

Исследование насыщения ткани плаценты глицерином и 1,2-пропандиолом

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Investigation of Placenta Tissue Saturation with Glycerol and 1,2-Propane Diol

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

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии и ядерного магнитного резонанса проведено исследование насыщения образцов плаценты глицерином и 1,2-пропандиолом (1,2-ПД). Образцы плаценты выдерживали в 10, 40, 60 масс % растворах глицерина и 1,2-ПД в течение 20, 60 мин и 24-х часов. Показано, что в ткани плаценты образуются растворы 1,2-ПД более высоких концентраций для всех насыщающих растворов, содержащих 1,2-ПД по сравнению с аналогичными растворами, содержащими глицерин. В плаценте за одно и то же время эквilibрации в среде с 1,2-ПД образуется большее количество стеклообразной фазы.

Ключевые слова: дифференциальная сканирующая калориметрия, фазовые переходы, стеклование, плацента.

Методами диференціальної скануючої калориметрії і ядерного магнітного резонансу проведено дослідження насичення зразків плаценти гліцерином і 1,2-пропандіолом (1,2-ПД). Зразки плаценти витримували в 10, 40, 60 мас % розчинах гліцерину і 1,2-ПД на протязі 20, 60 хв і 24-х годин. Показано, що в тканині плаценти утворюються розчини 1,2-ПД більш високих концентрацій для всіх насичуючих розчинів, що містять 1,2-ПД порівняно з аналогічними розчинами з гліцерином. У плаценті за один і той же час еквilibрації в середовищі з 1,2-ПД утворюється більша кількість склоподібної фази.

Ключові слова: диференціальна скануюча калориметрія, фазові переходи, склування, плацента.

Using differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance methods we investigated placenta samples' saturation with glycerol and 1,2-propane diol (1,2-PD). Placenta samples were exposed in 10, 40, 60% (w/w) glycerol and 1,2-PD solutions for 20, 60 min and 24 hrs. It was shown that in placenta tissue there was the formation of 1,2-PD solutions of higher concentrations for all saturating solutions with 1,2-PD in comparison with those with glycerol. A big amount of vitreous phase is formed in placenta for the same equilibration time in 1,2-PD-contained medium.

Key-words: differential scanning calorimetry, phase transition, vitrification, placenta.

Особенностью подготовки ткани к низкотемпературной консервации является то, что из-за медленного проникновения криозащитного вещества в ткань требуется время для эквilibрации ее в криозащитном растворе для достижения необходимой концентрации криопротектора (КП) в ткани. Время эквilibрации зависит от вида КП и температуры и сильно отличается для разных тканей. Степень насыщения ткани КП и однородность его распределения определяют устойчивость ткани от разрушения, особенно механического, при криоконсервировании. Во многих случаях фактор механических разрушений оказывается сильнее, чем другие факторы. Например, при замораживании артерий отмечалось их растрескивание [3]. Сильные механические повреждения, видимые визуально, наблюдались при замораживании почки [4], поэтому кинетика насыщения ткани КП должна учитываться при подготовке ткани к консервированию. Принимая в расчет сильную зависимость процесса насыщения ткани КП от вида ткани, вида КП и температуры, процесс

The peculiarity of tissue preparing to low temperature preservation is the need of a certain time for its equilibration in cryoprotective solution to achieve the necessary cryoprotectant (CP) concentration because of a slow penetration of cryoprotective substance into the tissue. Equilibration time depends on CP type and temperature and significantly varies for different tissues. A degree of tissue saturation with CP and the homogeneity of its distribution determine the tissue resistance against destruction, especially mechanical one during cryopreservation. In many cases the factor of mechanical destructions occurs to be stronger than others. For examples, the arteries fracturing was observed during their freezing [3]. Huge mechanical impairments were visually observed during kidney freezing [4], therefore the kinetics of tissue saturation with CP should be taken into account when tissue is prepared to preservation. Taking into consideration a strong dependency of tissue saturation process with CP on type of tissue, cryoprotectant and temperature, the saturation process in each specific case is experimentally determined. The method of

Адрес для корреспонденции: Зинченко А.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

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.: +38 (057) 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

насыщения в каждом конкретном случае определяют экспериментально. Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) являются двумя взаимодополняющими методами, которые применяются в криобиологии для исследования насыщения тканей КП, количественного определения концентраций и времен, позволяющих описать процесс проникновения КП в ткань.

