

Структурная характеристика ткани плаценты после инкубации с ДМСО

Т.П. Говоруха, Н.В. Репин, О.М. Цупиков

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Structural Characteristics of Placenta Tissue after Incubation with DMSO

Govorukha T.P., Repin N.V., Tsupikov O.M.

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучена структурная характеристика ткани плаценты после инкубации с ДМСО. Показано, что после инкубации фрагментов плаценты с 8%-м ДМСО обнаруживаются наиболее выраженные ультраструктурные изменения в поверхностном слое ворсинчатого хориона - синцитиотрофобласте.

Ключевые слова: структура, плацента, ДМСО.

Вивчена структурна характеристика ткани плаценти після інкубації з ДМСО. Показано, що після інкубації фрагментів плаценти з 8%-м ДМСО виявляються найбільш виражені ультраструктурні зміни в поверхневому шарі ворсинчастого хоріону – синцитіотрофобласті.

Ключові слова: структура, плацента, ДМСО.

Structural characteristics of placenta tissue after incubation with DMSO were studied. After incubating the placenta fragments with 8% DMSO the most manifested ultrastructural changes were shown to be revealed in a surface layer of chorion villi, that was syncytiotrophoblast.

Key words: structure, placenta, DMSO.

Одной из основных проблем криобиологии является изыскание эффективных защитных сред, обеспечивающих высокий уровень полноценности биологических объектов в современных технологических процессах низкотемпературного консервирования.

ДМСО - эндоцеллюлярный криопротектор, криозащитное действие которого обуславливает целый ряд его химических и фармакологических свойств. Он легко проникает через мембраны клеток, влияя на их микрокапиллярную систему, взаимодействует с биомакромолекулами и молекулами воды, образуя различной природы комплексы. Это соединение, наряду со способностью изменять физическое состояние воды, растворимость солей и органических растворителей, обладает выраженными противоишемическими и антиоксидантными свойствами [5].

ДМСО широко используется при низкотемпературном консервировании клеток костного мозга, лейкоцитов, микроорганизмов [4]. Показано модулирующее влияние ДМСО на функциональное состояние щитовидной железы [8]. Разработаны способы криоконсервирования с ДМСО гепатоцитов [9], амниотической оболочки [7], гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека

One of the main problems of cryobiology is the search of the efficient protective media, providing a high level of biological objects' integrity in current technological processes of low temperature preservation.

DMSO is endocellular cryoprotectant which cryoprotective effect stipulates the series of its chemical and pharmacological properties. It easily penetrates through the cell membranes, by affecting their microcapillary system, interacts with biomacromolecules and water molecules, by forming the complexes of different nature. This compound along with the ability to change physical state of water, the solubility of salts and organic solvents, has the manifested anti-ischemic and antioxidant properties [5].

DMSO is widely applied when preserving under low temperature bone marrow cells, leukocytes, microorganisms [4]. A modeling DMSO effect on functional state of thyroid gland [8] was demonstrated [5]. The methods of cryopreservation with DMSO for hepatocytes [9], amniotic membrane [7], human embryonic liver's hemopoietic cells [10], tissues of fetoplacental complex [11] have been elaborated.

In spite of a versatile action and manifested cryoprotective properties of DMSO, the character of the cryoprotectant effect on cell structure is presented

Адрес для корреспонденции: Говоруха Т.П. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7721034, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Govorukha T.P. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721034, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

[10], тканей фетоплацентарного комплекса [11].

Несмотря на многогранность действия и выраженные криопротекторные свойства ДМСО, характер влияния криопротектора на структуру клеток представлен в литературе в основном сведениями о сочетанном действии низких температур и криопротектора [2, 14]. Несомненный интерес представляет информация о реакции клеток и тканей после инкубации с криопротектором.

Сведения о действии криопротекторов на метаболические и морфологические показатели клеток различных биологических объектов немногочисленны [1, 3], а данные о влиянии ДМСО на морфологическое состояние ткани плаценты отсутствуют. В связи с этим целью работы явилось изучение морфологического состояния ткани плаценты после инкубации с криопротектором ДМСО.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали фрагменты плацент, полученных после операции кесарево сечение у здоровых женщин с нормально протекающей беременностью.

