

**Влияние низкотемпературного консервирования
без криопротектора и под защитой Me₂SO на активность
окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты**

Т.Н. ЮРЧЕНКО, А.П. БЕЛОНОЖКО, Е.П. ЖУЛИКОВА, Т.М. ШАРЛАЙ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Effect of Low Temperature Preservation Without Cryoprotectant
and Under Me₂SO protection on the Activity of Reductive-Oxidative
Enzymes in Placenta Tissue**

YURCHENKO T.N., BELONOZHKO A.P., ZHULIKOVA E.P., SHARLAJ T.M.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Методами количественной гистохимии и количественного фотометрического анализа проведено исследование изменения активности СДГ, ЛДГ, α-ГФДГ, НАД.Н² и НАДФ.Н² в ткани плаценты после ее низкотемпературного консервирования без криопротектора и после обработки раствором криопротектора Me₂SO.

Ключевые слова: криоконсервирование, плацента, ферменты, криопротектор.

Методами кількісної гістохімії і кількісного фотометричного аналізу проведено дослідження змін активності СДГ, ЛДГ, α-ГФДГ, НАД.Н² і НАДФ.Н² у тканині плаценти після її низькотемпературного консервування без криопротектора і після обробки розчином криопротектора Me₂SO.

Ключові слова: криоконсервування, плацента, ферменти, криопротектор.

Using the methods of quantitative histochemistry and quantitative photometric analysis there was carried-out the investigation of change in SDG, LDG, α-GPhDG, NAD.H² and NADP.H² activity in placenta tissue after its low temperature preservation without cryoprotectant and after treatment with Me₂SO cryoprotectant solution.

Key words: cryopreservation, placenta, enzymes, cryoprotectant.

Использование тканей и клеток эмбриофето-плацентарного комплекса в клеточной и тканевой репаративной медицине связано с длительным хранением трансплантационного материала. Метод гипотермического хранения не позволяет в достаточной мере продлить срок от получения материала до его использования в связи с проявлением аутолитического процесса. Только продолжительное хранение материала может обеспечить качественное тестирование донорских клеток и тканей для исключения бактериальной и вирусной контаминации.

Длительное хранение клеток и тканей эмбрио-фетоплацентарного комплекса возможно при использовании метода низкотемпературного консервирования с обеспечением правильности всех этапов заготовки и хранения материала [1, 2].

Цель данного исследования – изучение влияния криоконсервирования фрагментов плаценты без криопротектора и под защитой Me₂SO на активность некоторых окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты как показателей ее биологического качества.

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

The usage of tissues and cells of embryofetoplacental complex in cellular and tissue reparative medicine is related to a long-term storage of transplantational material. The method of hypothermic storage does not allow in a sufficient extent to prolong the term from the material procurement up to its usage due to an autolytic process manifestation. Only prolonged material storage can provide a qualitative testing of donor's cells and tissues for excluding bacterial and viral contamination.

It is possible to store the cells and tissues of embryofetoplacental complex for a long time using the low temperature preservation with meeting the accuracy at all stages of material procurement and storage [1, 2].

The aim of this investigation was to study the cryopreservation effect of placenta fragments without cryoprotectant and under Me₂SO protection on the activity of some reductive-oxidative enzymes in placenta tissue as the indices of its biological quality.

Materials and methods

The investigation was carried-out using the methods of quantitative histochemistry and photometrical analysis [3-5].

Address for correspondence: Yurchenko T.N., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721034, fax: +38 (057) 77200084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua.

Материалы и методы

Исследование проводили методами количественной гистохимии и фотометрического анализа [3-5].

Образцы плаценты были получены в результате доношенной беременности после родов или кесарева сечения. Часть фрагментов плаценты инкубировали с криопротектором Me_2SO при температуре 10°C на протяжении 15-20 мин, после чего все образцы были криоконсервированы по технологии, разработанной в ИПКиК НАН Украины.

