

УДК 57.043:611.013:57.043

Е.И. Смольянинова^{1*}, В.А. Шигимага², О.А. Стриха¹, Л.И. Попивненко¹, Е.Г. Лисина²

Влияние этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на электрическую проводимость 2-клеточных эмбрионов мышей

UDC 57.043:611.013:57.043

E.I. Smolyaninova^{1*}, V.A. Shigimaga², O.A. Strikha¹, L.I. Popivnenko¹, E.G. Lisina²

Effect of Cryopreservation Stages by Vitrification in Ethylene Glycol and Sucrose Medium on 2-Cell Murine Embryos Electric Conductivity

Реферат: В работе методом импульсной кондуктометрии впервые определены значения удельной электрической проводимости 2-клеточных эмбрионов мыши после экспозиции в этиленгликоль-сахарозной среде и полного цикла криоконсервирования методом витрификации. Показано, что после экспозиции эмбрионов в среде витрификации увеличиваются значения их электрической проводимости по сравнению с контрольными $((2,24 \pm 0,64) \div (3,86 \pm 0,68) \times 10^{-3}$ См/м и $(1,54 \pm 0,11) \div (6,12 \pm 0,34) \times 10^{-3}$ См/м соответственно). Увеличение времени экспозиции с 1,5 до 3 мин снижает устойчивость плазматических мембран эмбрионов к действию импульсного электрического поля. Проведенные исследования показали, что электрическая проводимость может быть чувствительным диагностическим клеточным параметром, отражающим нарушения морфофункциональной целостности клеток на различных этапах криоконсервирования.

Ключевые слова: эмбрион мыши, электропорация, электрический пробой, витрификация, этиленгликоль, криоконсервирование.

Реферат: У роботі методом імпульсної кондуктометрії вперше визначені значення питомої електричної провідності 2-клітинних ембріонів мишей після експозиції в етиленгліколь-сахарозному середовищі та повного циклу криоконсервування методом вітрифікації. Показано, що після експозиції ембріонів у середовищі вітрифікації збільшуються значення їх електричної провідності у порівнянні з контрольними $((2,24 \pm 0,64) \div (3,86 \pm 0,68) \times 10^{-3}$ См/м і $(1,54 \pm 0,11) \div (6,12 \pm 0,34) \times 10^{-3}$, відповідно). Збільшення часу експозиції від 1,5 до 3 хв знижує стійкість плазматичних мембран ембріонів до дії імпульсного електричного поля. Проведені дослідження показали, що електрична провідність може бути чутливим діагностичним клітинним параметром, який віддзеркалює порушення у морфофункціональній цілісності клітин на різних етапах криоконсервування.

Ключові слова: ембріон миші, електропорация, електричний пробой, вітрифікація, етиленгліколь, криоконсервування.

Abstract: In this study the values of specific electric conductivity of 2-cell murine embryos after their exposure in ethylene glycol and sucrose medium and complete cryopreservation cycle by vitrification were determined using the method of impulse conductometry. It has been shown that embryo exposure in vitrifying medium led to an increase in their electric conductivity values in comparison with the control ones $((2.24 \pm 0.64) \div (3.86 \pm 0.68) \times 10^{-3}$ S/m) and $(1.54 \pm 0.11) \div (6.12 \pm 0.34) \times 10^{-3}$ S/m, respectively). Extension of exposure time from 1.5 min to 3 min led to a decrease in embryo plasma membrane resistance to pulse electric field action. The investigation showed that electric conductivity could be a sensitive diagnostic cell parameter reflecting disturbances in cell morphofunctional integrity at various stages of cryopreservation.

Key words: mouse embryo, electroporation, electric breakdown, vitrification, ethylene glycol, cryopreservation.

В настоящее время метод витрификации для криоконсервирования гамет и ранних эмбрионов млекопитающих является одним из самых распространенных в современных вспомогательных репродуктивных технологиях [17, 19, 21, 23–26]. Такой подход позволяет сократить длительность цикла криоконсервирования по сравнению с медленным замораживанием и свести к минимуму изме-

Nowadays, application of vitrification to cryopreserve mammalian gametes and early embryos is one of the most widespread in the contemporary assisted reproductive technologies [17, 19, 21, 23–26]. This approach allows to reduce the duration of preparation steps in comparison with slow freezing protocols and to minimize the changes in cell volume at the steps of cooling and warming. However, high concentrations

¹Отдел низкотемпературного консервирования, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Отдел биотехнологии репродукции сельскохозяйственных животных, Институт животноводства НААН, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-31-87, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: esmolyaninova@rambler.ru

¹Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Department of Animal Reproduction Biotechnology, Institute of Animal Breeding of the National Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3187, fax: +380 57 373 3084, e-mail: esmolyaninova@rambler.ru

нения клеточного объема на этапах замораживания и оттаивания. Вместе с тем высокие концентрации криопротекторов в криозащитных средах оказывают токсичное влияние на эмбрионы, тем самым снижая их конечную жизнеспособность, что ограничивает внедрение этого метода в практику [4, 8, 10, 11, 26]. При этом следует различать истинно химическую токсичность и «кажущуюся» токсичность, вызванную действием осмотического фактора, которую можно устранить путем усовершенствования композиционного состава среды замораживания и условий экспозиции в них эмбрионов.

Жизнеспособность деконсервированных эмбрионов оценивают по их морфологическим признакам и способности развиваться в условиях *in vivo* или *in vitro*. Однако по этим критериям невозможно определить роль отдельных факторов, действующих на различных этапах протокола криоконсервирования. Расширение спектра диагностических клеточных параметров и методов их измерения позволит решить эту проблему и создать экспериментально-теоретическую базу для оптимизации режимных параметров существующих протоколов и разработки новых. В частности показано, что такие электрические характеристики клеток, как мембранный потенциал и транспорт ионов через плазматические мембраны являются чувствительными параметрами, отражающими состояние клеток и его изменение под действием различных эндогенных и экзогенных факторов, например степени зрелости ооцитов млекопитающих [20, 32].

В современной биотехнологии широко используется метод импульсной кондуктометрии, или электропорации [12, 16, 22, 28, 29], основанный на следующем явлении. При воздействии на клетку однородного электрического поля происходит резкое увеличение мембранного потенциала. Превышение некоторого критического значения мембранного потенциала приводит к локальным перестройкам в липидном бислое и резкому увеличению электрической проводимости клеточной мембраны вследствие появления в ней кратковременных дефектов типа гидрофобных или гидрофильных пор [31, 33, 34]. Различают обратимый и необратимый электрический пробой. Если радиус гидрофильной поры не превышает некоторое критическое значение, то по истечении определенного времени пора залечивается, т. е. имеет место так называемый обратимый электрический пробой. Если радиус гидрофильной поры превышает некоторое критическое значение, то происходит необратимый электрический пробой мембраны, сопровождающийся разрушением и лизисом клетки. Напряженность импульсного электрического поля (ИЭП),

of cryoprotectants in cryoprotective media render toxic effects on the embryos, thereby reducing their final viability, which restricts the introduction of this method into practice [4, 8, 10, 11, 26]. Herewith, one should distinguish between true chemical toxicity and 'apparent' toxicity caused by osmotic factors that could be eliminated by improving the composition of vitrifying media and conditions of embryos exposure in the media.