Кусочки плаценты, размером 4×3×2 мм, инкубировали в растворе ДМСО 8%-й концентрации в течение 20 мин. Выбор концентрации, времени инкубации и температуры среды обусловлены данными, приведенными в [12, 13].

Для гистологического исследования ткань плаценты фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина в течение 24 ч. После промывки фиксированный материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в целлоидин. Полученные срезы, толщиной 6-8 мкм, окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином. Микропрепараты просматривали на микроскопе МБР-3.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки плаценты фиксировали в 2%-м растворе глутарового альдегида и постфиксировали в 1%-м растворе четырехоксида осмия. После обезвоживания спиртами возрастающей концентрации кусочки ткани пропитывали смесью эпон-аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу. Ультраструктуру клеток плаценты исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты и обсуждение

При микроскопическом исследовании плацент контрольной группы идентифицируются все основные компоненты плодной и материнской

in the literature mainly by the data about the low temperatures and cryoprotectant combined effect [2, 14]. The information about cell and tissue reaction after incubation with cryoprotectant is of undoubted interest.

In the literature the cryoprotectant effects on metabolic and morphological indices of cells of different biological objects are slightly reported [1, 3], but there are no data about DMSO effect on morphological state of placenta tissue. In this connection the aim of the work was to study a morphological state of placenta tissue after incubation with DMSO.

Materials and methods

Placenta fragments, obtained after Cesarean section operation in healthy women with normally proceeding pregnancy were used as an object for investigation.

Placenta 4×3×2 mm's pieces were incubated in DMSO solution of 8% concentration for 20 min. The choice of concentration, incubation time and medium temperature was stipulated by the data, presented in the paper [12, 13].

For histological investigation the placenta tissue was fixed in 10% solution of neutral formalin for 24 hrs. After washing-out the fixed material was dehydrated in alcohols of ascending concentration and embedded in celloidin. The obtained sections of 6-8 mcm' thickness were stained with Ehrlich hematoxylin and eosin. Micropreparations were observed in MBR-3 microscope.

For electron-microscopic investigations the placenta pieces were fixed in 2% solution of glutaraldehyde and post-fixed in 1% solution of osmium tetroxide. After dehydration by alcohols of ascending concentration the tissue pieces were saturated with epon-araldit mixture. Ultrathin sections for electron microscopy were contrasted with saturated aqueous solution of uranyl acetate and lead citrate solution by Reynolds's. The ultrastructure of placenta cells was investigated using PEM-125K electron microscope at 75kV accelerating voltage.

Results and discussion

During microscopic examination of the placenta of control group all the components of fetus and mother's organ parts are identified. Thus, the base of fetal part comprises a chorion plate, covered with one-layer prismatic epithelium of uniform thickness. The boundaries between cells are distinct, their cytoplasm is basophilic and the nuclei have an oval form with dense small blocks of chromatin. The mother's part villi have a distinct syncytial cover, representing a basophilic edging with hyperchromic compact nuclei, located in one or more rows. Two types of cells: large and small ones are revealed in decidual layer. Large one- or two-nuclear cells in the form of accumulations are tightly adjacent to each other. The nuclei of these

частей органа. Так, основа плодной части состоит из хориальной пластинки, покрытой однослойным призматическим эпителием равномерной толщины. Границы между клетками отчетливы, их цитоплазма базофильна, а ядра имеют овальную форму с плотными глыбками хроматина. Ворсинки материнской части имеют четкий синцитиальный покров, представляющий собой базофильную кайму с гиперхромными глыбчатыми ядрами, расположенными в один или несколько рядов. В децидуальном слое выявляются две разновидности клеток – крупные и мелкие. Крупные одно- или двухядерные клетки в виде скоплений тесно прилегают одна к другой. Ядра этих клеток овальные с сетчатой структурой. Цитоплазма их прозрачна, нежно-зернистая. Мелкие децидуальные клетки, чаще веретенообразной или звездчатой формы, располагаются друг от друга на определенном расстоянии. Ворсины имеют многочисленные сосуды микроциркуляторного русла, особенно капилляры с овальными бухтообразными расширениями (синусами). В большинстве случаев просвет межворсинчатого пространства свободен, лишь местами наблюдаются скопления эритроцитов. Иногда просветы заполнены фибриноидной субстанцией.