Использовали возможности метода ЯМР для численного определения концентрации проникающего в ткань КП и метода ДСК для определения температур стеклования, величин скачка теплопоглощения при стекловании, а также температур фазовых переходов.

Цель работы – исследование динамики проникновения в ткань криопротекторов в зависимости от времени и состояния криозащитного вещества в ткани.

Материалы и методы

Перед консервированием плаценту отмывали 0,9%-м раствором хлорида натрия от слизи и крови, отделяли пуповинный канатик и амниотическую оболочку, скальпелем срезали фрагменты ткани с материнской стороны в области долек размером 2×2 см и массой 1 г.

Образцы плаценты помещали в среды эквипирации, представляющие собой растворы 1,2-ПД и глицерина, приготовленные на физиологическом растворе. Концентрации КП: 10, 40 и 60%. Время эквипирации образцов плаценты в указанных растворах составляло 20, 60 мин и 24 ч, температура эквипирации 4°C.

Концентрации КП в образцах определяли методом ¹H ЯМР на спектрометре Tesla BS 567A [2].

В работе использовали дифференциальный сканирующий калориметр [1], принцип работы которого основан на регистрации тепловых потоков, поступающих в образец в процессе его непрерывного нагрева. В отличие от обычного дифференциального термического анализа, интегральный тепловой поток регистрируется одновременно во всех точках образца. Особенность разработанного прибора в том, что его рабочую камеру можно предварительно охладить до любой заданной температуры в диапазоне –196±0°C, а затем поместить в нее образец, который был предварительно охлажден с любой необходимой скоростью. Это позволяет исследовать образцы, охлажденные с высокими скоростями (15–16,6(6)°C×с⁻¹). Для охлаждения калориметрические ячейки погружали в жидкий азот. Средняя скорость охлаждения образцов составляла 3,3(3)°C×с⁻¹, термограммы регистрировали при нагреве образцов со скоростью

differential scanning calorimetry (DSC) and that of nuclear magnetic resonance (NMR) are two complementary methods, applied in cryobiology for studying the tissue saturation with CP, a quantitative determination of concentrations and times, enabling to describe the CP penetration into a tissue.

There were used the possibilities of NMR method to quantitatively determine the concentration of CP penetrating into tissue and those of DSC for finding vitrification temperatures, values of heat absorption jump at vitrification and phase transition temperatures as well.

The work was aimed to research the dynamics of cryoprotectant penetration into a tissue depending on time and state of cryoprotective substance in it.

Materials and methods

Before cryopreservation placenta was washed-out of mucus and blood with 0.9% sodium chloride solution, umbilical cord and amniotic membrane were separated, 2×2 cm and 1g tissue fragments were cut with scalpel from mother's side in lobule area.

Placenta samples were placed into equilibration media, representing 1,2-PD and glycerol solutions, prepared with physiological solutions. CP concentrations were 10, 40 and 60%. Equilibration time of placenta samples in the mentioned solutions made 20, 60 min and 24 hrs, equilibration temperature was 4°C.

CP concentrations in samples were determined using ¹H NMR method with Tesla BS 567A spectrometer [2].

In the work we used differential scanning calorimeter [1], which operating principle is based on recording heat fluxes, coming into a sample during its continuous heating. In contrast to usual differential thermal analysis, an integral heat flux is recorded simultaneously in all points of sample. The peculiarity of the designed device consists in the fact that its working chamber can be pre-cooled down to any fixed temperature within the range of –196±0°C, then the preliminarily cooled sample with any necessary rate can be placed in it. This enables to investigate the samples cooled down with high rates (15–16.6(6)°C×sec⁻¹). For cooling down we immersed calorimeter wells with samples into liquid nitrogen. An average rate for samples' cooling made 3.3(3)°C×sec⁻¹, the thermograms were recorded under samples' heating with 8.3(3)×10⁻³°C×sec⁻¹ rate. An absolute error in determining temperatures for vitrification phase transitions made ±0.5°C.

Results and discussion

Fig. 1 shows thermograms, recorded during placenta heating, exposed in equilibration medium with 60 mass% 1,2-PD initial concentration depending on equilibration time, and in Fig. 2 there are thermograms of placenta, exposed in glycerol-contained medium under the similar conditions.

