

УДК 611.013.85:615.35:577.15:547.42

UDC 611.013.85:615.35:577.15:547.42

**Влияние криопротектора  $\text{Me}_2\text{SO}$  на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты**Т.Н. ЮРЧЕНКО, А.П. БЕЛОНОЖКО, Е.П. ЖУЛИКОВА, Т.М. ШАРЛАЙ, В.И. СТРОНА, В.И. ШЕПИТЬКО  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков**Effect of  $\text{Me}_2\text{SO}$  Cryoprotectant on the Activity of Reductive-Oxidative Enzymes in Placenta Tissue**YURCHENKO T.N., BELONOZHKO A.P., ZHULIKOVA E.P., SHARLAY T.M., STRONA V.I., SHEPITKO V.I.  
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,  $\alpha$ -ГФДГ, НАД.Н<sup>2</sup> и НАДФ.Н<sup>2</sup> в ткани плаценты после ее инкубации с раствором криопротектора  $\text{Me}_2\text{SO}$ .

**Ключевые слова:** окислительно-восстановительные ферменты, криопротектор, плацента.

Методами кількісної гістохімії і кількісного фотометричного аналізу проведено дослідження змін активності СДГ, ЛДГ,  $\alpha$ -ГФДГ, НАД.Н<sup>2</sup> і НАДФ.Н<sup>2</sup> у тканині плаценти після її інкубації з розчином криопротектора  $\text{Me}_2\text{SO}$ .

**Ключові слова:** окислювально-відновні ферменти, криопротектор, плацента.

Using the methods of quantitative histochemistry and quantitative photometric analysis there was performed the investigation of the change in SDG, LDG,  $\alpha$ -GPhDG, NAD.H<sup>2</sup> and NADP.H<sup>2</sup> activity in placenta tissue after its incubation with  $\text{Me}_2\text{SO}$  cryoprotectant solution.

**Key words:** reductive-oxidative enzymes, cryoprotectant, placenta.

Последнее десятилетие характеризуется интенсивным развитием нового направления в медицине – клеточной и тканевой трансплантации – и использованием для этих целей тканей и клеток эмбриофетоплацентарного комплекса.

Механизмы действия фетальных препаратов могут быть специфическими (заместительными) и неспецифическими, основанными на модуляции процессов регенерации, репарации, пролиферации и дифференцировки клеток.

Непреодолимым препятствием для применения в медицине фетоплацентарного материала являлся короткий срок от его получения до использования, поскольку удлинить срок гипотермического хранения не представлялось возможным из-за развивающегося аутолиза. Такая ситуация не позволяла провести достаточно качественного тестирования донорских клеток и тканей для исключения бактериальной и вирусной контаминации.

Эту задачу можно решить криоконсервированием с обеспечением правильности всех этапов заготовки и хранения материала [1, 2].

Recent decade is characterised with an intensive development of such a new direction in medicine as cellular and tissue transplantation and the usage for these purposes of tissues and cells of embryo-fetoplacental complex.

The effect mechanisms of fetal preparations can be specific (substitutive) and non-specific one, based on modulation of regeneration, reparation, proliferation and cell differentiation processes.

Short-term period from fetoplacental material procurement to usage is an insuperable obstacle for its applying in medicine, since the prolongation of hypothermic storage term did not seem to be possible due to autolysis development. Such situation did not allow to carry-out quite a qualitative test of donor's cells and tissues for excluding the bacterial and viral contamination. This task can be solved by means of cryopreservation with ensuring the regularity of all the stages for material procurement and storage [1, 2].

We have conducted earlier the investigation on studying the effect of hypothermic storage on enzyme complex in placenta tissue fragments [5].

The aim of this investigation is to study the  $\text{Me}_2\text{SO}$

*Адрес для корреспонденции:* Юрченко Т.Н., 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:* Yurchenko T.N., 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

Ранее нами было проведено исследование по изучению влияния гипотермического хранения на ферментативный комплекс в фрагментах ткани плаценты [5].