При электронно-микроскопическом исследовании ворсин хориона плаценты в исходном состоянии наблюдаются многочисленные микроворсинки, которые располагаются на поверхности синцитиотрофобласта, представляющего собой область скопления ядер, плотно прилегающих друг к другу. Ядра характеризуются четкими контурами наружной и внутренней ядерных мембран, узким, равномерной ширины перинуклеарным пространством. Нуклеоплазма содержит мелкодисперсные глыбки эухроматина и скопления гетерохроматина, который концентрируется вдоль внутренней ядерной мембраны и небольшими островками распределяется по всему объему ядра. Большая часть митохондрий эпителия ворсин имеет округлую или овальную форму с четкой двойной мембраной и короткими кристами, ориентированными перпендикулярно к длинной оси органеллы. Обнаруживаются также митохондрии с несколько разреженным матриксом. Зернистая эндоплазматическая сеть представлена или уплощенными канальцами, находящимися вблизи ядра и митохондрий, или расширенными цистернами. Вдоль апикальной поверхности синцития обнаруживаются различные по величине пузырьки и вакуоли с хлопьевидным содержимым, размер которых увеличивается по мере приближения к более глубоким слоям. Между синцитием и базальной мембраной располагаются единичные клетки цитотрофобласта, характеризующиеся

cells are oval with reticular structure. Their cytoplasm is transparent, smoothly granular. Small decidual cells are often spindle- or star-shaped, located at the certain distance apart. Villi have numerous vessels of microcirculatory channel, especially capillaries with oval bay-shaped widening (sinuses). In the majority of cases the lumen of intervilli space is free, the erythrocyte's accumulations are observed only here and there. Sometimes the lumens are filled with a fibrinoid substance.

During electron-microscopic investigation of placenta chorion villi in the initial state there are observed the numerous microvilli, located on syncytiotrophoblast surface, representing the area of nuclei accumulations, tightly adjacent to each other. The nuclei are characterised by distinct contours of external and internal nuclear membranes, a narrow, uniformly wide perinuclear space. Nucleoplasm contains the finely disperse small blocks of euchromatin and accumulations of heterochromatin, concentrated along the internal nuclear membrane and distributed by small islets over the whole volume of nucleus. The majority of villi epithelium mitochondria have a roundish or oval shape with a distinct double membrane and short crystals, orientated transversely to the organella long axis. Mitochondria with a quite rarefied matrix are revealed as well. Granular endoplasmic reticulum is represented by either flattened small channels, placed close to a nucleus and mitochondria, or by extended cisterns. Along the syncytium apical surface there are revealed different by size vesicles and vacuoles with floccular content, which size increases when approaching towards deeper layers. Single cytotrophoblast cells, characterised by a light electron-optical density of nucleus and chromatin, are located between syncytium and a basal membrane. External and internal nuclear membranes have distinct contours and narrow uniformly wide perinuclear space. Heterochromatin is concentrated along the internal nuclear membrane in a tight contact with it. Chromatin is diffusely located in a middle part of nucleus, although even here the small condensations of nuclear material are observed. The cytoplasm comprises the mitochondria with the matrix of average electronic density and distinct crystals, as well as the narrow cisterns of granular endoplasmic reticulum. Subepithelial basal membrane is found as a uniform band of homogenous substance. Endothelial cells form the capillary walls, which lumens are widened and comprise a moderate number of erythrocytes. Not numerous mitochondria, membrane structures of endoplasmic reticulum and a great number of pinocytosis vesicles are revealed in cytoplasm. Chaotically located fibrils, free ribosomes and polyribosomes are noted as well.

After incubating placenta fragments with 8% DMSO solution the tissue structure does not

светлой электронно-оптической плотностью ядра и цитоплазмы. Наружная и внутренняя ядерные мембраны имеют четкие контуры и узкое, равномерной ширины, перинуклеарное пространство. Гетерохроматин концентрируется вдоль внутренней ядерной оболочки, плотно контактируя с ней. В средней части ядра хроматин располагается диффузно, хотя и здесь встречаются небольшие сгущения ядерного материала. Цитоплазма содержит митохондрии с матриксом средней электронной плотности и четкими кристами, а также узкие цистерны зернистой эндоплазматической сети. Подэпителиальная базальная мембрана определяется в виде равномерной полосы гомогенного вещества. Эндотелиальные клетки формируют стенки капилляров, просветы которых расширены и содержат умеренное количество эритроцитов. В цитоплазме обнаруживаются немногочисленные митохондрии, мембранные структуры эндоплазматической сети и множество мелких пиноцитозных пузырьков. Отмечаются также хаотично расположенные фибриллы, свободные рибосомы и полирибосомы.

