

Динамика насыщения ткани плаценты диметилсульфоксидом

Е.Н. БОБРОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО, М.И. ШЕТИНСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Placenta Tissue Saturation with Dimethyl Sulfoxide

E.N. BOBROVA, A.V. ZINCHENKO, M.I. SCHETINSKY

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

Проведено исследование насыщения образцов плаценты диметилсульфоксидом (ДМСО) методами ДСК и ЯМР. Образцы плаценты выдерживали в 10, 40, 60 масс % растворах ДМСО от 20 мин до 7 сут. Показано, что после эквilibрации ткани плаценты в течение 21 ч и более наблюдается уменьшение концентрации ДМСО в ткани, что, вероятно, связано с процессами, в основе которых лежат механизмы химической природы.

Ключевые слова: плацента, ДМСО, дифференциальная сканирующая калориметрия, ЯМР

Проведено дослідження насичення зразків плаценти диметилсульфоксидом (ДМСО) методами ДСК і ЯМР. Зразки плаценти витримували в 10, 40, 60 мас % ДМСО від 20 хв до 7 діб. Показано, що після еквilibрації тканини плаценти протягом 21 год і більше спостерігається зменшення концентрації ДМСО в тканині, що, мабуть, пов'язано з процесами, в основі яких лежать механізми хімічної природи.

Ключові слова: плацента, ДМСО, диференційна скануюча калориметрія, ЯМР.

The study of placenta samples' saturation with dimethyl sulfoxide (DMSO) by means of DSC and NMR methods was carried-out. Placenta samples were exposed in 10, 40, 60 % (w/w) DMSO solutions up to 7 days. A decrease in DMSO concentration in tissue after placenta tissue equilibration within 21 hrs and longer was shown, that was probably related to the processes, based on the mechanisms of chemical origin.

Key-words: placenta, DMSO, differential scanning calorimetry, NMR.

Препараты из эмбриоплацентарных тканей находят широкое применение в медицинской практике [2, 4, 7], в связи с этим возникла необходимость хранения этих тканей, в частности, ткани плаценты в течение длительного времени. Перспективный метод хранения ткани – низкотемпературное консервирование и хранение при температуре жидкого азота.

Согласно рекомендациям [3] при криоконсервировании плацентарной ткани в качестве криопротектора (КП) используется ДМСО. Время эквilibрации плаценты в растворах ДМСО (20 мин) и концентрации КП (8-10%) были найдены эмпирически с учетом работ [8, 9], выполненных в 1964-1965-х годах [1]. Однако динамика насыщения ткани криопротектором ДМСО ранее не исследовалась. В литературе отсутствуют данные о таких физических процессах, как фазовые переходы и стеклование в образцах плаценты после эквilibрации в растворах КП при низкотемпературном консервировании.

Метод ЯМР дает возможность численно определить концентрацию проникающего в ткань КП, а дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) – температуру стеклования,

Preparations from embryoplacental tissues are getting widely applied in medical practice [2, 4, 7], due to that there was a necessity to store these tissues, in particular placenta ones, for a long time period. Low temperature preservation and storage under liquid nitrogen temperature are the perspective methods for tissue storage.

According to the recommendations [3], DMSO is used as cryoprotectant (CP) during placenta tissue cryopreservation. Time of placenta equilibration in DMSO solutions (20 min) and CP concentrations (8-10%) were found empirically by taking into account the researches [8, 9] performed in the 1960s [1]. However the dynamics of tissue saturation with DMSO has not been studied before. There are no reported data about such physical processes as phase transitions and vitrification of placenta samples after equilibration in CP solutions under low temperature preservation.

NMR method enables a quantitative determination of concentration of CP penetrating into a tissue, but vitrification temperature, the value of heat absorption jump during vitrification and the temperature and character of phase transitions proceeding were accomplished with a differential scanning calorimetry (DSC) [6].