Из деконсервированного материала были приготовлены криостатные срезы (толщина $10\ \mu\text{m}$), которые инкубировали с соответствующими субстратами и окрашивали нитросиним тетразолам. В результате окрашивания в препаратах образовывался осадок диформаза, количество которого и являлось критерием оценки активности ферментов. Для контроля за протеканием гистохимической реакции были использованы криостатные срезы печени интактных крыс [4, 5].

Таким образом, были выделены следующие экспериментальные группы: исходная ткань плаценты; ткань плаценты после контакта с раствором криопротектора; исходная ткань плаценты после замораживания-размораживания; ткань плаценты после контакта с криопротектором и замораживания-размораживания. В результате проведенных гистохимических реакций в ткани плаценты всех вышечисленных экспериментальных групп были выявлены следующие ферменты: СДГ, ЛДГ, а-ГФДГ, а также NADH^2 - и NADPH^2 -дегидрогеназы (диафоразы).

Количественный учет содержания диформаза в срезах нативной плаценты после ее криоконсервирования и обработки криопротектором с последующей криоконсервацией проводили методом фотометрического анализа с использованием телевизионного микроскопа-фотометра. Подробно метод фотометрического анализа и статистической обработки его результатов приведен в [4].

Результаты и обсуждение

Ранее нами были проведены исследования по изучению влияния гипотермического хранения [4] и влияния криопротектора Me_2SO [5] на ферментативный комплекс в фрагментах ткани плаценты.

Результаты гистохимического и фотометрического анализа позволяют судить о влиянии низкотемпературного консервирования фрагментов плаценты, замороженной без криопротектора и под защитой Me_2SO , на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты. В таблице приведены значения концентрации диформаза (в условных единицах) в образцах

Placenta samples were procured as a result of full-term pregnancy after labour or Caesarean section. Some placenta fragments were incubated with Me_2SO under 10°C for 15-20 min, afterwards all samples were cryopreserved according to the technology, developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. The cryostat sections ($10\ \mu\text{m}$ width) were prepared from a frozen-thawed material, incubated with corresponding extracts and stained with nitroblue tetrasolium. As a result of staining the diformazan sediment was formed in the preparations, which number was taken as the criterion for the enzyme activity estimation. The intact rat's liver cryostat sections were used to control the histochemical reaction proceeding [4, 5].

Thus, the following experimental groups were fixed: the initial placenta tissue; placenta tissue after contact with a cryoprotectant solution; the initial placenta tissue after freeze-thawing; placenta tissue after contact with a cryoprotectant and freeze-thawing. As a result of the performed histochemical reactions in placenta tissue in all mentioned above experimental groups the following enzymes were revealed: SDG, LDG, α -GPhDG, as well as NADH^2 and NADPH^2 -dehydrogenase (diaphorase). A quantitative calculation of diformazan content in native placenta sections after its cryopreservation and cryoprotectant treatment with following cryopreservation was carried-out using the method of photometrical analysis with a TV microscope-photometer. The method of photometrical analysis and statistical processing of its results is shown in details in the paper [4].

Results and discussion

Previously we have carried-out the investigations on studying the hypothermic storage [4] and Me_2SO [5] cryoprotectant effects on the enzyme complex in placenta tissue fragments.

The results of histochemical and photometrical analysis allow to judge about the effect of low temperature preservation of placenta fragments, frozen without cryoprotectant and under Me_2SO protection, on the activity of reductive-oxidative enzymes in placenta tissue. The table shows the values of diformazan concentration (in relative units) in the samples of native placenta, treated with Me_2SO cryoprotectant, as well as in the same samples after their cryopreservation for all mentioned above enzymes.

The heterogeneity of the experimental material or individual characteristics of all studied samples cause a considerable effect on diformazan content in the preparations of experimental groups' samples for all studied enzymes. Using the method of one-factor dispersive analysis it was established that for all

нативной плаценты, обработанной криопротектором Me_2SO , а также в этих же образцах после их криоконсервирования для всех перечисленных выше ферментов.