Viability of devitrified embryos is being evaluated by their morphological characteristics and the ability to develop *in vivo* or *in vitro*. However, these criteria could not show the impact of individual factors acting at different stages of the cryopreservation protocol. Expanding the range of characteristic cell parameters and methods for their assessment would allow to solve this problem and to create experimental and theoretical basis for optimization of regime parameters of existing protocols and to develop new ones. In particular, it was shown that the electrical characteristics such as cell membrane potential and the transport of ions via plasma membranes are sensitive parameters reflecting the state of the cells and its changes under the influence of various endogenous and exogenous factors, e.g. the maturity stage of mammalian oocytes [20, 32].

Contemporary biotechnology widely utilize the method or pulse conductometry or electroporation [12, 16, 22, 28, 29], based on the following phenomenon. Uniform electric field exposure on the cells causes sharp increase in the membrane potential. Exceeding of certain critical membrane potential leads to local modifications in the lipid bilayer and a sharp increase in the electric conductivity of cell membrane due to appearance of short-living defects such as hydrophobic or hydrophilic pores [31, 33, 34]. One discern reversible and irreversible electrical breakdown. If the radius of a hydrophilic pore does not exceed a certain critical value, after some time the pore 'heals', i. e. so-called reversible electrical breakdown occurs. If the radius of the hydrophilic pores exceeds certain critical value, the irreversible electrical breakdown of the membrane occurs, accompanied by the destruction and lysis of cell. The intensity of pulsed electric field (PEF) causing the electrical breakdown, could be an important parameter characterizing the structural integrity of the membrane. It was shown that even small changes in the structure of the membrane under the exposure of external chemical or physical factors affected the value of the critical electric breakdown [3, 12, 30]. The electric pulse action is conventionally applied to introduce into cells the foreign DNA or the substances which normally do not penetrate, as well as for cell fusion [16, 22, 28, 29]. Electric characteristic of this process is the electric conductivity of the cell, which changes significantly with an increase in the electric field



вызывающего электрический пробой, может служить важным параметром, характеризующим целостность структуры мембраны. Показано, что даже малые изменения в структуре мембраны под воздействием внешних химических или физических факторов влияют на значение критической напряженности электрического пробоя [3, 12, 30]. Традиционно действие электрического импульса используют для введения в клетки не проникающих в норме агентов, введения в клетки чужеродной ДНК, слияния клеток [16, 22, 28, 29]. Электрической характеристикой этого процесса является электрическая проводимость клетки, которая существенно изменяется при нарастании напряженности электрического поля [13–15]. В предыдущих исследованиях нами было показано, что электрическая проводимость также может быть клеточным параметром, характеризующим изменения в функциональном состоянии ооцитов и эмбрионов мыши в зависимости от степени их зрелости [3, 7] и стадии развития в процессе деления дробления [6]. Также было показано, что значения электрической проводимости ооцитов мыши меняются под действием растворов проникающих криопротекторов [15].

Целью настоящей работы явилось исследование влияния различных этапов протокола криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на электрическую проводимость 2-клеточных эмбрионов мышей.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 2-клеточные эмбрионы мышей F_1 (C57Bl × CBA) возрастом 6–8 недель. Для стимуляции суперовуляции самок мышей подвергали гормональной обработке путем внутрибрюшинного введения 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл («Folligon», Нидерланды) и 7,5 МЕ человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) («Chorulon», Нидерланды) с интервалом 46–48 ч. Самок после введения чХГ подсаживали к самцам для осеменения. На следующий день проверяли наличие копуляционных пробок, что соответствовало первому дню беременности самок. Через 48 ч после введения чХГ самок забивали дислокацией шейных позвонков. Эмбрионы на стадии двух бластомеров получали промыванием отпрепарированных яйцеводов физиологической средой Дюльбекко с добавлением 5%-й фетальной телячьей сыворотки («Sigma», США) при комнатной температуре по стандартной методике [1]. Затем клетки трижды отмывали физиологической средой и немедленно использовали в экспериментах.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов

[13–15]. We have shown previously that the electric conductivity may also be a cell parameter characterizing the changes in the functional state of mouse oocytes and embryos, depending on their maturity [3, 7] stage of development during cleavage [6]. The electric conductivity of murine oocytes was also shown to change after exposure in solutions of cryoprotectants [15].

The aim of our study was to investigate the effect of different stages of cryopreservation protocol by means of vitrification in ethylene glycol and sucrose medium on the electric conductivity of two-cell mouse embryos.

Materials and methods

Experiments were performed in 2-cell embryos of 6–8 week-old mice F_1 (C57Bl × CBA). Superovulation was stimulated by hormonal treatment: intraperitoneal injection of 5 IU pregnant mare serum gonadotropin (Folligon, Netherlands) and 7.5 IU of human chorionic gonadotropin (HCG) (Chorulon, Netherlands), 46–48 hours post HCG administration the females were transferred to males for insemination. The next day, the presence of copulatory plugs was checked, which corresponded to the first day of pregnancy. Females were sacrificed by means of cervical dislocation 48 hours post hCG administration. Two cell embryos were isolated by washing the cut-out oviducts with Dulbecco's physiological medium supplemented with 5% fetal calf serum (Sigma, USA) at room temperature using standard method [1]. The cells were then washed thrice with physiological medium and used immediately in the experiments.

The experiments in animals were carried out in compliance with the General principles of experiments in animals, approved by 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007), and with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

In the present study we analyzed the cryopreservation protocol based on vitrification method described previously [2, 4, 8]. Embryos were divided into five groups: the control and four experimental groups. The control group ($n = 32$) consisted of fresh 2-cell embryos without signs of morphological abnormalities.

The first series of experiments were targeted to elucidate the effect of duration of exposure in solution of cryoprotectants and vitrifying medium on electric conductivity in the murine embryo. Embryos of experimental groups I ($n = 25$), and II ($n = 28$) were treated with 10% solution of ethylene glycol (EG) during 5 minutes, transferred to a vitrifying medium (30% EG + 0.7 M sucrose) and incubated during 1.5 minutes (group I) and 3 minutes (group II). Then the embryos were transferred into drops of 0.5 M sucrose solution,



на животных», одобренными I–III Национальными конгрессами по биоэтике (Киев, 2001–2007 гг.) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.).

В работе анализировали протокол криоконсервирования методом витрификации, описанный ранее [2, 4, 8]. Эмбрионы были разделены на пять групп: контрольную и четыре экспериментальных. В контрольную группу ($n = 32$) входили свежeweделенные 2-клеточные эмбрионы без признаков морфологических нарушений.

В первой серии экспериментов исследовали влияние времени инкубации в растворе криопротектора и среде витрификации на электрическую проводимость эмбрионов мыши. Эмбрионы I ($n = 25$) и II ($n = 28$) экспериментальных групп подвергали обработке 10%-м раствором этиленгликоля (ЭГ) в течение 5 мин, после чего переносили в среду витрификации (30% ЭГ + 0,7 М сахарозы) и выдерживали в ней 1,5 мин (I группа) и 3 мин (II группа). Затем зародыши переносили в капли раствора 0,5 М сахарозы, выдерживали 10 мин и переносили в физиологическую среду Дюльбекко для удаления криопротектора.

Во второй серии экспериментов исследовали влияние полного цикла низкотемпературного консервирования 2-клеточных эмбрионов мыши на их электрическую проводимость. Эмбрионы III и IV экспериментальных групп ($n = 26$ и $n = 18$ соответственно) после предварительной эквilibрации в 10%-м растворе ЭГ и среде витрификации переносили (по 5–7 эмбрионов) в заранее подготовленные пластиковые соломинки диаметром 2 мм («Pacific Vet», Австралия), содержащие 5 мкл среды витрификации. Соломинки быстро погружали в жидкий азот и хранили 3–7 суток. Время экспозиции в этиленгликоль-сахарозной среде перед охлаждением для III группы составило 1,5 мин, для IV группы – 3 мин. Соломинки отогревали на водяной бане (38°C). Для удаления криопротектора эмбрионы, извлеченные из соломинок, переносили в раствор сахарозы с концентрацией 0,5 М, выдерживали в нем 10 мин и затем трижды отмывали физиологической средой при комнатной температуре. Сохранность деконсервированных зародышей оценивали по морфологическим признакам: целостности бластомеров и прозрачности их цитоплазмы. В дальнейших экспериментах использовали эмбрионы без морфологических нарушений.