Адрес для корреспонденции: Зинченко А.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-61-41, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: alexazin@mail.ru

Address for correspondence: Zinchenko A.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 6141, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: alexazin@mail.ru

величину скачка теплопоглощения при стекловании, температуру и характер протекания фазовых переходов [6].

Цель данной работы – проведение совместного анализа данных о динамике проникновения КП в ткань с течением времени и состоянии криозащитного вещества в ткани методами ЯМР и ДСК.

Материалы и методы

Плаценту отмывали в физиологическом растворе от слизи и крови, отделяли пуповинный канатик и амниотическую оболочку, скальпелем срезали фрагменты ткани с материнской стороны в области долек размером 2x2 см и массой 1 г согласно [1].

Образцы плаценты помещали в среды эквilibрации, представляющие собой 10, 40 и 60%-е растворы ДМСО, приготовленные на физиологическом растворе. Время эквilibрации составляло 20 мин, 1, 10, 18, 21, 24 ч и 7 сут, температура эквilibрации 4°C. Концентрацию КП в образцах определяли методом ¹H ЯМР на спектрометре Tesla BS 567A.

Термограммы регистрировали на низкотемпературном дифференциальном сканирующем калориметре [6]. Особенность данного прибора - возможность предварительно охладить ячейку калориметра до любой заданной температуры в диапазоне от 0 до -196°C. Далее в ячейку может быть помещен образец, замороженный по требуемой программе вне калориметра. В работе для охлаждения калориметрические стаканчики с образцами погружали в жидкий азот. Средняя скорость охлаждения образцов составляла 3,3(3)°C/с. Термограммы регистрировали при нагреве образцов со скоростью 8,3(3)×10⁻³ °C/с.

Результаты и обсуждение

Методом калориметрии исследовали фазовые переходы и стеклование в образцах плаценты, предварительно выдержанных в средах, содержащих ДМСО.

На рис. 1 приведены термограммы плаценты, образцы которой выдерживали в среде эквilibрации с исходными концентрациями ДМСО 10, 40 и 60 масс % в зависимости от времени эквilibрации. Стрелками показаны характерные скачки теплопоглощения, эндо- и экзотермические эффекты, классификация которых в соответствии с формой кривой и диапазоном температур приведена в [5] и использована в настоящей работе:

1 – стеклование (t_g) (расстеклование при нагреве);

2 – кристаллизация из аморфной фазы (t_d);

This work was aimed to carry-out a joint data analysis of dynamics of CP penetration into a tissue in time and a state of cryoprotective substance in tissue using NMR and DSC methods.

Materials and methods

Placenta was washed out in physiological solution from mucus and blood, an umbilical cord and amniotic membrane were separated, 2x2 cm tissue fragments of 1 g weight were cut from mother side in the lobes' area according to the paper [3]. Placenta samples were placed into equilibration media, representing 10, 40 and 60% DMSO solutions, prepared on physiological solution. Equilibration time was 20 min, 1; 10; 18; 21; 24 hrs and 7 days, equilibration temperature was 4°C. CP concentration in samples was determined with ¹H NMR method by means of Tesla BS 567 A spectrometer.

Thermograms were recorded using low temperature differential scanning calorimeter [6]. The peculiarity of this device consists in the possibility of preliminary cooling a calorimeter cell down to any temperature within the range from 0 to -196°C. Then the sample, frozen by the required program outside the calorimeter can be placed into a cell. In this work the calorimetric cups with samples were immersed into liquid nitrogen to be cooled down. An average rate of sample cooling was 3.3 (3)°C/second. Thermograms were recorded under the samples' heating with 8.3(3)×10⁻³ °C/second rate.

Results and discussion

Phase transitions and vitrification in placenta samples, preliminarily exposed in DMSO-containing media were studied using calorimetry method.

The Fig. 1 demonstrates the thermograms of placenta, whose samples were exposed in equilibration medium with initial DMSO concentrations of 10, 40 and 60 % (w/w) depending on equilibration time. With arrows we marked the typical heat absorption jumps, endo- and exothermic effects, which classification according to the curve shape and temperature range was shown in the paper [5] and used in this work:

1 – vitrification (t_g) (devitrification under heating);

2 – crystallisation from amorphous phase (t_d);

3 and 4 – crystallisation and melting of eutectic compositions (T_{ce} , T_{me} , correspondingly);

5 – melting of the system (t_m).