После инкубации фрагментов плаценты с 8%-м раствором ДМСО структура ткани существенно не изменяется по сравнению с исходным состоянием.

Как и в контроле, амниотическая оболочка представлена слоем эпителиальных клеток призматической формы, располагающихся в один ряд. Цитоплазма их базофильна, а ядра имеют округлую или овальную форму с плотными глыбками хроматина. Изредка наблюдается десквамация отдельных клеток. Базальная мембрана амниотического эпителия в некоторых местах утолщается. Синцитиальный покров ворсинок представлен в виде четкой протоплазматической каймы с гиперхромными глыбчатыми ядрами, расположенными в один или несколько рядов. Узелки роста хорошо видны. Основная масса ворсинок с рыхлой базофильной стромой и расширенными полнокровными сосудами. Иногда встречаются ворсины, строма которых частично, преимущественно по периферии, подвергается фибриноидному превращению. Межворсинчатое пространство в некоторых участках уменьшается, изредка наблюдается слипание соседних ворсин. Клетки децидуальной оболочки частью с оксифильной, частью с базофильной цитоплазмой, крупными глыбчатыми ядрами овальной или округлой формы. На всем протяжении децидуальной оболочки отмечается обильное количество фибриноидной субстанции (рис. 1).

Следует отметить, что данные морфологические изменения не являются проявлением действия ДМСО, а соответствуют физиологически

considerably change in comparison with the initial state.

As in the control, an amniotic membrane is represented by the layer of epithelial cells with prismatic shape, located in one row. Their cytoplasm is basophilic, and the nuclei have a roundish or oval shape with dense small blocks of chromatin. The desquamation of certain cells is occasionally seen. The amniotic epithelium's basal membrane is thickened in certain places. Syncytial cover of villi is in the form of a distinct protoplasmatic border with hyperchromic compact nuclei, located in one or many rows. The growth nodules are well seen. The majority of villi are with a porous basophilic stroma and widened plethoric vessels. Sometimes we can see the villi, which stroma is partially, mostly along the periphery, subjected to a fibrinoid transformation. The intervillous space in certain sites is reduced, the adhesion of adjoining villi is now and then observed. Cells of decidual membrane are partially with oxyphilic and basophilic cytoplasm, large compact nuclei of oval and roundish shape. All along the decidual cover a great number of fibrinoid substance is observed (Fig. 1).

It should be noted, that these morphological changes are not the DMSO effect manifestations, but correspond to physiologically normal mature placenta.

At the same time, the electron-microscopic study of placenta tissue after incubation with cryoprotectant revealed a number of ultrastructural changes in chorion villi.

On the syncytiotrophoblast surface along with numerous microvilli of different length and electron density, there are detected the sites, deprived of syncytial outgrowings (Fig. 2). The nuclei of villi epithelium have quite often the indented contours and extended perinuclear space. The appearance of local cavities near the nuclear membrane is of our attention (Fig. 3). In the majority of nuclei there is the predomination of heterochromatin, distributing in the

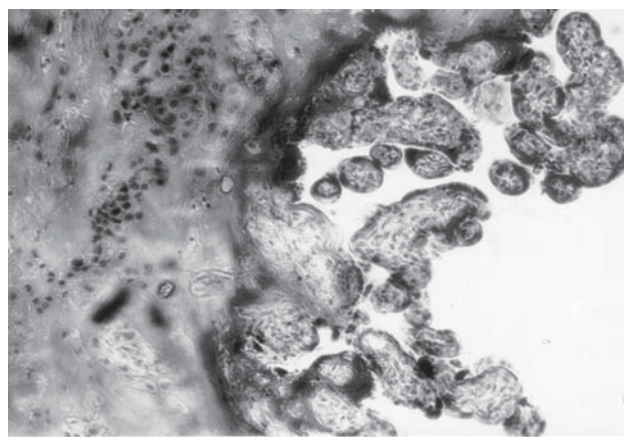


Рис. 1. Ворсинки материнской части и децидуальный слой плаценты после инкубации с ДМСО, $\times 372$.