Существенное влияние на содержание диформазана в препаратах образцов экспериментальных групп для всех исследуемых ферментов оказывает неоднородность экспериментального материала или индивидуальные характеристики исследуемых образцов. Методом однофакторного дисперсионного анализа установлено, что для всех экспериментальных групп изменения активности СДГ в 11 – 33, ЛДГ – 11-72, α -ГФДГ – 14-38, НАД – 22-72 и НАДФ – 7- 39% случаев зависит от индивидуальных свойств каждой плаценты.

Низкотемпературное консервирование образцов нативной плаценты (замораживание без криопротектора) приводит к изменению содержания диформазана в препаратах, происходит увеличение его количества на выявление СДГ на 19, ЛДГ – на 17, α -ГФДГ – на 21%, НАД – снижение на 17% и НАДФ – не меняется.

Низкотемпературное консервирование образцов плаценты, предварительно обработанных криопротектором, не изменяет содержание диформазана в препаратах по отношению к его содержанию в препаратах образцов после обработки криопротектором (наблюдаемые изменения незначительны и не являются статистически достоверными – $P < 0,95$).

Рассматривая различия в поведении ферментов при низкотемпературном консервировании образцов нативной и обработанной криопротектором плаценты, следует обратиться к результатам исследований [5]

Изменение активности ферментов в ткани плаценты после криоконсервирования без криопротектора и под защитой Me_2SO
Change in enzyme activity in placenta tissue after cryopreservation without cryoprotectant and under Me_2SO protection

Фермент Enzyme	Статистические показатели Statistical indices	Контроль Control		Криоконсервирование Cryopreservation	
		без Me_2SO without Me_2SO	с Me_2SO with Me_2SO	без Me_2SO without Me_2SO	с Me_2SO with Me_2SO
СДГ SDG	$M \pm m$ P	114,5 \pm 3,5 0,999	134,1 \pm 5,5 0,999	136,8 \pm 3,3 0,999	134,0 \pm 4,6 0,999
	Достоверность различий P Statistical significance of differences, P	без Me_2SO without Me_2SO	0,99	0,999	0,999
			с Me_2SO with Me_2SO	–	<0,95
				без Me_2SO without Me_2SO	<0,95
ЛДГ LDG	$M \pm m$ P	125,3 \pm 3,8 0,999	159,9 \pm 5,6 0,999	146,9 \pm 4,2 0,999	144,5 \pm 3,8 0,999
	Достоверность различий P Statistical significance of differences, P	без Me_2SO without Me_2SO	0,999	0,999	0,999
			с Me_2SO with Me_2SO	–	<0,95
				без Me_2SO without Me_2SO	<0,95
α – ГФДГ α -GPhDG	$M \pm m$ P	96,1 \pm 4,7 0,999	143,5 \pm 6,0 0,999	116,7 \pm 3,5 0,999	122,5 \pm 3,9 0,999
	Достоверность различий P Statistical significance of differences, P	без Me_2SO without Me_2SO	0,999	0,999	0,999
			с Me_2SO with Me_2SO	–	<0,95
				без Me_2SO without Me_2SO	<0,95
НАД _N H ²	$M \pm m$ P	158,2 \pm 7,4 0,999	202,5 \pm 6,0 0,999	132,0 \pm 5,2 0,999	190,4 \pm 6,0 0,999
	Достоверность различий P Statistical significance of differences, P	без Me_2SO without Me_2SO	0,999	0,99	0,999
			с Me_2SO with Me_2SO	–	<0,95
				без Me_2SO without Me_2SO	0,999
НАДФ _N H ²	$M \pm m$ P	158,4 \pm 6,3 0,999	153,9 \pm 5,7 0,999	151,9 \pm 5,0 0,999	160,6 \pm 5,7 0,999
	Достоверность различий P Statistical significance of differences, P	без Me_2SO without Me_2SO	<0,95	<0,95	<0,95
			с Me_2SO with Me_2SO	–	<0,95
				без Me_2SO without Me_2SO	<0,95

влияния криопротектора Me_2SO на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты. Было установлено, что экспозиция в растворе криопротектора Me_2SO приводит к существенному увеличению активности всех ферментов (за исключением НАДФ, изменение активности которого статистически не достоверно): СДГ – на 17, ЛДГ – на 28, α -ГФДГ – на 49 и НАД.Н² – на 28%.