The Table 1 shows the temperature values of phase transitions and vitrification in placenta tissue after equilibration in DMSO solutions of mentioned above concentrations.

For placenta samples, exposed in 10% DMSO solution only in 18 hrs an insignificant exo- and endothermic peaks of crystallisation and melting of

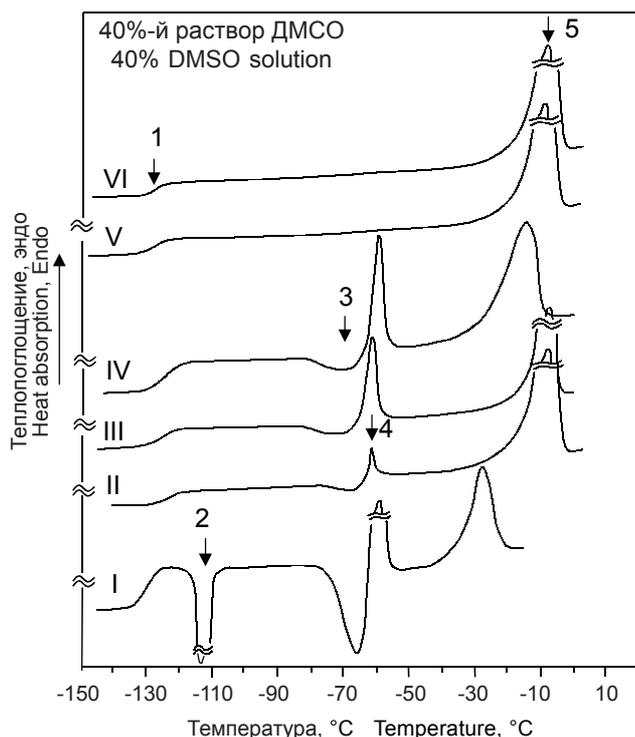
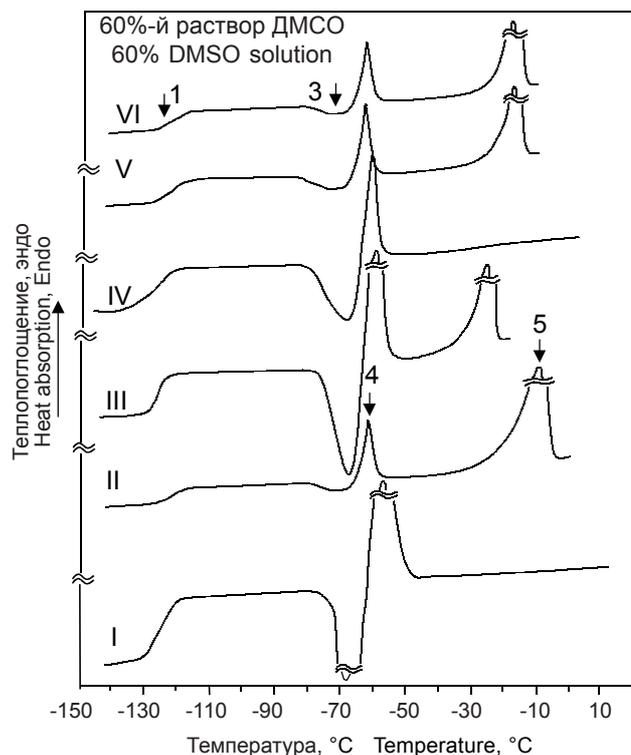
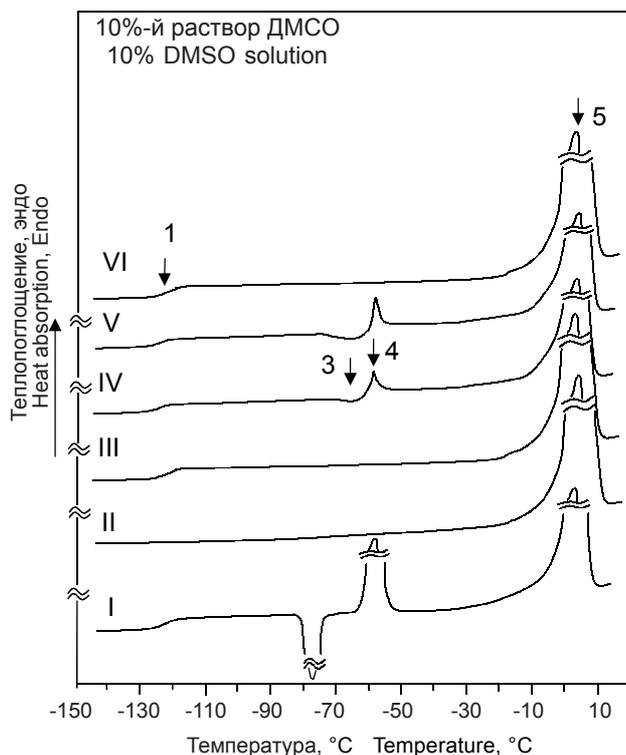