Fig. 1. Villi of mother's part and decidual layer of placenta after incubation with DMSO, $\times 372$.

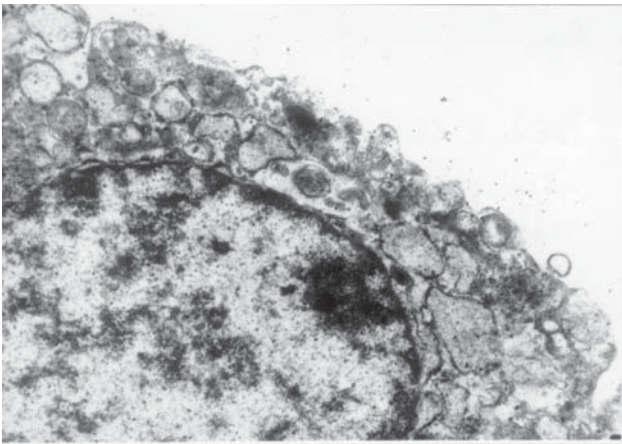


Рис. 2. Участок синцитиотрофобласта, лишенный ворсинок после инкубации с ДМСО, $\times 26\ 100$.

Fig. 2. Syncytiotrophoblast site, deprived of villi after incubation with DMSO, $\times 26\ 100$.

нормальной зрелой плаценте.

В то же время электронно-микроскопическое исследование ткани плаценты после инкубации с криопротектором выявило ряд ультраструктурных изменений ворсинчатого хориона.

На поверхности синцитиотрофобласта, наряду с многочисленными микроворсинками различной длины и электронной плотности, обнаруживаются участки, лишенные синцитиальных выростов (рис. 2). Ядра эпителия ворсин нередко имеют изрезанные контуры и расширенное перинуклеарное пространство. Обращает на себя внимание появление локальных полостей около ядерной мембраны (рис. 3). В большинстве ядер преобладает гетерохроматин, который в виде крупных уплотненных глыбок распределяется по всему объему ядра. В цитоплазме синцития эндоплазматическая сеть представлена расширенными канальцами, среди которых встречаются крупные цистерны. Иногда обнаруживаются митохондрии с просветленным матриксом и дезинтегрированными кристами. Изменения ультраструктуры цитотрофобласта менее выражены. Их цитоплазма содержит немногочисленные митохондрии округлой формы с четкими кристами и просветленным матриксом. Редкие канальца эндоплазматической сети в виде расширенных цистерн обнаруживаются в гиалоплазме. Базальная мембрана, отделяющая эпителий от стромы ворсин, имеет неравномерную толщину. В некоторых местах наблюдается отслоение эпителиального пласта от стромы. Клетки стромы ворсин менее подвержены структурным изменениям. Эндотелиальные клетки, в основном, сохраняют свои ультраструктурные особенности. Ядра их слегка вытянуты. Единичные митохондрии с плотным матриксом и короткими кристами располагаются в апикальной части цитоплазмы. Лишь изредка

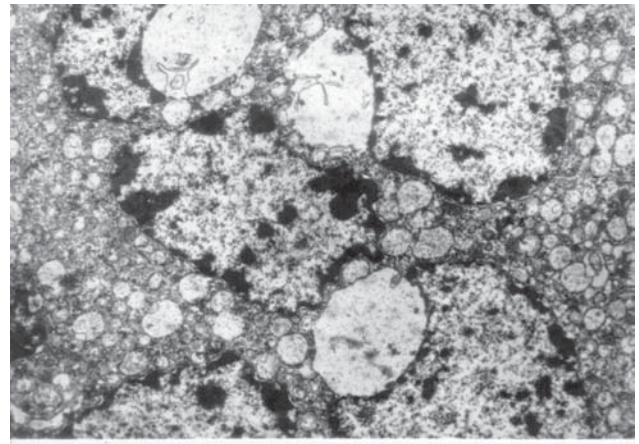


Рис. 3. Образование локальных расширений перинуклеарного пространства в ядрах эпителия ворсин после инкубации с ДМСО, $\times 10\ 000$.