Анализ приведенных выше результатов позволил предположить, что Me_2SO , являясь проникающим криопротектором, при вступлении во взаимодействие с субстратом или красителем обеспечивает лучшее проникновение этих веществ в различные тканевые структуры, что облегчает их доступ к активным центрам ферментов и увеличивает количество продукта гистохимической реакции – диформазана.

После того, как проникающий криопротектор Me_2SO обеспечил доступ субстрата и красителя к ферментам и создал оптимальные условия протекания гистохимических реакций, процедура замораживания-размораживания не приводит к существенному изменению кинетики гистохимических реакций и, как следствие, наблюдается отсутствие достоверных различий активности ферментов между группой образцов плаценты после обработки криопротектором и группой образцов после обработки криопротектором и замораживания-размораживания.

Замораживание образцов нативной плаценты без защиты криопротектора приводит к частичному повреждению целостности цитоплазматических мембран, а также к улучшению проницаемости тканевых структур для субстрата и красителя и изменению в кинетике гистохимических реакций, которое, в свою очередь, приводит к увеличению диформазана.

Выводы

Таким образом, можно предположить, что действие низкотемпературного консервирования на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты аналогично действию на эту ткань проникающего криопротектора Me_2SO .

При рассмотрении образцов плаценты после низкотемпературного консервирования различными способами (без криопротектора и под его защитой) не наблюдается достоверных различий в содержании диформазана в препаратах со всеми ферментами, за исключением препаратов с НАД, где концентрация диформазана в образцах, консервированных под защитой Me_2SO , на 44% превышает уровень его концентрации в образцах, консервированных без криопротектора. Возможно,

experimental groups the changes in the activity of SDG in 11-33, for LDG in 11-72, for α -GPhDG in 14-38, for NAD in 22-72 and for NADP in 7-39 % of cases depend on individual properties of each placenta sample.

Low temperature preservation of native placenta samples (freezing without cryoprotectant) results in a change in diformazan content in the preparations, an increase in its content for revealing SDG by 19, for LDG by 17, for α -GPhDG by 21% occurs, there is a decrease by 17% for NAD and no changes for NADP.

Low temperature preservation of placenta samples, pretreated with cryoprotectant does not change the diformazan content in preparations in respect of its content in those after treatment with cryoprotectant (the observed changes are insignificant and are not statistical and significant, $p < 0.95$).

When considering the differences in the enzyme behaviour under low temperature preservation of the native and cryoprotectant-treated placenta we should refer to the investigation results [5] about the effect of Me_2SO cryoprotectant on the activity of reductive-oxidative enzymes in placenta tissue. It was established, that the exposure in Me_2SO solution resulted in a considerable increase in all enzymes activity (excluding NADP, which activity change was not statistical and significant): by 17 for SDG, by 28 for LDG, by 49 for α -GPhDG and 28% for NAD.H².

The analysis of the mentioned above results allowed to assume, that Me_2SO , being a penetrating cryoprotectant, when interacting with a substrate or dye, provided better penetration of these substances into different tissue structures, that facilitated their access to the active enzyme centres and augmented the diformazan amount: the product of histochemical reaction.