Цель данного исследования – изучение влияния криопротектора  $\text{Me}_2\text{SO}$  на активность некоторых окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты при ее подготовке к длительному низкотемпературному хранению.

### Материалы и методы

Исследование проводили методами количественной гистохимии и фотометрического анализа [3,4].

Образцы плаценты были получены в результате доношенной беременности после родов или кесарева сечения. Фрагменты плаценты массой 2 г инкубировали с криопротектором  $\text{Me}_2\text{SO}$  при температуре  $10^\circ\text{C}$  на протяжении 15-20 мин, далее из образцов были приготовлены криостатные срезы (толщина 10 мк), которые инкубировали с соответствующими субстратами и окрашивали нитросиним тетразолом. В результате окрашивания в препаратах образовывался осадок диформазана, количество которого и являлось критерием оценки активности ферментов. Для контроля за протеканием гистохимической реакции были использованы криостатные срезы печени интактных крыс. В результате проведенных гистохимических реакций в исходной ткани и подвергшейся обработке криопротектором плаценте выявлены следующие ферменты: СДГ, ЛДГ,  $\alpha$ -ГФДГ, а также НАД.Н<sup>2</sup> и НАДФ.Н<sup>2</sup>-диафоразы.

Количественный учет содержания диформазана в срезах нативной плаценты и после ее обработки криопротектором проводили методом фотометрического анализа с использованием телевизионного микроскопа-фотометра.

Подробно метод фотометрического анализа и статистической обработки его результатов приведен в [5].

### Результаты и обсуждение

Результаты гистохимического и фотометрического анализа позволяют судить о влиянии криопротектора  $\text{Me}_2\text{SO}$  на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты после контакта с раствором криопротектора (таблица).

Следует отметить, что активность ферментов в ткани плаценты после ее эквilibрации с криопротектором повышается: активность СДГ – на 17,1, ЛДГ – на 27,6,  $\alpha$ -ГФДГ – на 49,3, НАД.Н<sup>2</sup> – на 28,0, НАДФ.Н<sup>2</sup> – всего на 2,3%, что статистически не достоверно относительно контроля.

Кроме того, изменение активности ферментов

effect on the activity of some reductive-oxidative enzymes in placental tissue when preparing it to long-term low temperature storage.

### Materials and methods

The investigations were carried-out using the methods of quantitative histochemistry and photometric analysis [3, 4].

Placenta samples were procured as a result of mature pregnancy after labour or Cesarean section operation. Placenta 2g' fragments were incubated with  $\text{Me}_2\text{SO}$  at the temperature of  $10^\circ\text{C}$  during 15-20 min, then the cryostat sections of 10 mks' thick were prepared from the samples, which were incubated with corresponding substrates and stained with nitroblue tetrasolium. As a result of staining there was formed the diformazan sediment, which amount was the criterion for estimating enzyme activity. For controlling the histochemical reaction proceeding there were used the cryostat sections of intact rat's liver. As a result of performed histochemical reactions the following enzymes were revealed in initial tissue and cryoprotectant-treated placenta: SDG, LDG,  $\alpha$ -GPhDG, as well as NAD.H<sup>2</sup> and NADP.H<sup>2</sup>-diaphorase.

Diformazan content recording in native placenta sections and after its treatment with cryoprotectant was conducted using the method of photometrical analysis with TV microscope-photometer.

The method of photometrical analysis and statistical processing of the results is cited in details in the paper [5].

### Results and discussion

The results of histochemical and photometrical analysis allow to judge about the  $\text{Me}_2\text{SO}$  effect on the activity of reductive-oxidative enzymes in placenta tissue after contacting with cryoprotectant solution (Table).

It should be noted, that there is an increase in the enzyme activity in placenta tissue after its equilibration with cryoprotectant: SDG activity by 17.1, LDG by 27.6,  $\alpha$ -GPhDG by 49.3 and NAD.H<sup>2</sup> by 28.0 and NADP.H<sup>2</sup> by 2.3%, that is not statistically true in respect to the control.