Fig. 3. Formation of local widenings of perinuclear space in epithelium nuclei of villi after incubation with DMSO, $\times 10\ 000$.

form of large packed small blocks along the whole nucleus volume. In the syncytium cytoplasm the endoplasmic reticulum is represented by extended small channels, among which the large cisterns are seen. Sometimes there are revealed the mitochondria with enlightened matrix and disintegrated crystals. The changes in cytotrophoblast ultrastructure are less manifested. Their cytoplasm contains not numerous mitochondria of roundish shape with distinct and enlightened matrix. Rare small channels of endoplasmic reticulum in the form of extended cisterns are revealed in cytoplasm. Basal membrane, separating epithelium from villi stroma has an uneven thickness. In some sites there is observed the exfoliation of epithelial layer from stroma. Stroma villi cells are less subjected to structural changes. Endothelial cells mainly preserve their ultrastructural peculiarities. Their nuclei are slightly elongated. Single mitochondria with dense matrix and short crystals are located in apical part of

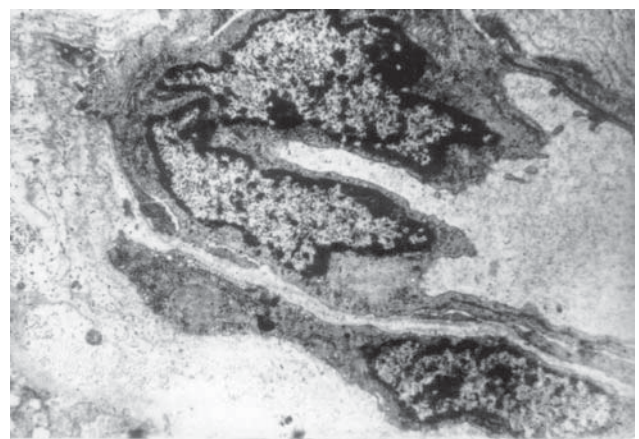


Рис. 4. Реактивное состояние эндотелия сосуда после инкубации с ДМСО, $\times 10\ 200$.

Fig. 4. Reactive state of vessel endothelium after incubation with DMSO, $\times 10\ 200$

встречаются митохондрии с просветленным матриксом. Зернистая эндоплазматическая сеть представлена системой сообщающихся каналов, вакуолей и цистерн, к поверхности которых прикреплены рибосомы. На поверхности эндотелиоцитов обнаруживаются микроворсинки и выросты. Часть клеток имеет выпячивание околоядерной зоны в просвет сосудов (рис. 4).

Выводы

Таким образом, проведенное исследование позволяет сказать, что после инкубации фрагментов плаценты с 8%-м ДМСО обнаруживаются наиболее выраженные ультраструктурные изменения в поверхностном слое ворсинчатого хориона – синцитиотрофобласте. Наряду с этим, обнаруживаются изменения структуры цитотрофобласта, базальной мембраны, реактивное состояние эндотелия сосудов.

Электронно-микроскопический метод выявляет некоторые стереотипные изменения в структуре внутриклеточных органелл, которые носят неспецифический характер. К таким изменениям относятся более выраженные локальные расширения перинуклеарного пространства и конденсация хроматина, просветление митохондриального матрикса и нарушение целостности мембранных элементов эндоплазматической сети, преобладание вакуолярных элементов внутреннего сетчатого аппарата.

Известно [6], что ДМСО проникает внутрь клетки в результате пассивной диффузии. Компенсируясь с внутриклеточными компонентами, ДМСО влияет на химический состав как внеклеточной, так и внутриклеточной среды. Эти изменения могут отражаться на нормальном течении метаболизма клеток и их морфологии. Согласно данным [4, 6], в основе реакции клеток на присутствие ДМСО лежит его дегидратирующее действие, вызывающее изменение осмотического окружения клеток и приводящее к их частичному обезвоживанию. Вследствие этого многие из указанных ультраструктурных перестроек можно трактовать как результат дегидратации клетки, вызванной присутствием криопротектора, и нарушения ряда функций ее транспортных систем.