$8.3(3) \times 10^{-3} \text{°C} \times \text{с}^{-1}$. Абсолютная погрешность определения температуры фазовых переходов стеклования составляла $\pm 0,5 \text{°C}$.

Результаты и обсуждение

На рис.1 приведены термограммы, снятые при нагреве плаценты, выдержанной в среде эквilibрации с исходной концентрацией 1,2-ПД 60 масс % в зависимости от времени эквilibрации, а на рис. 2 – термограммы плаценты, выдержанной в среде с глицерином при аналогичных условиях.

Стрелками показаны характерные скачки теплопоглощения, эндо- и экзотермические эффекты, которые классифицированы в соответствии с формой кривой и диапазоном температур следующим образом [3]: *скачок теплопоглощения 1* (t_g) – процесс перехода вещества из твердо-аморфного (стеклообразного) состояния в состояние переохлажденной жидкости; *экзотермический пик 2* (t_{c1}) – кристаллизация льда из переохлажденной жидкости; *размытый экзотермический пик 3* (t_{c2}) – завершение кристаллизации льда при нагреве; *эндотермический пик 4* (t_m) – плавление закристаллизованной смеси, температура пика зависит от концентрации проникшего в плаценту КП.

Проведенный анализ термограмм показал, что в плаценте, выдержанной в 10%-м растворе глицерина и 1,2-ПД, отмечается только скачок теплопоглощения в температурном диапазоне стеклования, а в 40%-м растворе, наблюдается размытый экзотермический пик 3, соответ-

With arrows we showed characteristic heat absorption jumps, endo- and exothermal effects, classified by the curve shape and temperature range as follows [3]: *heat absorption jump 1* (t_g) is the process of substance transition from solid-amorphous (vitrified) state into that of overcooled liquid; *exothermic peak 2* (t_{c1}) is ice crystallisation from an overcooled liquid; *vague exothermic peak 3* (t_{c2}) is ice crystallisation completing during heating; *endothermic peak 4* (t_m) is the crystallised mixture melting, the temperature of which depends on concentration of penetrating into placenta CP.

The performed analysis of thermograms demonstrated, that in placenta, exposed to 10% glycerol and 1,2-PD solutions the only heat absorption jump within a temperature range of vitrification was noted, but a vague exothermic peak 3, corresponding to crystallisation process completing under heating after 20, 60 min and 24 hrs exposure, was observed in that, exposed to 40% solution.

In thermograms of placenta, exposed to 60% 1,2-PD (Fig. 1) and glycerol solutions (Fig. 2), along with the mentioned above peculiarities, an intensive exothermic peak 2, corresponding to crystallisation process from amorphous state (devitrification) is recorded. Tables 1 and 2 show the temperature values of phase transitions and vitrification in placenta tissues after equilibration in 1,2-PD and glycerol solutions of the mentioned above concentrations. It is seen that in placenta tissues the CP concentration in both glycerol and 1,2-PD solutions occurs, that is indicated by a decrease in melting temperature with the equilibration time augmentation. However in placenta tissue the

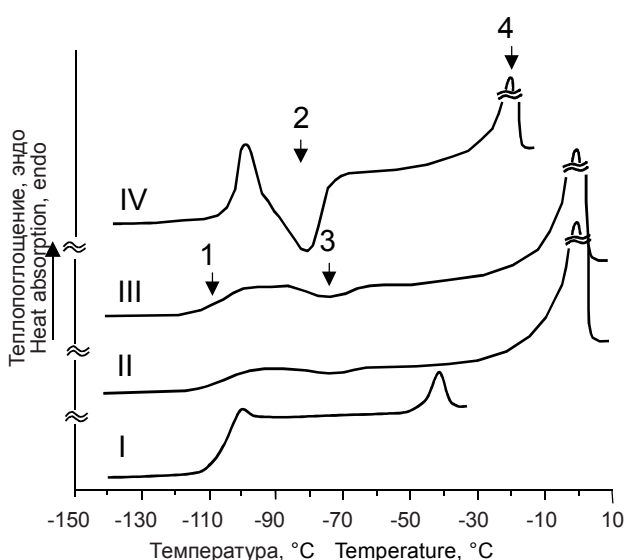


Рис. 1. Термограммы 60%-го раствора 1,2-ПД на физиологическом растворе (I); образцов плаценты после экспозиции в 60%-м растворе 1,2-ПД 20 мин (II); 1 ч (III); 24 ч (IV).