Рис. 1. Термограммы растворов ДМСО на физиологическом растворе (I); образцов плаценты после эквilibрации в растворах ДМСО: 20 мин (II); 1 ч (III); 18 ч (IV); 24 ч (V); 7 суток (VI).

Fig. 1. Thermograms of DMSO solution on physiological solution (I); of placenta samples after equilibration in DMSO solutions: 20 min (II); 1 hr (III); 18 hrs (IV); 24 hrs (V); 7 days (VI).

3 и 4 – кристаллизация и плавление эвтектических составов (соответственно T_{ce} и T_{me});
5 – плавление системы (t_m).

В табл. 1 приведены значения температур фазовых переходов и стеклования в ткани плаценты после эквilibрации в растворах ДМСО указанных выше концентраций.

Для образцов плаценты, выдержанных в 10%-м растворе ДМСО, на термограммах только через

eutectic compositions occur in thermograms, but the heat absorption jump, corresponding to vitrification, is observed 60 min later after exposure.

Placenta samples equilibration in 40% and 60% DMSO solutions results in crystallisation development and, correspondingly, in melting of eutectic compositions in the samples under heating, that was confirmed by intensive exo- and endothermic peaks (2 and 3) in thermograms.

The Fig. 2 demonstrates the values of heat absorption jump (ΔC_p) within a temperature range of vitrification in placenta samples after equilibration in DMSO solutions depending on time and cryoprotectant concentration. The ΔC_p calculation was normalised to 1 g sample mass in all cases. The heat absorption jump, responding to vitrification in studied samples indicates to the fact, that the solidification of placenta tissue, saturated with DMSO solutions is accompanied with vitreous phases formation during cooling. For the samples, exposed in 60% DMSO solution, the ΔC_p value achieves quite high values. This testifies to the fact that a significant part of the sample transforms into a vitreous state during cooling. The Fig. 4 also demonstrates that the ΔC_p reaches maximum values

18 ч появляются незначительные экзо- и эндотермические пики кристаллизации и плавления эвтектических составов, а скачок теплопоглощения, соответствующий стеклованию, наблюдается через 60 мин экспозиции.

Эквилибрация образцов плаценты в 40%- и 60%-м растворах ДМСО приводит к тому, что в образцах при нагреве развивается кристаллизация и соответственно плавление эвтектических составов, о чем свидетельствуют интенсивные экзо- и эндотермические пики (2 и 3) на термограммах.