В то же время можно предположить, что при действии криопротектора могут активизироваться компенсаторно-приспособительные механизмы, направленные на сохранение гомеостаза клеток к повреждающему фактору.

cytoplasm. Mitochondria with enlightened matrix are seen from time to time. Granular endoplasmic reticulum is represented by the system of communicating channels, vacuoles and cisterns, to which surface the ribosomes are attached. On endotheliocyte surface the microvilli and outgrowings are seen. A part of cells has the protrusion of perinuclear area into the lumen of vessels (Fig. 4).

Conclusions

Thus, the performed investigation permits to conclude, that after incubation of placenta fragments with 8% DMSO the most manifested ultrastructural changes in syncytiotrophoblast, surface layer of chorion villi, are revealed. Along with this the changes of cytotrophoblast structure, basal membrane, reactive state of vessel endothelial are found out.

Electron-microscopic method reveals certain stereotypical changes of non-specific character in the structure of intracellular organellas. More manifested local widenings of perinuclear space and chromatin condensation, enlightening of mitochondrial matrix and the integrity impairment of the endoplasmic reticulum membrane elements, predomination of vacuolar elements of internal reticular apparatus are related to such changes.

It is known [7], that DMSO penetrates into the cells as a result of passive diffusion. When integrating with intracellular elements, DMSO affects the chemical composition of both extracellular and intracellular media. These changes can affect the normal course of cells metabolism and their morphology. According to the data [4, 7], the base of cell reaction on DMSO presence is its dehydrating effect, causing the change in cell osmotic environment and resulting in their partial dehydration. Due to this fact many of mentioned ultrastructural rearrangements can be interpreted as a result of cell dehydration, caused by cryoprotectant presence and the disorder of some functions of its transport systems.

At the same time we can suppose, that the compensatory and adaptive mechanisms, oriented to the preservation of cell homeostasis to a damaging factor can be activated during the effect of cryoprotectant.

References

1. *Govorukha T.P., Skornyakov B.A., Petrenko A.Yu.* Ultrastructural characteristics of thyroid gland after equilibration with DMSO // *Kriobiologiya i kriomeditsina.* – 1984. – Issue 14. – P. 74-77.
2. *Kapelyants O.S., Marchenko L.M., Migunova R.K.* Structural aspects of rat liver hepatocytes response to various freezing conditions and DMSO // *Problems of cryobiology.* – 2002. – N2. – P. 9-19.
3. *Lobyntseva G.S., Votyakova I.A.* Peculiarities of granulocytic and macrophagal growth of hemopoietic cells of human