Электрическую проводимость эмбрионов мыши определяли методом импульсной кондуктометрии [30] с использованием аппаратного комплекса, в состав которого входил генератор одиночных прямоугольных импульсов с линейно возрас-

kept for 10 minutes and thereafter transferred into a Dulbecco's physiological medium to wash-out the cryoprotectant.

In the second series of experiments we investigated the effect of complete cycle of low temperature preservation of two-cell murine embryos on their electric conductivity. Embryos of groups III and IV ($n = 26$ and $n = 18$, respectively) were transferred after pre-equilibration in 10% EG solution and vitrifying medium (5–7 embryos at once) into plastic straws of 2 mm diameter (Pacific Vet, Australia) containing 5 μ l of vitrifying medium. Straws were rapidly plunged into liquid nitrogen and stored for 3–7 days. Duration of exposure in the ethylene glycol and sucrose medium before freezing for the group III and IV was 1.5 and 3 minutes, correspondingly. Straws were warmed in a water bath (38°C). To remove the cryoprotectant the embryos retrieved from straws were transferred into a 0.5 M sucrose solution, exposed during 10 minutes and then washed thrice with physiological medium at room temperature. Survival of devitrified embryos was assessed by morphological criteria: integrity of blastomeres and transparency of their cytoplasm. Further experiments were conducted in embryos without morphological abnormalities.

The electric conductivity of mouse embryos was determined by pulsed conductometry method [30] using the device with the generator of single rectangular pulses with linearly increasing amplitude. The generated voltage was applied to the gold thread microelectrodes sealed in glass capillaries. Each embryo was washed twice in an isotonic sucrose solution to remove the traces of salt buffer, and then placed between the microelectrodes in a drop of sucrose solution. The specific conductivity was determined indirectly by measuring the voltage amplitude on the calibrated resistor sequentially connected with microelectrodes. Specific electric conductivity of individual oocytes was calculated according to the previously developed algorithm [14, 30].

Eventually, there were plotted the experimental curves of specific electric conductivity for individual 2-cell murine embryos vs. the electric field between the micro-electrodes.

Statistical processing of the results was performed using the parametric data analysis and software Microsoft Office Excel 2010, and Student t-test to evaluate the significance of differences. Data are presented as $M \pm SE$.

Results and discussion

Fig. 1 shows the dependence of electric conductivity of murine two-cell embryos of the control group vs. the electric field intensity. The dependencies of the electric conductivity of individual embryos were of monotonous increasing character as amplitude of



тающей амплитудой. Напряжение с генератора подавалось на микроэлектроды из золотой нити, запаянной в стеклянные капилляры. Каждый эмбрион дважды отмывали в изотоническом растворе сахарозы для удаления следов солевого буфера, а затем в капле раствора сахарозы помещали между микроэлектродами. Удельную проводимость определяли косвенно – путем измерения амплитуды напряжения на калиброванном резисторе, последовательно соединенном с микроэлектродами. Удельную электрическую проводимость отдельных ооцитов рассчитывали согласно разработанному ранее алгоритму [14, 30].

В результате были построены экспериментальные зависимости удельной электрической проводимости отдельных 2-клеточных эмбрионов мышей от напряженности электрического поля между микроэлектродами.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета параметрического анализа данных программы Microsoft Office Excel 2010 и t-критерия Стьюдента для оценки достоверности различий. Данные представлены в виде $M \pm SE$.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены зависимости удельной электрической проводимости 2-клеточных эмбрионов мышей контрольной группы от напряженности электрического поля. Зависимости электрической проводимости отдельных эмбрионов по мере увеличения амплитуды подаваемого импульса (рис. 1, А) имели монотонно возрастающий характер. При этом фиксировали заметные колебания значений проводимости, которые свидетельствовали о многократной порации плазматических мембран бластомеров. Численные значения электрической проводимости 2-клеточных эмбрионов мыши контрольной группы при увеличении амплитуды подаваемого импульса менялись в диапазоне $((1,54 \pm 0,11) \div (6,12 \pm 0,34)) \times 10^{-3}$ См/м (рис. 1, В). В диапазоне напряженностей ИЭП от 1×10^4 до 5×10^4 В/м электрическая проводимость эмбрионов обусловлена наличием «естественных» флуктуационных пор в липидном бислое и белковых каналов в плазматических мембранах эмбрионов, поэтому индивидуальные различия между отдельными эмбрионами выражены слабо. При превышении значений напряженности электрического поля 5×10^4 В/м электрическая проводимость обусловлена индукцией процесса порообразования под действием приложенного электрического импульса, который, в свою очередь, является вероятностным процессом [12, 33, 34] и зависит от индивидуальных особенностей (электромеханических свойств) мемб-

the applied pulse increased (Fig. 1A). Herewith, significant fluctuations in the conductivity values were registered, which indicated to occurred multiple blastomere plasma membrane poration. The numerical values of the electric conductivity of murine 2-cell embryos of the control group with an increase in the amplitude of the applied pulse varied in the range $((1,54 \pm 0,11) \div (6,12 \pm 0,34)) \times 10^{-3}$ S/m (Fig. 1B). In the PEF intensity

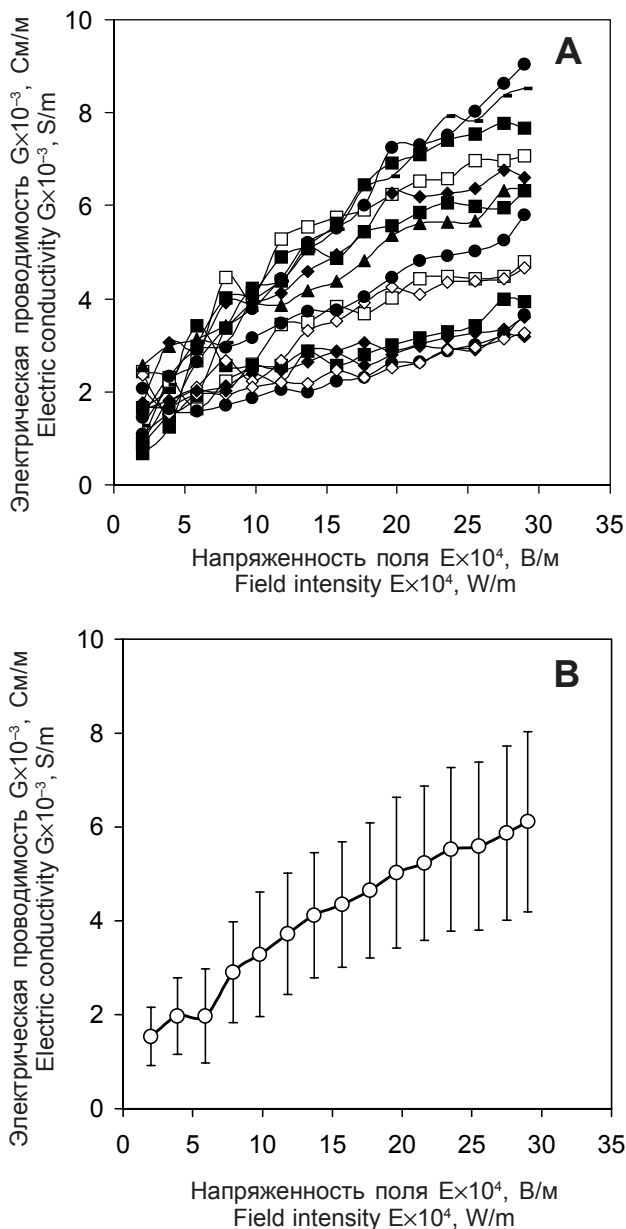


Рис. 1. Зависимость удельной электрической проводимости 2-клеточных эмбрионов мыши контрольной группы от напряженности ИЭП: А – зависимости для отдельных эмбрионов; В – статистически обработанные данные.