На рис.2 представлены значения скачка теплопоглощения (ΔC_p) в температурном диапазоне стеклования в образцах плаценты после эквилибрации в растворах ДМСО в зависимости от времени и концентрации криопротектора. Расчет ΔC_p во всех случаях нормировался к массе образца 1 г. Скачок теплопоглощения, отвечающий стеклованию в исследованных образцах, указывает на то, что затвердевание ткани плаценты, насыщенной растворами ДМСО, сопровождается образованием стеклообразных фаз при охлаждении. Для образцов, выдержанных в 60%-м растворе ДМСО, величина ΔC_p достигает достаточно больших значений. Это свидетельствует о том, что в стеклообразное состояние при охлаждении переходит значительная часть образца. Из рис.2 видно также, что максимальных значений ΔC_p достигает через 18 ч эквилибрации как в 40%-м, так и 60%-м растворе ДМСО, а через 21 ч наблюдается значительное уменьшение ΔC_p . Одновременно с этим отмечено изменение температуры плавления льда в тканях плаценты в зависимости от времени эквилибрации их в растворах ДМСО. Как в 40%-м, так и 60%-м растворе ДМСО после эквилибрации в течение 18 ч зарегистрировано максимально низкое значение температуры плавления системы, затем ее повышение, что

Таблица 1. Температуры фазовых переходов и стеклования в образцах плаценты после эквилибрации в растворах ДМСО.
Table 1. Temperature of phase transitions and vitrification in placenta samples after equilibration in DMSO solutions

Концентрация КП, масс % CP concentration, % (w/w)	Время Time	Температура, °C Temperature, °C				
		t_g	T_d	T_{ce}	T_{me}	t_m
0	—	—	—	—	—	— 1
10	20 мин 20 min	—	—	—	—	— 2,5
	1 ч 1 hr	— 124,3	—	—	—	— 4,0
	10 ч 10 hrs	— 124,5	—	—	—	— 4,3
	18 ч 18 hrs	— 124,1	—	— 71,7	— 61,9	— 4,5
	21 ч 21 hrs	— 125,0	—	— 71,9	— 61,2	— 4,5
	24 ч 24 hrs	— 124,7	—	— 72,0	— 61,5	— 4,7
	7 сут 7 days	— 124,5	—	—	—	— 4,8
40	20 мин 20 min	— 126,0	—	— 72,3	— 63,5	— 23,0
	1 ч 1 hr	— 124,4	—	— 77,9	— 63,8	— 29,6
	10 ч 10 hrs	— 126,0	—	— 74,5	— 63,0	— 31,2
	18 ч 18 hrs	— 125,2	—	— 75,8	— 62,4	— 38,2
	21 ч 21 hrs	— 125,6	—	— 76,7	— 63,1	— 31,1
	24 ч 24 hrs	— 125,8	—	—	—	— 30,0
	7 сут 7 days	— 125,4	—	—	—	— 29,4
60	20 мин 20 min	— 124,2	—	— 67,5	— 63,6	— 27,8
	1 ч 1 hr	— 128,2	—	— 78,2	— 64,3	— 43,5
	10 ч 10 hrs	— 128,3	— 97,2	— 75,7	— 62,2	— 55
	18 ч 18 hrs	— 126,0	—	— 80,5	— 63,2	— 59,3
	21 ч 21 hrs	— 127,1	—	— 77,8	— 64,1	— 42,5
	24 ч 24 hrs	— 126,5	—	— 76,4	— 64	— 37,8
	7 сут 7 days	— 128,5	—	— 76,2	— 62,6	— 38,0

after 18 hrs of equilibration both in 40% and 60% DMSO solution, but a considerable decrease in ΔC_p is observed in 21 hrs. Simultaneously with this a change in temperature of ice melting in placenta tissues depending on their equilibration time in DMSO solutions

