K_p , высокие значения энергии активации после инкубации с pCMBS).

Виявлено, що среди изученных веществ Гл обладает самой низкой скоростью диффузии через мембраны эритроцитов крысы и кролика. Преимущественно проникает в клетки по гидрофильному пути (до 85–95 %), а именно по аквапоринам («акваглицеропоринам» – AQP3, AQP7, AQP9).

Список литературы

- Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н.С.Пушкаря и А.М.Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – 606с.
- Антонов В.Ф. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №10. – С. 10–17.
- Балли М.Б., Бестерлинг Б., Брейлсфорд Дж.Д. и др. Текучесть мембраны в биологии. – К.: Наук. думка, 1989. – 310с.
- Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф. Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов // Вісник ХДУ. – 1998. – №408. – Біофіз. вісник, вип.2. – С. 59–63.
- Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 143с.
- Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є. Фізико-математична модель та експериментальне вивчення явища гіпотонічного гемолізу // Доповіді НАН Укр. – 1998. – №11. – С. 173–176.
- Джапаридзе Д.И., Догондзе Р.Р. Вязкость и энергия реорганизации растворителя // Сообщ. АН Груз. ССР. – 1977. – Т.85, №1. – С. 97–100.
- Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. – Киев: Вища школа, 1974. – 303с.
- Кейл Б. Экстракция и противоточное распределение // Лабораторная техника органической химии. – М.: Мир, 1966. – С. 379–441.
- Коваленко Г.В., Коваленко И.Ф., Линник Т.П. Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда амидов и диолов // Пробл. криобиологии. – 2007. – №4. – С. 365–373.
- Копейка Ю.Е., Грищенко В.И., Копейка Е.Ф. и др. Влияние ДМСО и продуктов его распада на сперматозоиды и выживаемость эмбрионов выюнов *Misgurnus fossilis* // Пробл. криобиологии. – 2002. – №4. – С. 45–56.
- Наук В.А., Борончук Г.В., Ротт Н.Н. Длительное сохранение спермы сельскохозяйственных и диких животных // Консервация генетических ресурсов. – Пушино, 1991. – С. 35–81.
- Протива М. Очистка растворителей // Лабораторная техника органической химии. – М.: Мир, 1966. – С. 591–615.
- Физер Л., Физер М. Органическая химия. – М.: Химия, 1970. – Т.1. – 688с.
- Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216с.
- Conlon T., Outhred R. The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability // BBA. – 1978. – Vol.511. – P. 408–418.
- Verkman A.C., Mitra Alok K. Structure and function of aquaporin water channels // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2000. – Vol.278. – P. F13–F28.

Представлено: Л.І.Бєлостоцькою / Presented by: L.I.Belostotskaya

Рекомендовано до друку: В.А.Бондаренком / Recommended for publishing by: V.A.Bondarenko

Подано до редакції / Received: 18.06.2009.

© Г.В.Коваленко, І.Ф.Коваленко, Т.П.Ліннік, 2009

© G.V.Kovalenko, I.F.Kovalenko, T.P.Linnik, 2009