After providing access by a penetrating cryoprotectant Me_2SO for the substrate and dye to the enzymes and creating the optimal conditions for histochemical reaction proceeding, the freeze-thawing procedure did not lead to a considerable change in kinetics of histochemical reactions and, as a result, there was observed the absence of statistical and significant differences in enzyme activity between the group of placenta samples after treating with cryoprotectant and those after cryoprotectant treatment and freeze-thawing.

The freezing of native placenta samples without cryoprotectant results in a partial integrity damage in plasmatic membranes, as well as in the improvement of tissue structure permeability for substrate and dye, and as a result, in a change in kinetics of histochemical reactions, which augments the diformazan amount.

Thus, it can be assumed, that the effect of low temperature preservation on the activity of reductive-oxidative enzymes in placenta tissue is similar to that

это обусловлено наличием некоторых отличий в изменении проницаемости тканевых структур для различных субстратов под действием криопротектора и низких температур.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа, проведенного для выявления степени влияния различных способов криоконсервирования фрагментов плаценты на активность окислительно-восстановительных ферментов, также указывают на то, что способ консервирования влияет на изменение активности только НАД (в $14,4 \pm 0,3\%$ случаев).

Литература

1. Грищенко В.И. Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации // Пробл. криобиологии.– 2001.– N3.– С. 7-8
2. Грищенко В.И., Юрченко Т.Н., Прокопюк О.С. и др. Низкотемпературное хранение эмбриональных и фетоплацентарных тканей в Украинском банке биологических объектов // Международный мед. журн. 1999.– Т.5, N2.– С. 113-114.
3. Журавлева Т.Б., Прочуханов Р.А. Введение в количественную гистохимию ферментов.– М.: Медицина, 1978.– 246 с.
4. Юрченко Т.Н., Белоношко А.П., Жуликова Е.П., Шарлай Т.М. Динамика активности окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты при ее гипотермическом хранении // Пробл. криобиологии. – 2002.– N1.– С. 3-6.
5. Юрченко Т.Н., Белоношко А.П., Жуликова Е.П. и др. Влияние криопротектора Me_2SO на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты // Пробл. криобиологии.– 2003.– N1.– С. 3-6.

Поступила 21.10.2003

of Me_2SO penetrating cryoprotectant on this tissue.

When considering placenta samples after low temperature preservation using different ways (without cryoprotectant and under its protection) no statistical and significant differences are observed in diformazan content in the preparations with all enzymes, excluding those with NAD, where diformazan concentration in the samples, cryopreserved under Me_2SO protection, exceeds by 44% the level of its concentration in those, preserved without cryoprotectant. It is possibly stipulated by the presence of some differences in a change of tissue structure permeability for different substrates under cryoprotectant and low temperature effects.

The results of one-factor dispersion analysis, carried-out for revealing the influence degree of different ways for placenta fragment cryopreservation on the activity of reductive-oxidative enzymes, point also to the fact, that the cryopreservation way affects the activity change only in NAD (in $14,4 \pm 0,3\%$ of cases).

References

1. Grischenko V.I. The role of cryobiology in creation of biotechnologies for cellular and tissue transplantation // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 103-104.
2. Grischenko V.I., Yurchenko T.N., Prokopyuk O.S. et al. Low temperature storage of embryonic and fetoplacental tissues in Ukrainian Bank of Biological Objects // International Medical Journal.– 1999.– Vol.5, N2.– P. 113-114.
3. Zhuravleva T.B., Prochukhanov R.A. Introduction in quantitative histochemistry of enzymes.– М.: Meditsina.– 1978.– 246 p.
4. Yurchenko T.N., Belonozhko A.P., Zhulikova E.P., Sharlay T.M. Dynamics of oxidative and recovering activity of enzymes in placenta tissue under its hypothermic storage//Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P. 3-6.
5. Yurchenko T.N., Belonozhko A.P., Zhulikova E.P. et al. Effect of Me_2SO cryoprotectant on the activity of reductive-oxidative enzymes in placenta tissue // Problems of Cryobiology.– 2003.– N1.– P. 3-6.

Accepted in 21.10.2003