Fig. 1. Dependence of specific electric conductivity of 2-cell murine embryos of control group vs. PEF intensity: A – single embryos dependencies; B – statistically processed data.



ран эмбрионов. При этом в исследованном диапазоне значений напряжённостей ИЭП необратимый электрический пробой мембран и лизис бластомеров не наблюдали, что свидетельствует об устойчивости плазматических мембран 2-клеточных эмбрионов контрольной группы к действию электрического импульса.

После 1,5-минутной экспозиции эмбрионов в этиленгликоль-сахарозной среде (I группа) и удаления криопротектора значения удельной электрической проводимости эмбрионов были выше по сравнению с таковыми эмбрионов контрольной группы и менялись в диапазоне $((2,24 \pm 0,64) \div (3,86 \pm 0,68)) \times 10^{-3}$ См/м (рис. 2). Достоверные различия ($p < 0,05$) между начальными значениями электрической проводимости эмбрионов I группы и контрольной свидетельствуют о влиянии криозащитных растворов на структуру плазматических мембран эмбрионов, а также об изменении их электромеханических свойств. Эмбрионы этих групп демонстрировали схожую устойчивость к действию электрического импульса в исследуемом диапазоне напряженностей. Необратимый пробой и лизис бластомеров также не наблюдали.

После 3-минутной экспозиции эмбрионов в этиленгликоль-сахарозной среде численные значения проводимости эмбрионов практически совпадали с полученными после 1,5-минутной экспозиции $((2,3 \pm 0,87) \div (4,1 \pm 1,7)) \times 10^{-3}$ См/м). Однако по

range of 1×10^4 to 5×10^4 V/m the electric conductivity of the embryos was due to the presence of 'natural' fluctuation pores in the lipid bilayer as well as protein channels in the embryo plasma membranes, so individual differences among individual embryos are insignificant. Exceeding the values of the electric field of 5×10^4 V/m the electric conductivity resulted from the induced pore formation process due the applied electric pulse, which in its turn was a probabilistic process [12, 33, 34], depending on the individual characteristics (electromechanic properties) of embryo membranes. In the studied range of PEF intensity values no irreversible electrical breakdown of membranes and lysis of blastomeres were observed, which indicated the stability of the plasma membranes of 2-cell embryos of the control group to an electric pulse exposure.

After 1.5 minutes of exposure of embryos in ethylene glycol and sucrose medium (group 1) and cryoprotectant removal the specific conductivity values revealed in the embryos were higher if compared with those in the control group embryos and varied in the range $((2,24 \pm 0,64) \div (3,86 \pm 0,68)) \times 10^{-3}$ S/m (Fig. 2). Significant differences ($p < 0,05$) between the initial values of electric conductivity of embryos in group 1 and the control group testified the effect of cryoprotective solution on the embryo plasma membranes structure, resulted in the changes of their electro-mechanical properties. Embryos of group 1 exhibited resistance to the action of electric pulse in the studied range of

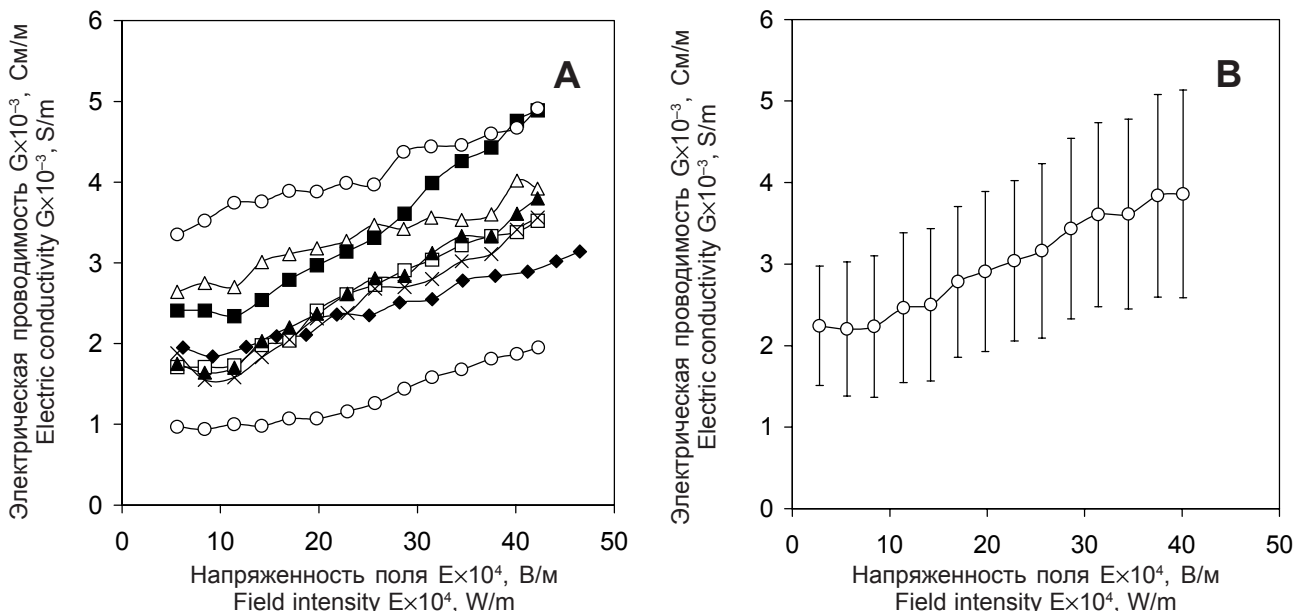


Рис. 2. Зависимость удельной электрической проводимости 2-клеточных эмбрионов мыши от напряженности ИЭП после 1,5 мин экспозиции в среде витрификации: А – зависимости для отдельных эмбрионов; В – статистически обработанные данные.

Fig. 2. Dependence of specific electric conductivity of 2-cell murine embryos vs. PEF intensity after 1.5 min long exposure in vitrifying medium: A – single embryos dependencies; B – statistically processed data.

достижении некоторого значения напряженности ИЭП наблюдался резкий рост электрической проводимости у мембран всех эмбрионов, сопровождающийся лизисом бластомеров, что свидетельствовало о необратимом электрическом пробое плазматической мембраны (рис. 3, В).

На рис. 4 представлены микрофотографии, демонстрирующие явление необратимого электрического пробоя 2-клеточного эмбриона мыши.

Во второй серии экспериментов мы определяли электрическую проводимость и устойчивость 2-клеточных эмбрионов мышей к действию ИЭП после полного цикла криоконсервирования.