Литература

1. Говоруха Т.П., Скорняков Б.А., Петренко А.Ю. Ультраструктурная характеристика щитовидной железы после эквilibрации с ДМСО // Криобиология и криомедицина.– 1984.– Вып. 14.– С. 74-77.
2. Капрельянец О.С., Марченко Л.М., Мігунова Р.К. Структурні аспекти реакції гепатоцитів печінки щурів на різні умови заморожування та ДМСО // Пробл. криобиології.– 2002.– № 2.– С. 9-19.
3. Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. Особенности гранулоцитарно-макрофагального роста гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека после контакта с криопротекторами // Всесоюз. конф. по теор. и прикл. вопр. криобиологии // Тезисы докл.– Харьков.– 1984.– Т. 1.– С. 167.
4. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М. Криопротекторы. – Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
5. Чуйко В.А. Механизмы криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Криобиология.– 1989.– № 1.– С. 3-10.
6. Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А. и др. Влияние криопротекторов на биологические системы.– Киев: Наук. думка, 1989.– 240 с.
7. А.с. 1169578 (51) 4 СССР, А 01 N 1/02. Способ консервации амниотической оболочки, где в качестве среды используют смесь димексида и спермацета при 30-35°C / О.Ф. Безруков, С.Л. Шулькин. Заявлено 09.01.84; Опубл. 30.07. 85.– Бюл. №28.– С. 9.
8. Пат. України № 7862 А01N1/02. Спосіб консервування щитовидної залози/ М.С. Пушкар, А.М. Утевський, В.А. Чуйко.– Заявлено 10.11.78.– Публ. 26.12.95.– Бюл. №4.– С. 3.1.16.
9. Пат. України №2010 А61K47/00. Спосіб консервування гепатоцитів/ О.А. Петренко, В.П. Гришук, А.Д. Росляков, С.П. Мазур (Україна).– Заявлено 22.02.93; Публ. 20.12.94, Бюл. № 4.– С. 3-11.
10. Пат. України №13687 А01N1/02. Спосіб консервування гемо-поетичних клітин ембріональної печінки людини / Г.С. Лобынцева, В.І. Грищенко, І.А. Вотякова, Є.І. Олійник, А.А. Заволока.– Заявлено 22.11.89; Публ. 25.04.97, Бюл. №2.– С. 16.
11. Пат. України №30808А А01N1/02. Спосіб консервування тканин фетоплацентарного комплексу / В.І. Грищенко, Т.М. Юрченко, О.С. Прокопюк, В.І. Строна, В.П. Козлова, В.Ю. Прокопюк.– Заявлено 05.06.98; Публ. 15.12.2000, Бюл. № 7-11.– С.1.10.
12. Ashwood-Smith M.J. Low temperature preservation of mouse lymphocytes with DMSO // Blood.– 1964.– Vol.23, N3.– P. 494-499.
13. Barner H.B. The vascular lesion of freezing as modified by dimethylsulphoxide // Cryobiology.– 1965.– Vol.2, N1.– P. 55-57.
14. Marin H., Bournique B., Sarsat J.P. Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity and drug-metabolizing enzymes // Cryobiology.– 2000.– Vol.41, N2.– P. 135-144.
- embryonic liver after contact with cryoprotectants // All-Union conference on theor. and appl. quest. of cryobiology // Abstr. of report.– Kharkov.– 1984.– V.1.– P. 167.
4. Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M. Cryoprotectants.– Kiev: Naukova Dumka, 1978.– 204 p.
5. Chujko V.A. Mechanisms of cryoprotective efficiency and pharmacological properties of DMSO// Kriobiologiya.– 1989.– N1.– P. 3-10.
6. Yurchenko T.N., Kozlova V.F., Skorniyakov B.A. et al. Effect of cryoprotectants on biological systems.– Kiev: Naukova Dumka, 1989.– 240 p.
7. Author's Certificate 1169578 (51) 4 USSR, A01N1/02. Way for cryopreservation of amniotic membrane where the mixture of dimexide and spermaceti is used as a medium at 30-35°C / Bezrukov O.F., Shulkin S.L.– Filed 09.01.84; Publ. 30.07.85. Bull. N28.– P. 9.
8. Patent of Ukraine N7862 A01N1/02. Way for thyroid gland cryopreservation/ Pushkar M.S., Utevskiy A.M., Chujko V.A.– Filed 10.11.78.– Publ. 26.12.95.– Bull. N4, P.3.1.16.
9. Patent of Ukraine N 2010 A61K47/00. Way for hepatocyte preservation/ Petrenko O.A., Grischuk V.P., Roslyakov A.D., Mazur S.P.– Filed 22.02.93; Publ. 20.12.94, Bull. N4.– P. 3-11.
10. Patent of Ukraine N13687 A01N1/02.. Way for preservation of hemopoietic cells of human embryonic liver/ Lobytseva G.S., Grischenko V.I., Votyakova I.A., Olejnik E.I., Zavaloka A.A.– Filed 22.11.89; Publ. 25.04.97, Bull N2.– P. 16.
11. Patent of Ukraine N30808A A01N1/02. Way for preserving the tissue of fetoplacental complex / Grischenko V.I., Yurchenko T.N., Prokopyuk O.S., Strona V.I., Kozlova V.P., Prokopyuk V.Yu.– Filed 25.06.98; Publ. 15.12.2000, Bull. N7-11.– P. 1.10.
12. Ashwood-Smith M.J. Low temperature preservation of mouse lymphocytes with DMSO // Blood.– 1964.– Vol.23, N3.– P. 494-499.
13. Barner H.B. The vascular lesion of freezing as modified by dimethylsulphoxide // Cryobiology.– 1965.– Vol.2, N1.– P. 55-57.
14. Marin H., Bournique B., Sarsat J.P. Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity and drug-metabolizing enzymes // Cryobiology.– 2000.– Vol.41, N2.– P. 135-144.

Accepted in 19.11.2002

Поступила 19.11.2002