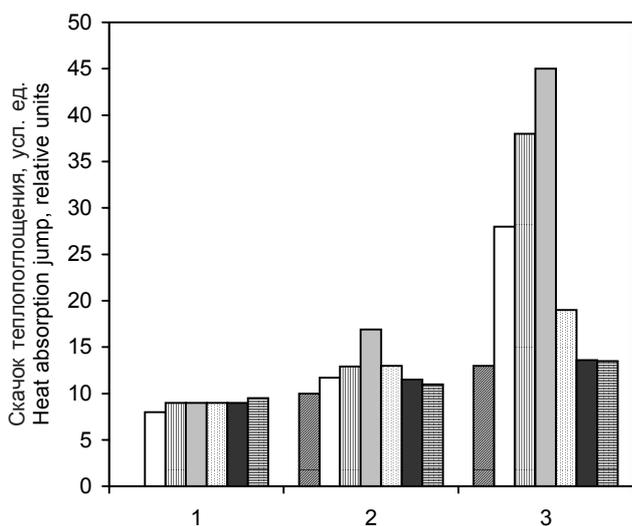


Рис. 2. Скачок теплопоглощения ΔC_p в образцах плаценты в температурном диапазоне стеклования после экспозиции при различном времени в растворах ДМСО: 1 – 10%; 2 – 40%; 3 – 60%; ▨ – 20 мин; □ – 1 ч; ▩ – 10 ч; ■ – 18 ч; ▪ – 21 ч; ■ – 24 ч; □ – 7 сут.

Fig. 2. Heat absorption jump ΔC_p by placenta samples in temperature range of vitrification after exposure under different time in DMSO solutions: 1 – 10%; 2 – 40%; 3 – 60%; ▨ – 20 min; □ – 1 hr; ▩ – 10 hrs; ■ – 18 hrs; ▪ – 21 hrs; ■ – 24 hrs; □ – 7 days.

указывает на изменение концентрации ДМСО в образцах ткани плаценты в зависимости от времени эквilibрации.

С увеличением ΔC_p после эквilibрации в 60%-м растворе ДМСО в течение 1 и 18 ч на термограммах (рис.1) наблюдается уменьшение экзо- и эндотермических пиков 2 и 3, что указывает на смещение процесса затвердевания в тканях в сторону стеклообразования.

Однако одновременное уменьшение ΔC_p , а также пиков 2 и 3 при эквilibрации плаценты как в 40%-м, так и 60%-м растворе ДМСО более 21 ч может свидетельствовать о возможных изменениях молекул ДМСО в тканях, например окислительных процессах (превращение Me_2SO в Me_2SO_2), или об образовании продуктов взаимодействия ДМСО с активными веществами плаценты. Продукты химических превращений ДМСО могут не проявлять стеклообразующих свойств и в меньшей степени образовывать эвтектические составы.

Методом 1H -ЯМР спектроскопии определяли концентрацию КП в образцах плаценты после эквilibрации их в указанных выше смесях. В табл. 2 приведены значения исходной концентрации растворов КП, в которых выдерживались образцы плаценты и конечной концентрации криопротектора в ткани плаценты после экспозиции их в 10-, 40- и 60%-х растворах ДМСО при различных временах эквilibрации.

is observed. Both in 40% and 60% DMSO solutions after equilibration within 18 hrs a maximum low temperature value of system melting, followed by its increase, is recorded, that indicates to a change in DMSO concentration in placenta tissue samples depending on equilibration time.

With ΔC_p increase after equilibration in 60% DMSO solution during 1 and 18 hrs a decrease in exo- and endothermic peaks 2 and 3 is shown in thermograms (Fig. 3). It means that the solidification process in tissue is shifted towards a vitrification side.

However a simultaneous reduction of ΔC_p , as well as peaks 2 and 3 under placenta equilibration both in 40% and 60% DMSO solutions more than 21 hrs can testify to the fact, that DMSO molecules in tissues can undergo certain changes, for examples, be subjected to oxidative processes (DMSO transformation into $DMSO_2$) or the formation of products of DMSO interaction with active placenta substances is probable. The products of DMSO chemical transformations may not manifest any vitrifying properties and form eutectic compositions in a less extent.

The CP concentration in placenta samples after their equilibration in the mentioned above mixtures was determined using 1H -NMR spectroscopy. The Table 2 shows the values of initial concentration of CP solutions, where placenta samples were exposed, as well as a final CP concentration in placenta tissue after their exposure in 10, 40 and 60% DMSO solutions within different equilibration times.