На рис. 5 представлены зависимости электрической проводимости эмбрионов IV группы после полного цикла криоконсервирования. Численные значения этого параметра для эмбрионов III и IV групп практически не отличались и изменялись в пределах $((2,38 \pm 0,83) \div (9,49 \pm 1,18)) \times 10^{-3}$ См/м. Необратимый электрический пробой и лизис бластомеров эмбрионов наблюдался для эмбрионов IV группы. Однако для эмбрионов III группы он отсутствовал.

Как видно из представленных данных, этап витрификации-отогрева не оказывает существенного влияния на численные значения электрической проводимости эмбрионов мыши. Существенное увеличение электрической проводимости

intensities similar to that of the control group. No irreversible breakdown or blastomeres lysis was also observed.

After 3 minute-long exposure of the embryos in ethylene glycol and sucrose medium the numerical values of the conductivity of the embryos were almost equal to the of previous ones: $((2,3 \pm 0,87) \div (4,1 \pm 1,7)) \times 10^{-3}$ S/m. However, after reaching a certain value of PEF intensity there was a sharp increase in the electric conductivity observed in the membranes of all the embryos, which was accompanied by lysis of blastomeres, indicating an irreversible electrical breakdown of the plasma membrane (Fig. 3B).

Fig. 4 shows photomicrographs depicting the phenomenon of irreversible electrical breakdown of 2-cell murine embryo.

In the second series of experiments, we determined the electric conductivity and resistance of murine 2-cell embryos to the action of PEF after a full cycle of cryopreservation.

Fig. 5 shows the dependencies of the electric conductivity of embryos in group IV of after full cryopreservation cycle. The numerical values of this parameter for embryos in groups 3 and 4 did not differ and were in range of $((2,38 \pm 0,83) \div (9,49 \pm 1,18)) \times 10^{-3}$ S/m. Irreversible electrical breakdown and lysis of embryos blastomeres was observed for the embryos of group 4. However it was not observed in embryos of group 3.

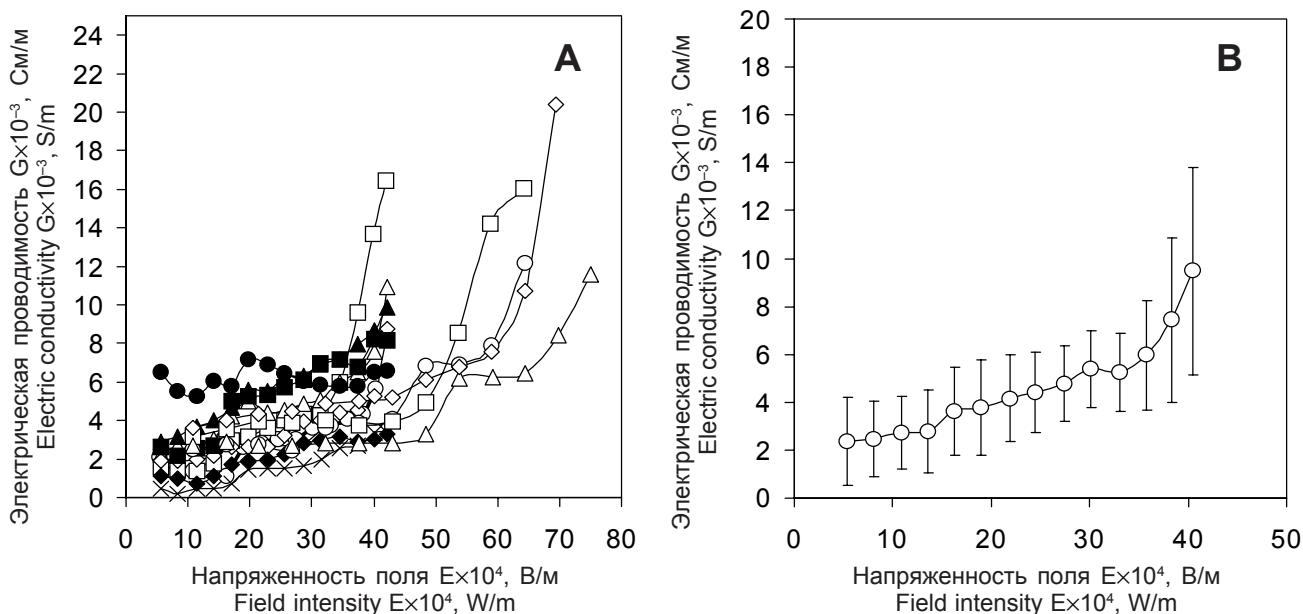


Рис. 3. Зависимость удельной электрической проводимости 2-клеточных эмбрионов мыши от напряженности ИЭП после 3 мин экспозиции в среде витрификации: А – зависимости для отдельных эмбрионов; В – статистически обработанные данные.

Fig. 3. Dependence of specific electric conductivity of 2-cell murine embryos vs. PEF intensity after 3 min long exposure in vitrifying medium: А – single embryos dependencies; В – statistically processed data.



эмбрионов I и II групп по сравнению с проводимостью эмбрионов контрольной группы свидетельствует об изменении свойств плазматических мембран бластомеров эмбрионов после экспозиции в растворе ЭГ и среде витрификации. Можно предположить, что в результате обработки эмбрионов криозащитными растворами в плазматических мембранах бластомеров формируются структурные дефекты, в области которых под действием электрического импульса могут формироваться поры, что и приводит к увеличению значений электрической проводимости эмбрионов экспериментальных групп. Важен тот факт, что диапазон значений электрической проводимости эмбрионов экспериментальных групп существенно уже, чем контрольных эмбрионов. Можно предположить, что при нарушении упорядоченности структуры плазматических мембран эмбрионов под действием криозащитных растворов изменяются электромеханические свойства мембран и, как следствие, характер распределения и размеры мембранных пор, индуцированных действием ИЭП. Кроме того, известно, что напряжение электрического пробоя

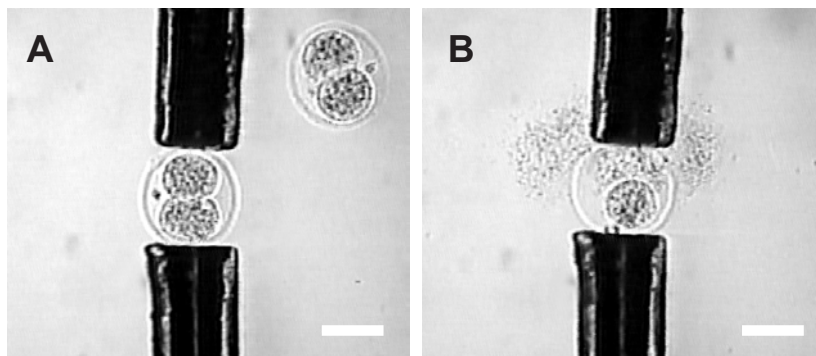


Рис. 4. Микрофотографии 2-клеточных эмбрионов мыши до (А) и после (В) необратимого электрического пробоя. Масштабная линейка 50 мкм.
Fig. 4. Photomicrographs of murine 2-cell embryos before (A) and after (B) irreversible electric breakdown. Bar 50 μm .