Fig. 1. Thermograms of 60% 1,2-PD solution with physiological solution (I); placenta samples after exposure to 60% 1,2-PD solution during 20 min (II); 1 hr (III); and 24 hrs (IV).

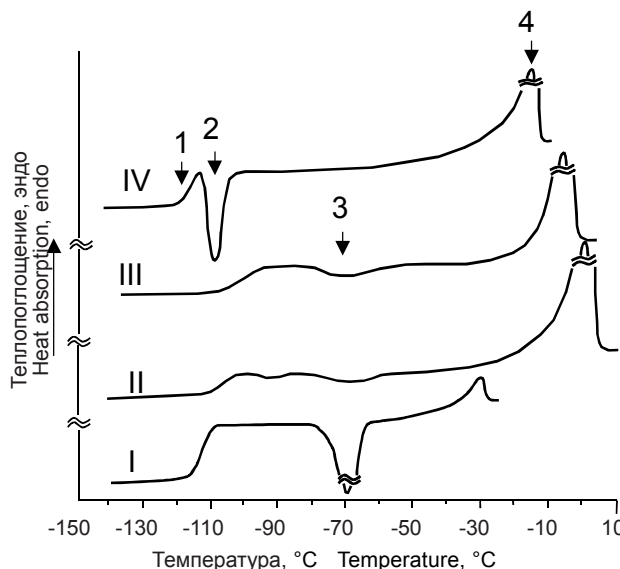


Рис. 2. Термограммы 60%-го раствора глицерина на физиологическом растворе (I); образцов плаценты после экспозиции в 60%-м растворе 1,2-ПД 20 мин (II); 1 ч (III); 24 ч (IV).

Fig. 2. Thermograms of 60% glycerol solution with physiological solution (I); placenta samples after exposure to 60% 1,2-PD solution during 20 min (II); 1 hr (III); and 24 hrs (IV).

ствующий завершению процесса кристаллизации при нагреве после экспозиции в течение 20, 60 мин и 24 ч.

На термограммах плаценты, выдержанной в 60%-м растворе 1,2-ПД (рис. 1) и глицерина (рис. 2), наряду с указанными выше особенностями регистрируется интенсивный экзотермический пик 2, соответствующий процессу кристаллизации из аморфного состояния (девитрификации). В табл. 1 и 2 приведены значения температур фазовых переходов и стеклования в тканях плаценты после эквilibрации в растворах 1,2-ПД и глицерина указанных выше концентраций. Видно, что в тканях плаценты происходит концентрация КП в растворах как глицерина, так и в 1,2-ПД, на что указывает снижение температуры плавления с увеличением времени эквilibрации. Однако в ткани плаценты образуются растворы 1,2-ПД более высоких концентраций, о чем свидетельствуют более низкие температуры плавления для всех насыщающих растворов с 1,2-ПД по сравнению с аналогичными растворами, содержащими глицерин.

На рис. 3 и 4 показаны значения скачка теплопоглощения ΔC_p в зависимости от времени и концентрации. Повышение как концентрации КП в смеси, так и времени экспозиции образцов плаценты приводит к увеличению скачка тепло-

Таблица 2. Температура фазовых переходов и стеклования в образцах плаценты после эквilibрации в растворах глицерина
Table 2. Temperature of phase transitions and vitrification in placenta samples after equilibration in glycerol solutions

Концентрация КП, масс % CP concentration, % (w/w)	Время Time	Температура, °C Temperature, °C			
		t_g	t_{c1}	t_{c2}	t_m
Ткань без криопротектора Tissue without cryoprotectant					
10	20 мин/min	—	—	—	-2,5
	1 ч/hr	-99,0	—	—	-10,0
	24 ч/hrs	-99,0	—	—	-11,0
40	20 мин/min	-100,0	—	-72,3	-13,0
	1 ч/hr	-102,5	—	-74,6	-15,7
	24 ч/hrs	-102,6	—	-77,0	-17,0
60	20 мин/min	-102,4	—	-71,5	-27,8
	1 ч/hr	-101,4	—	-72,8	-28,1
	24 ч/hrs	-117,0	-113,1	—	-33,3

Таблица 1. Температура фазовых переходов и стеклования в образцах плаценты после эквilibрации в растворах 1,2-ПД