Таблица 2. Значения концентраций, полученные методом ЯМР в образцах плаценты после эквilibрации в растворах ДМСО

Table 2. Concentrations values, obtained by NMR in placenta samples after equilibration in DMSO solutions

Время эквilibрации Equilibration time	Концентрация ДМСО,% DMSO concentration,%	
	в среде эквilibрации in equilibration medium	в ткани плаценты in placenta tissue
20 мин 20 min	10	7
24 ч 24 hrs	10	8
20 мин 20 min	40	17
60 мин 60 min	40	24
24 ч 24 hrs	40	23
20 мин 20 min	60	37
60 мин 60 min	60	30
24 ч 24 hrs	60	21

При эквilibрации ткани плаценты в 10%-м растворе ДМСО наблюдается возрастание концентрации КП в ткани от 0 до 7 масс % в течение 20 мин, через сутки до 8 масс %, незначительное снижение – после эквilibрации ее в среде, содержащей 40 масс % ДМСО, в течение 24 ч по сравнению со временем эквilibрации 60 мин.

Выдерживание образцов плаценты в течение суток в 60%-м растворе ДМСО приводит к существенному снижению концентрации ДМСО в ткани до 21 масс %.

Как видно из экспериментальных данных, процесс насыщения ткани плаценты КП имеет достаточно сложную зависимость от времени и концентрации ДМСО в насыщаемом растворе. В течение первых 20 мин эквilibрации происходит максимальное насыщение ткани КП, однако содержание ДМСО в тканях со временем уменьшается интенсивнее при более высокой концентрации КП в среде эквilibрации. Таким образом, исследования динамики проникновения ДМСО в ткань плаценты, проведенные методом ЯМР, подтверждают результаты, полученные методом ДСК, и указывают на то, что процесс насыщения плаценты ДМСО не может быть описан простым законом диффузии. На этот процесс накладывается химическое взаимодействие ДМСО с тканью плаценты, причем это взаимодействие зависит от времени и концентрации ДМСО.

Выводы

После эквilibрации плаценты в растворах ДМСО в течение 21 ч протекают процессы, в основе которых, вероятно, лежат механизмы химической природы, приводящие к значительному снижению количества ДМСО в ткани. Этот факт следует учитывать при разработке практических методов криоконсервирования плаценты (возможно и других биологических объектов) с использованием ДМСО в качестве КП. Исследования механизмов, приводящих к уменьшению содержания ДМСО в тканях плаценты, будут продолжены.

Литература

1. Говоруха Т.П., Репин Н.В., Цупиков О.М. Структурная характеристика ткани плаценты после инкубации с ДМСО // Пробл. криобиологии.– 2003.– №2.– С. 91-97.
2. Гольцев А.Н., Грищенко В.И., Рассоха И.В., Останков М.В. Возможность использования продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса как корректора апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях // Пробл. криобиологии.– 2003.– №4.– С. 41-48.
3. Грищенко В.И., Прокопюк О.С., Кузьміна І.Ю. та ін. Заготівля, криоконсервування плацентарної тканини і її клінічне застосування: Метод. рекомендації.– Харків, 1996.– 15 с.

During placenta tissue equilibration in 10% DMSO solution there is observed the augmentation of DMSO concentration in tissue from 0 to 7% (w/w) during 20 min, and to 8% (w/w) in 24 hrs, a slight reduction after its equilibration in 40% (w/w) DMSO-contained medium during 24 hrs in comparison with 60 min equilibration time.

The exposure of placenta samples within 24 hrs in 60% DMSO solution results in a considerable reduction of DMSO concentration in tissue down to 21% (w/w).