As can be seen from the presented data, freeze-thawing had no significant effect on numerical values of the electric conductivity exhibited by the murine embryos. A substantial increase in the electric conductivity of embryos from groups 1 and 2 if compared with conductivity in the control group embryos indicated the occurrence of changes in properties of embryo blastomere plasma membranes after exposure in EG solution and vitrifying medium. It can be assumed that processing of embryos in cryoprotectant solutions resulted in appearance of structural defects in blastomere plasma membranes, around which the pores

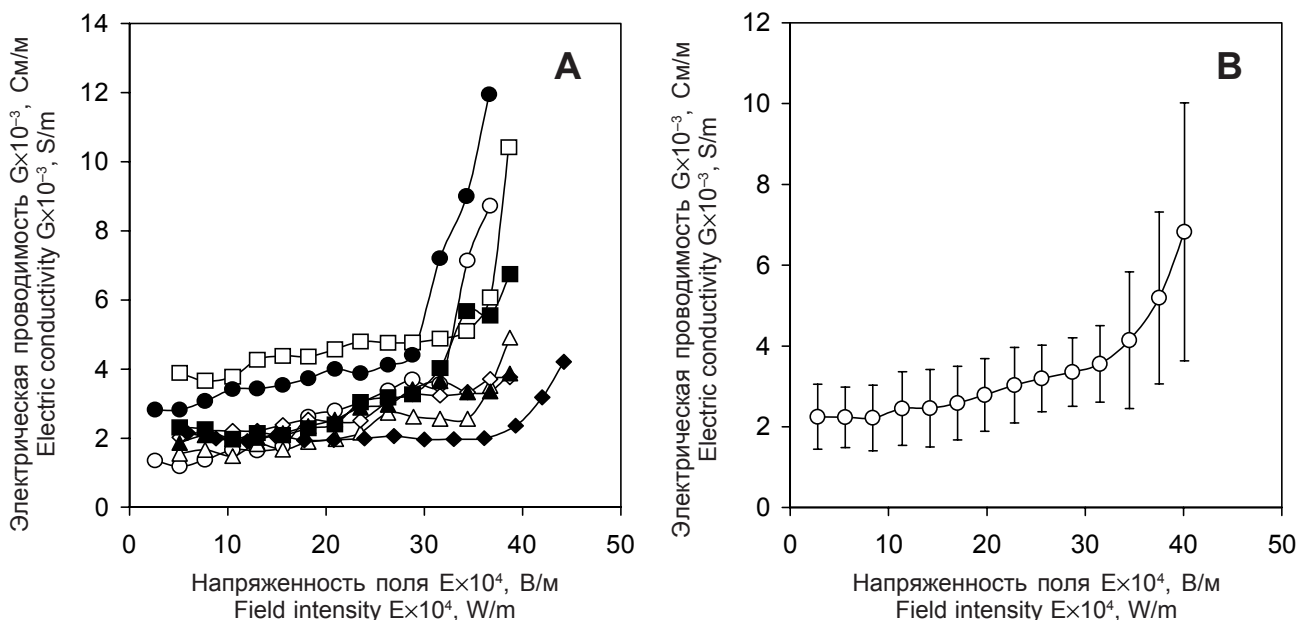


Рис. 5. Зависимость удельной электрической проводимости 2-клеточных эмбрионов мыши от напряженности ИЭП после полного цикла криоконсервирования; экспозиция в среде витрификации – 3 мин.: А – зависимости для отдельных эмбрионов; В – статистически обработанные данные.

Fig. 5. Dependence of specific electric conductivity of 2-cell murine embryos vs. PEF intensity after full cycle of cryopreservation; 3 min of exposure in vitrifying medium: A – single embryos dependencies; B – statistically processed data.

(обратимого) пропорционально толщине мембраны [33]. Адсорбция криопротектора на мембране увеличивает так называемую «эффективную» толщину мембраны, изменяет ее диэлектрическую проницаемость, что, в свою очередь, увеличивает значение напряжения пробоя, необходимого для формирования поры, и тем самым снижая значение электрической проводимости. Следует отметить, что увеличение времени экспозиции от 1,5 до 3 мин приводит к снижению устойчивости мембран эмбрионов к действию ИЭП, что отражается в явлении необратимого электрического пробоя. Повидимому, увеличение электрической проводимости плазматических мембран после действия криозащитных растворов может быть следствием изменения проницаемости мембраны для ионов и нарушения ионного гомеостаза, если время экспозиции в этих растворах превышает оптимальное значение. Ранее методом электронно-зондового микроанализа нами было показано, что при увеличении времени экспозиции 2-клеточных эмбрионов мыши в этиленгликоль-сахарозной среде от 1,5 до 3 мин происходит трехкратное снижение цитоплазматической концентрации основных неорганических элементов – калия и натрия [9, 27]. Снижение внутриклеточной концентрации этих элементов после экспозиции в среде витрификации приводит к нарушению интегральной целостности мембраны и ее связи с цитоскелетными структурами, что отражается в резком возрастании электрической проводимости и наблюдаемом необратимом электрическом пробое мембраны при воздействии ИЭП. Также было установлено, что внутриклеточная концентрация калия в эмбрионах мыши в норме не является постоянной величиной и претерпевает циклические изменения в зависимости от стадий клеточного цикла [5]. Такие концентрационные колебания основного клеточного элемента коррелируют с синхронными молекулярными перестройками в цитоплазме и имеют важное физиологическое значение [18]. Нарушение ионного гомеостаза за счет снижения внутриклеточных концентраций калия и натрия приводит к разобщению координации цито- и кариокинеза и запуску апоптотических процессов в цитоплазме. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты работы J.R. Trimarchi и соавт. [32], в которой было показано, что вследствие воздействия на эмбрионы мыши фактором, индуцирующим апоптоз, происходит выход калия из бластомеров. Ранее нами было установлено, что при увеличении экспозиции эмбрионов в среде витрификации перед погружением в жидкий азот с 1,5 до 3 мин морфофункциональная сохранность деконсервированных 2-клеточных

could be formed due to effect of electric pulse, which led to an increase in the electric conductivity values in the experimental groups embryos. Interestingly, the range of electric conductivity values exhibited by experimental group embryos was significantly narrow comparing to those of the control embryos. It can be assumed that violation of ordered structure of embryo plasma membranes under the influence of cryoprotective solutions could result in the changed electro-mechanical properties of the membranes and, as a consequence, in the distribution and size of the membrane pores induced by the action of the PEF. Furthermore it is known that intensity of electric breakdown (reversible) was proportional to the thickness of the membrane [33]. Adsorption of cryoprotectant on the membrane increased the so-called ‘effective’ thickness of the membrane, changed its dielectric constant, which in turn increased the breakdown intensity value, required for the formation of pore, thus reducing the value of electric conductivity. It should be noted that increasing the exposure time of 1.5 to 3 min reduced the resistance of embryo membranes to the effect of PEF, which was reflected in the phenomenon of irreversible electric breakdown. Apparently, the increased electric conductivity of the plasma membranes after exposure in cryoprotective solutions could result from changed membrane permeability for ions and disordered ion homeostasis, if the exposure time in these solutions exceeded a certain optimal value. It was shown previously using electron-probe micro-analysis that increasing the exposure time of murine 2-cell embryos in ethylene glycol and sucrose medium from 1.5 to 3 minutes resulted in threefold decrease in cytoplasmic concentration of inorganic basic elements, potassium and sodium [9, 27]. Reduction in the intracellular concentration of these elements after exposure in vitrifying medium led to a impairment of the membrane integrity and its association with cytoskeletal structures, which was reflected in a sharp increase in the electrical conductivity and appearance of irreversible electrical breakdown of the membrane under the influence of PEF. It was also found that normally the intracellular concentration of potassium in murine embryos was not constant and underwent cyclic changes depending on the cell cycle stage [5]. Such fluctuations in the concentration of basic cell substances correlate with synchronous molecular rearrangements in cytoplasm and are of physiological significance [18]. Disturbing of ionic homeostasis in terms of reducing intracellular concentrations of potassium and sodium results in the broken coordination of cyto- and karyokinesis and initiation of apoptotic processes in the cytoplasm. This assumption is supported by observation of Trimarchi *et al.* [32], reported that if murine embryos were subjected to a



эмбрионов мышей достоверно снижается. В процессе их последующего развития *in vitro* увеличивается количество апоптотических эмбрионов [8].