Table 1. Temperature of phase transitions and vitrification in placenta samples after equilibration in 1,2-PD solutions

Концентрация КП, масс % CP concentration, % (w/w)	Время Time	Температура, °C Temperature, °C			
		t_g	t_{c1}	t_{c2}	t_m
Ткань без криопротектора Tissue without cryoprotectant					
10	20 мин/min	—	—	—	-2,3
	1 ч/hr	-103,0	—	—	-3,5
	24 ч/hrs	-103,0	—	—	-4,0
40	20 мин/min	-103,5	—	-76,0	-16,3
	1 ч/hr	-102,2	—	-76,9	-20,0
	24 ч/hrs	-105,0	—	-77,5	-31,0
60	20 мин/min	-104,5	—	-74,0	-21,0
	1 ч/hr	-103,4	—	-73,5	-29,1
	24 ч/hrs	-103,0	-95,5	—	-47,5

1,2-PD solutions of higher concentrations are formed, that is testified by lower melting temperatures for all saturating solutions with 1,2-PD in comparison with those glycerol-containing.

Fig. 3 and 4 show the values of heat absorption jump ΔC_p depending on time and concentration. An increase in both CP concentration in mixture and exposure time of placenta samples result in the augmentation of heat absorption jump. This fact indicates to the strengthening of glycerol and 1,2-PD concentration in placenta and, correspondingly, to an increase in the amount of vitrifying mass. However, a certain difference in penetration character of glycerol and 1,2-PD molecules into placenta tissue from time is observed, that is seen by the values of heat absorption jump, ΔC_p (Fig. 3 and 4). Thus, for placenta, exposed to 60% 1,2-PD-contained solutions for 20 min, the amount of vitrified material during cooling was nearly the same value for placenta, being 24 hrs in glycerol solution of the same concentration. The amount of a vitrified phase during placenta freezing, exposed to 60% 1,2-PD solution for 24 hrs nearly 2.5 times exceeds the same value for placenta, exposed in 1,2-PD solution for 20 min and in 60% glycerol solution for 24 hrs.

Thus, the amount of a vitrified phase, formed during placenta freezing after equilibration is much higher in 1,2-PD solutions than in glycerol ones.

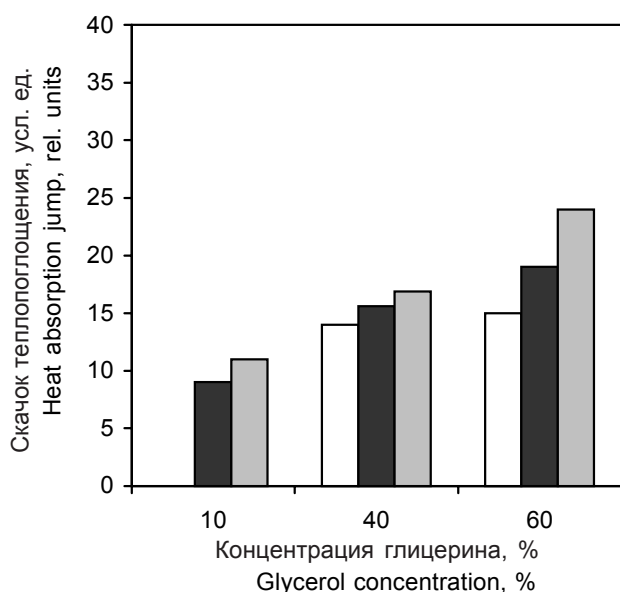


Рис. 3. Скачок теплопоглощения ΔC_p при стекловании в образцах плаценты (по данным ДСК) после экспозиции в растворах глицерина: □ – 20 мин; ■ – 1 ч; ▒ – 24 ч.

Fig. 3. Heat absorption jump ΔC_p during vitrification in placenta samples (by the DSC data) after exposure in glycerol solutions: □ – 20 min; ■ – 1 hr; ▒ – 24 hrs.