The experimental results demonstrate, that the process of placenta tissue saturation with CP has a quite complicated dependency on time and DMSO concentration in saturated solution. Within first 20 min of equilibration the maximum tissue saturation with CP occurs, but there is more intensive reduction of DMSO content in tissues with time under higher CP concentration in equilibration medium. Thus, the investigations of dynamics of DMSO penetration into placenta tissue, performed with NMR method, confirm the results, obtained using DSC method and indicate to the fact, that the process of placenta saturation with DMSO can not be described by a simple law of diffusion. The chemical interaction of DMSO with placenta tissue overlays on this process, moreover this interaction depends on time and DMSO concentration.

Conclusions

After placenta equilibration in DMSO solutions during 21 hrs there are the processes, based probably on the mechanisms of chemical origin, resulting in a considerable decrease in DMSO amount in tissue. This fact should be taken into consideration when elaborating practical methods for placenta cryopreservation (and probably other biological objects) with DMSO as CP. The investigations of mechanisms, resulting in a decrease in DMSO content in placenta tissue will be continued.

References

1. Govorukha T.P., Repin N.V., Tsupikov O.M. Structural characteristics of placenta tissue after incubation with DMSO // Problems of Cryobiology.– 2003.– N2.– P. 91-97.
2. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Rassokha I.V., Ostankov M.V. Possibility of using the embryo fetoplacental complex products to correct apoptotic processes under autoimmune diseases // Problems of Cryobiology.– 2003.– N4.– P. 41-48.
3. Grischenko V.I., Prokopyuk O.S., Kuzmina I.Yu., Yurchenko T.M., Strona V.I. Yukhymuk L.M. Procurement, cryopreservation of placental tissue and its clinical application: Methodical recommendations.– Kharkov, 1996.– 15 p.
4. Grischenko V.I., Lazurenko V.V., Prokopyuk O.S., Aralov O.N. Usage of cryopreserved placental tissue when treating pregnancy failure // Problems of Cryobiology.– 2003.– N1.– P. 76-80.
5. Zinchenko A.V., Bobrova E.N., Schetinskiy M.I. DMSO effect on phase transitions and vitrification in cord blood erythrocyte

4. Грищенко В.И., Лазуренко В.В., Прокопюк О.С., Аралов О.Н. Использование криоконсервированной плацентарной ткани в лечении невынашивания беременности // Пробл. криобиологии.– 2003.– №1.– С. 76-80.
5. Зинченко А.В., Боброва Е.Н., Щетинский М.И. Влияние ДМСО на фазовые переходы и стеклование в суспензии эритроцитов кордовой крови ниже 0°C // Пробл. криобиологии.– 2003.– №2.– С. 16-21.
6. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур –196-0°C: Автореф. дис... канд. физ-мат.наук.– Харьков, 1983.– 22 с.
7. Питько В.А. Механизмы иммунологического действия фетальных препаратов при экспериментальном воспалительном процессе // Пробл. криобиологии.– 2000.– №4.– С. 72-75.
8. Ashwood-Smith M. J. Low temperature preservation of mouse lymphocytes with DMSO // Blood.– 1964.– Vol. 23, N3.– P. 494-499.
9. Barner H.B. The vascular lesion of freezing as modified by dimethylsulphoxide // Cryobiology.– 1965.– Vol. 2, N1.– P. 55-57.
6. Zinchenko A. V. Investigation of phase transitions and physical states of aqueous solutions of polyatomic alcohols within temperature range of –196 - 0°C: Author's abstract of thesis for candidate's degree obtaining.– Kharkov, 1983.– 22 p.
7. Pitko V.A. Mechanisms of immunologic effect of fetal preparations at experimental inflammatory process//Problems of Cryobiology.– 2000.– N4.– P. 72-75.
8. Ashwood-Smith M.J. Low temperature preservation of mouse lymphocytes with DMSO // Blood.– 1964.– Vol. 23, N3.– P. 494-499.
9. Barner H.B. The vascular lesion of freezing as modified by dimethyl sulfoxide // Cryobiology.– 1965.– Vol. 2, N1.– P. 55-57.

Accepted in 16.11.2004

Поступила 16.11.2004