Выводы

Проведенные исследования показали, что электрическая проводимость может быть чувствительным диагностическим клеточным параметром, отражающим скрытые нарушения морфофункциональной целостности клеток на различных этапах криоконсервирования.

Основным этапом протокола криоконсервирования 2-клеточных эмбрионов мыши методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде, оказывающим влияние на значения электрической проводимости эмбрионов и их сохранность, является этап экспозиции в криозащитных растворах. Этап охлаждения-отогрева не оказывает дополнительного влияния на значения электрической проводимости.

Нарушения морфофункциональной целостности эмбрионов в криозащитных растворах на основе этиленгликоля и сахарозы вызваны, главным образом, действием осмотического фактора среды, причем эти нарушения имеют обратимый характер, если время экспозиции эмбрионов в среде витрификации не превышает некоторое критическое значение, и становятся необратимыми, если время экспозиции не оптимально.

factor inducing apoptosis, the leakage of potassium from the blastomeres was revealed. We have reported previously that increasing the exposure duration of embryo in vitrifying medium before plunging into liquid nitrogen from 1.5 to 3 min resulted in significant decrease in integrity of devitrified 2-cell murine embryos. During following *in vitro* development, the number of apoptotic embryos was increased [8].

Conclusions

Electric conductivity could be a sensitive diagnostic parameter for the cell, reflecting the hidden impairments in morphological and functional integrity of the cells at different stages of cryopreservation.

The main step of cryopreservation protocol for 2-cell murine embryos using vitrification in ethylene glycol and sucrose medium which affected the electric conductivity and survival of embryos was the exposure in solution of cryoprotectants. Freeze-thawing step did not additionally affect the values of the electric conductivity of 2-cell murine embryos.

Impairments in morphological and functional integrity of the embryo in cryoprotectant solutions were caused mainly by osmotic factor of the medium, and these disorders were reversible if the exposure of embryos in vitrifying medium did not exceed a certain critical value, and became irreversible if the exposure time was not optimal.

Литература

1. Биология развития млекопитающих. Методы / Под ред. М. Манк. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
2. Исаченко В.В., Грищенко В.И., Осташко Ф.И. и др. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без «классической эквilibрации» // Проблемы криобиологии. – 1994. – №3. – С. 3–6.
3. Колесникова А.А., Шигимага В.А., Смольянинова Е.И. Влияние стимуляции созревания на электропроводность и оплодотворяемость ооцитов мыши // Фундаментальные исследования. – 2013. – Ч. 4, №4. – С. 896–899.
4. Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И., Серобян Г.А. и др. Выживаемость эмбрионов мышей после сверхбыстрого замораживания разными способами с использованием различных криопротекторов // Проблемы репродукции. – 1995. – №4. – С. 13–18.
5. Погорелов А.Г., Гольдштейн Д.В., Смольянинова Е.И., Сахарова Н.Ю. Электронно-зондовый микроанализ внутриклеточной концентрации калия в клетках раннего эмбриона мыши в доимплантационный период // ДАН. – 2005. – Т. 400, №2. – С. 276–278.
6. Смольянинова Е.И., Стриха О.А., Шигимага В.О. та ін. Визначення електричної провідності ембріонів мишей доімплантацийних стадій розвитку після гормональної стимуляції яєчників тварин // Biotechnologia Acta. – 2013. – Т. 6, №1. – С. 105–112.
7. Смольянинова Е.И., Шигимага В.О., Колесникова А.О. Вплив гормональної стимуляції на морфологічні та електричні

References

1. Developmental biology of mammals. Methods / Ed. by M. Monk. – Academic Press, 1990. – 406 p.
2. Isachenko V.V., Grishchenko V.I., Ostashko F.I. et al. Ultrarapid freezing of embryos of rats and cows without 'classic equilibration' // Problems of Cryobiology. – 1994. – N3. – P. 3–6.
3. Kolesnikova A.A., Shigimaga V.A., Smolyaninova E.I. Effect of the stimulated maturation and fertilization on the electric conductivity and fertilization of mouse oocytes // Fundamentalnye Issledovaniya. – 2013. – Part 4, N4. – P. 896–899.
4. Krivoharchenko A.S., Vilyanovich L.I., Serobyan G.A. et al. Survival of mouse embryos after ultra-rapid freezing in different ways using different cryoprotectants // Problemy Reproduktsii. – 1995. – N4. – P. 13–18.
5. Pogorelov A.G., Goldstein D.V., Smolyaninova E.I., Sakharova N.Yu. Electron probe microanalysis of the intracellular concentration of potassium in the cells of the early mouse embryo in the preimplantation period // Doklady Akademii Nauk. – 2005. – Vol. 400, N2 – P. 276–278.
6. Smolyaninova E.I., Strikha O.A., Shigimaga V.O. et al. Determination of electric conductivity of murine embryos of pre-implantation stages after hormonal stimulation of animal oviducts // Biotechnologia Acta. – 2013. – Vol. 6, N1. – P. 105–112.
7. Smolyaninova E.I., Shigimaga V.O., Kolesnikova A.O. Effect of hormonal stimulation on morphofunctional and electric parameters of murine oocytes // Biologiya Tvarin. – 2009. – Vol. 11, N1–2. – С. 329–338.