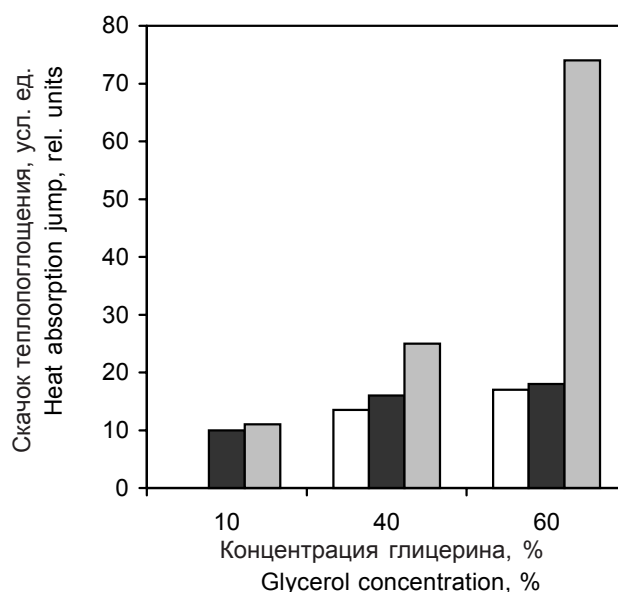


Рис. 4. Скачок теплопоглощения ΔC_p при стекловании в образцах плаценты (по данным ДСК) после экспозиции в растворах 1,2-ПД: □ – 20 мин; ■ – 1 ч; ▒ – 24 ч.

Fig. 4. Heat absorption jump ΔC_p during vitrification in placenta samples (by the DSC data) after exposure in 1,2-PD solutions: □ – 20 min; ■ – 1 hr; ▒ – 24 hrs.

поглощения. Этот факт указывает на рост концентрации глицерина и 1,2-ПД в плаценте и соответственно на увеличение количества стеклующейся массы. Однако наблюдается некоторое отличие в характере проникновения в ткань плаценты молекул глицерина и 1,2-ПД от времени, что видно по значениям скачка теплопоглощения ΔC_p (рис. 3 и 4). Так, для плаценты, выдержанной в растворах, содержащих 60% 1,2-ПД в течение 20 мин, количество застеклованного материала при охлаждении приблизительно соответствовало такому же значению для плаценты, находившейся 24 ч в растворе глицерина той же концентрации. Количество стеклообразной фазы при замораживании плаценты, выдержанной в 60%-м растворе 1,2-ПД в течение 24-х часов, приблизительно в 2,5 раза превышает это же значение для плаценты, выдержанной в растворе 1,2-ПД 20 мин и в 60%-м растворе глицерина в течение 24-х часов.

Таким образом, количество стеклообразной фазы, образующейся при замораживании плаценты после эквilibрации в растворах 1,2-ПД, значительно больше, чем в растворах глицерина.

Методом $^1\text{H-NMR}$ спектроскопии определяли концентрации КП в образцах плаценты после эквilibрации их в указанных смесях. В табл. 3 и 4 приведены значения исходной концентрации КП в средах эквilibрации и конечной – в плаценте после экспозиции их в течение 20 мин и 24-х часов в 10-, 40- и 60%-х растворах 1,2-ПД и глицерина соответственно. Как видно из приведенных результатов, в течение 20 мин экспозиции

Using the $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy method we determined CP concentrations in placenta samples after their equilibration in the mentioned mixtures. Tables 3 and 4 show the values of initial CP concentration in equilibration media and the final one in placenta after exposing them for 20 min and 24 hrs in 10, 40 and 60% 1,2-PD and glycerol solutions, correspondingly. The results demonstrate that during 20 min exposure a considerable saturation of placenta tissue with 1,2-PD occurs and its concentration in 24 hrs practically achieves the value of initial solution concentration. The equilibration of placenta samples in 60% 1,2-PD solution for 1 day results in a gradual placenta tissue saturation with CP up to 37% (w/w). During equilibration in 10% glycerol solution placenta tissue saturation occurs more slowly. In 20 min glycerol concentration makes just 2% of saturating solution initial concentration, but it is 3% after 24 hrs. In 40 and 60% glycerol solutions the tissue saturation reaches higher values for the same time period, but lower than during equilibration in 1,2-PD solutions (Tables 3, 4).

Conclusions

Combined researches using DSC and NMR methods of placenta samples' capability to be CP saturated demonstrated, that in placenta tissue there were formed the 1,2-PD solutions of higher concentrations for all 1,2-PD-contained saturating solutions, in comparison with those glycerol-containing. In placenta for the same equilibration time a big amount of vitrified phase is formed in 1,2-PD-containing medium, that is explained by a higher 1,2-PD vitrifying capability in comparison with glycerol.