- параметри ооцитів миші // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 1–2. – С. 329–338.
8. Смолянинова Е.И., Пишко О.В., Лисина Е.Г. и др. Анализ влияния различных этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №4. – С. 385–393.
 9. Смолянинова 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. 3–10.
 10. Смолянинова Е.И., Хроменкова О.Б., Жерноклев Г.В., Пишко О.В. Влияние эквипирации в среде замораживания на осмотическую устойчивость и жизнеспособность 8-клеточных эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии. – 2004. – №1. – С. 3–11.
 11. Смолянинова Е.И., Хроменкова О.Б., Жерноклев Г.В. Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии. – 2001. – №2. – С. 49–55.
 12. Чизмаджиев Ю.А., Черномордик Л.В., Пастушенко В.Ф., Абидор И.Г. Электрический пробой бислойных липидных мембран // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика мембран. – 1982. – Т. 2. – 308 с.
 13. Шигимага В.А., Мегель Ю.Е. Метод определения проводимости ооцитов и эмбрионов в различных условиях диэлектрической среды // Новые решения в современной технологии: Сб. трудов. – Харьков: НТУ ХПИ, 2011. – №9. – С. 140–144.
 14. Шигимага В.А. Определение проводимости эмбриональных клеток животных // Проблемы бионики. – 2003. – Вып. 59. – С. 60–64.
 15. Пат. №34333 Україна, МПК G01N33/483. Спосіб визначення стійкості мембрани поодинокі клітини у розчині кріопротектора / В.О. Шигимага, Є. І. Смолянинова; заявник і патентовласник ІПКіК НАН України – № U200802374; Заявл. 25.02.2008; опубл. 11.08.2008, Бюл. №15.
 16. Chehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research // Acta Physiol. Scand. – 2003. – Vol. 177, №4. – P. 437–447.
 17. Cobo A., de los Santos M.J., Castello D. et al. Outcomes of vitrified early stages and blastocyst-stage embryos in cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles // Fertil. Steril. – 2012. – Vol. 98, N5. – P. 1138–1146.
 18. Day M.L., Johnson M.H., Cook D.J. A cytoplasmic cell cycle controls the activity of a K⁺ channel in preimplantation mouse embryos // EMBO J. – 1998. – Vol. 17, №7. – P. 1952–1960.
 19. Dovey S. Oocyte cryopreservation: advances and draw back // Minerva Ginecol. – 2012. – Vol. 64, №6. – P. 485–500.
 20. Emery B.R., Miller R.L., Carrell D.T. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with prenatal cumulus cell attachment and development and developmental stage // BMC Dev. Biol. – 2001. – 1:14.
 21. Gosden R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation // Fertil. Steril. – 2013. – Vol. 96, №2. – P. 264–268.
 22. Guide to electroporation and electrofusion / Ed. by: D.C. Chang, B.M. Chassy, J.A. Saunders, A.E. Sowers. – London: Academic Press, 1992. – 571 p.
 23. Harper J., Magli M.C., Lundin K. et al. When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory // Hum. Reprod. – 2012. – Vol. 27, №2. – P. 303–313.
 24. Jin B., Mochida K., Ogura A. et al. Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages // Mol. Reprod. Dev. – 2012. – Vol. 79, №11. – P. 785–794.
 25. Lin J., Phy J., Yeomans E. Theoretical considerations regarding slow cooling and vitrification // Theriogenology. – 2012. – Vol. 78, №8. – P. 1641–1652.
 8. Smolyaninova E.I., Pishko O.V., Lisina E.G. et al. Analysis of the effect of different stages of cryopreservation by vitrification in ethylene glycol – sucrose medium on the viability of two-cell mouse embryos // Problems of Cryobiology. – 2007. – Vol. 17, N4. – P. 385–393.
 9. Smolyaninova E.I., Pogorelov A.G., Lisina E.G. et al. Effect of freezing medium on viability and the cationic composition of early mouse embryos // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol. 15, N3. – P. 3–10.
 10. Smolyaninova E.I., Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V., Pischko O.V. Effect of equilibration in the freezing medium on osmotic stability and viability of 8-cell mouse embryos // Problems of Cryobiology. – 2004. – N1. – P. 3–11.
 11. Smolyaninova E.I., Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V. Effect of different stages of cryopreservation method by ultra-rapid freezing on osmotic stability and morphofunctional integrity of mouse embryos // Problems of Cryobiology. – 2001. – N2. – P. 49–55.
 12. Chizmadzhiev Yu.A., Chernomordik L.V., Pastushenko V.F., Abidor I.G. Electric breakdown of bilayer lipid membranes // Itogi Nauki i Tekhniki. Series: Biophysics of Membranes. – 1982. – Vol. 2. – 308 p.
 13. Shigimaga V.A., Megel Yu.E. Method for determining the conductivity of oocytes and embryos in different conditions of the dielectric environment // New solutions in modern technology. Collection of papers. – Kharkov, 2011. – N9. – P. 140–144.
 14. Shigimaga V.A. Determination of conductivity of embryonic cells of animals // Problemy Bioniki. – 2003. – Issue 59. – P. 60–64.
 15. Patent Nr 34333 of Ukraine, IPC G01N33/483. Method of determination of resistance of single cell membrane in cryoprotectant solution / V.O. Shigimaga, E.I. Smolyaninova, Applied by and owned by IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine – Nr.U200802374; Filed 25.02.2008; Published 11.08.2008, Bulletin Nr. 15.
 16. Chehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research // Acta Physiol. Scand. – 2003. – Vol. 177, N4. – P. 437–447.
 17. Cobo A., de los Santos M.J., Castello D. et al. Outcomes of vitrified early stages and blastocyst-stage embryos in cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles // Fertil. Steril. – 2012. – Vol. 98, N5. – P. 1138–1146.
 18. Day M.L., Johnson M.H., Cook D.J. A cytoplasmic cell cycle controls the activity of a K⁺ channel in preimplantation mouse embryos // EMBO J. – 1998. – Vol. 17, №7. – P. 1952–1960.
 19. Dovey S. Oocyte cryopreservation: advances and draw back // Minerva Ginecol. – 2012. – Vol. 64, №6. – P. 485–500.
 20. Emery B.R., Miller R.L., Carrell D.T. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with prenatal cumulus cell attachment and development and developmental stage // BMC Dev. Biol. – 2001. – 1:14.
 21. Gosden R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation // Fertil. Steril. – 2013. – Vol. 96, N2. – P. 264–268.
 22. Guide to electroporation and electrofusion / Ed. by: D.C. Chang, B.M. Chassy, J.A. Saunders, A.E. Sowers. – London: Academic Press, 1992. – 571 p.
 23. Harper J., Magli M.C., Lundin K. et al. When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory // Hum. Reprod. – 2012. – Vol. 27, N2. – P. 303–313.
 24. Jin B., Mochida K., Ogura A. et al. Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages // Mol. Reprod. Dev. – 2012. – Vol. 79, N11. – P. 785–794.
 25. Lin J., Phy J., Yeomans E. Theoretical considerations regarding slow cooling and vitrification // Theriogenology. – 2012. – Vol. 78, N8. – P. 1641–1652.
 26. Mukaida T., Oka C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts // Best Pract. Res. Clin. Obst. Gynaecol. – 2012. – Vol. 26, N6. – P. 789–803.
 27. Pogorelov A.G., Katkov I.I., Smolyaninova E.I. Goldshtein D.V. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification



26. Mukaida T., Oka C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts // *Best Pract. Res. Clin. Obst. Gynaecol.* – 2012. – Vol. 26, №6. – P. 789–803.
27. Pogorelov A.G., Katkov I.I., Smolyaninova E.I., Goldshtein D.V. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol // *CryoLetters.* – 2006. – Vol. 27, №2. – P. 87–98.
28. Rols M. P. Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues // *Methods Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 423, №1. – P. 19–33.
29. Rols M.P. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1758, №3. – P. 423–428.
30. Shigimaga V.A. Impulse conductometer for biological cells and liquid media // *Measurement Techniques.* – 2013. – Vol. 55, №11. – P. 1294–1300.
31. Tsong T.Y. Electroporation of cell membrane // *Biophys. J.* – 1991. – Vol. 60, №2. – P. 297–306.
32. Trimarchi J.R., Lui L., Smith P.J.S., Keefe D.L. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryos // *Biol. Reprod.* – 2000. – Vol. 63, №3. – P. 851–857.
33. Weaver J.C. Theory of electroporation: a review // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1996. – Vol. 41, №2. – P. 135–160.
34. Zimmermann U. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – Vol. 694, №3. – P. 227–277.
- concentrations of ethylene glycol // *CryoLetters.* – 2006. – Vol. 27, N2. – P. 87–98.
28. Rols M. P. Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues // *Methods Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 423, N1. – P. 19–33.
29. Rols M.P. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1758, N3. – P. 423–428.
30. Shigimaga V.A. Impulse conductometer for biological cells and liquid media // *Measurement Techniques.* – 2013. – Vol. 55, N11. – P. 1294–1300.
31. Tsong T.Y. Electroporation of cell membrane // *Biophys. J.* – 1991. – Vol. 60, N2. – P. 297–306.
32. Trimarchi J.R., Lui L., Smith P.J.S., Keefe D.L. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryos // *Biol. Reprod.* – 2000. – Vol. 63, N3. – P. 851–857.
33. Weaver J.C. Theory of electroporation: a review // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1996. – Vol. 41, №2. – P. 135–160.
34. Zimmermann U. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – Vol. 694, N3. – P. 227–277.