происходит значительное насыщение ткани плаценты 1,2-ПД и концентрация его через сутки практически достигает значения концентрации исходного раствора. Эквilibрирование образцов плаценты в 60%-м растворе 1,2-ПД в течение суток приводит к постепенному насыщению ткани плаценты КП до 37 масс %. При эквilibрации в 10%-м растворе глицерина насыщение ткани плаценты происходит более медленно. Через 20 мин концентрация глицерина составляет всего 2% от исходной концентрации насыщающего раствора, а через 24 ч – 3%. В 40- и 60%-х растворах глицерина за это же время насыщение ткани достигает более высоких значений, однако они меньше, чем при эквilibрации в растворах 1,2-ПД (табл. 3, 4)

Выводы

Комплексные исследования методами ДСК и ЯМР способности образцов плаценты насыщаться КП показали, что в ткани плаценты образуются растворы 1,2-ПД более высоких концентраций для всех насыщающих растворов, содержащих 1,2-ПД, по сравнению с аналогичными растворами, содержащими глицерин. В плаценте за одно и то же время эквilibрации в среде с 1,2-ПД образуется большее количество стеклообразной фазы, что объясняется более высокой стеклообразующей способностью 1,2-ПД по сравнению с глицерином.

Литература

1. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур $-196\pm 0^\circ\text{C}$: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат.наук.– Харьков, 1983.– 22 с.
2. А. с. № 1642342 МКИ 0124/08,33/483. Способ оценки проникновения веществ в клеточные суспензии / В.Д. Зинченко, М.И. Щетинский, В.И. Мусатов, В.А. Моисеев. Заявлено 08.01.88. Опубл. 15.04.91. Бюл.№14.– С. 171.
3. Pegg D.E., Wusteman M.C., Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries // Cryobiology.– 1999.– Vol. 4.– P. 183-192.
4. Rubinsky B., Cravalho E.G., Mikis B. Thermal stress in frozen organs // Cryobiology.– 1980.– Vol. 17.– P. 66-73.

Поступила 06.12.2004

Таблица 3. Значения концентраций, полученные методом ЯМР в образцах плаценты после эквilibрации в растворах 1,2-ПД.

Table 3. Values of concentrations obtained using NMR method in placenta samples after equilibration in 1,2-PD solutions

Время эквilibрации Exposure time	Концентрация КП,% CP concentration,%	
	в среде in medium	в ткани in tissue
20 мин/min	10±0,2	9±0,5
24 ч/hrs	10±0,2	10±0,5
20 мин/min	40±0,5	15±0,7
24 ч/hrs	40±0,5	19±0,7
20 мин/min	60±0,7	29±1
24 ч/hrs	60±0,7	37±1

Таблица 4. Значения концентраций, полученные методом ЯМР в образцах плаценты после эквilibрации в растворах глицерина

Table 4. Values of concentrations obtained using NMR method in placenta samples after equilibration in glycerol solutions

Время эквilibрации Exposure time	Концентрация КП,% CP concentration,%	
	в среде in medium	в ткани in tissue
20 мин/min	10±0,3	2±0,5
24 ч/hrs	10±0,3	3±0,5
20 мин/min	40±0,7	14±1
24 ч/hrs	40±0,7	15±1
20 мин/min	60±1	19±1,3
24 ч/hrs	60±1	32±1,3

References

1. Zinchenko A.V. Study of phase transitions and physical states of aqueous solutions of polyatomic alcohols within temperature range of $-196\pm 0^\circ\text{C}$: Author's abstract of thesis for candidate's degree obtaining (physics and mathematics).- Kharkov, 1983.– 22 p.
2. Author's Certificate N 1642342 ICI 601 N 24/08. Way for estimating substances penetrations into cell suspensions / V.D. Zinchenko, M.I. Schetinsky, V.I. Musatov, V.A. Moiseyev Applied 08.01.88. Published 15.04.91. Bull N14.- P.171.
3. Pegg D.E., Wusteman M.C., Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries // Cryobiology.– 1999.– Vol. 4.– P. 183-192.
4. Rubinsky B., Cravalho E.G., Mikis B. Thermal stress in frozen organs // Cryobiology.– 1980.– Vol. 17.– P. 66-73.

Accepted in 06.12.2004