In addition, the change in the enzyme activity in each studied group of objects (control, treatment with cryoprotectant) is related in a great extent to the fact, that the determination of enzyme activity was conducted in 5 different objects (placentas). The results of dispersion analysis point to the fact, that in each experimental group the change in the enzyme activity in 14-65% of cases is related to the heterogeneity of experimental material.

The results of dispersion analysis for estimating the effect intensity of placenta sample contact with

в каждой исследованной группе объектов (контроль, обработка криопротектором) в значительной степени связано с тем, что определение активности ферментов было проведено на 5 различных объектах (плацентах). Результаты дисперсионного анализа указывают, что в каждой экспериментальной группе изменение активности ферментов в 14-63% случаев связано с неоднородностью экспериментального материала.

Результаты дисперсионного анализа оценки силы влияния контакта образцов плаценты с криопротектором  $Me_2SO$  на активность окислительно-восстановительных ферментов в ее структурных элементах (таблица) указывают на то, что только активность НАД.Н<sup>2</sup> не зависит от применения криопротектора, тогда как для остальных исследованных ферментов процедура инкубации образцов плаценты с криопротектором в 3-11% случаев приводит к изменению активности ферментов, что полностью подтверждают и результаты статистического анализа изменения активности окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты после ее инкубации с  $Me_2SO$ .

Возникает вопрос, каким образом инкубация с криопротектором приводит к изменению активности окислительно-восстановительных ферментов. Ответ на этот вопрос можно искать в методике приготовления срезов ткани для проведения гистохимического анализа активности ферментов. Срезы ткани, на которых проводятся гистохимические реакции, изготавливаются в криостатной камере при температуре -20°C. Очевидно, понижение температуры образца приводит к снижению активности ферментов, в результате чего гистохимические реакции проходят не полностью, что обуславливает снижение в ткани концентрации продукта гистохимической реакции – диформазана. Наличие криопротектора в образце после предварительной инкубации образца в его растворе защищает ткань, в

$Me_2SO$  on the activity of reductive-oxidative enzymes in its structural elements (Table) point to the fact, that only NAD.H<sup>2</sup> activity does not depend on the cryoprotectant application, whereas for the rest studied enzymes the incubation procedure of placenta samples with cryoprotectant in 3-11% of cases results in a change in the enzyme activity, that is completely confirmed by the results of statistical analysis of the activity change in reductive-oxidative enzymes in placenta tissue after its incubation with  $Me_2SO$ .

The question is how the incubation with cryoprotectant results in a change of reductive-oxidative enzymes? We can search the answer on this question in the method of tissue sections preparing for the enzyme activity histochemical analysis performance. The tissue sections, where to the

Изменение активности окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты после ее инкубации с  $Me_2SO$ .

Change in the activity of reductive-oxidative enzymes in placenta tissue after its incubation with  $Me_2SO$ .

Ферменты Enzymes	Статистические показатели Statistical indices	Контроль Control	Инкубация с $Me_2SO$ Incubation with $Me_2SO$
САГ SDG	$M \pm m$ P	114,5±3,5 0,999	134,1±5,5
	Достоверность различия P Statistical differences P	0,99	
	Фактор Factor F±f P	0,030±0,003 0,999	
ЛАГ LDG	$M \pm m$ P	125,3±3,8 0,999	159,9±5,6 0,999
	Достоверность различия P Statistical differences P	0,999	
	Фактор Factor F±f P	0,081±0,003 0,999	
α-ГФДГ α-GPhDG	$M \pm m$ P	96,1±4,7 0,999	143,5±6,0 0,999
	Достоверность различия P Statistical differences P	0,999	
	Фактор Factor F±f P	0,115±0,003 0,999	
НАД.Н <sup>2</sup> NAD.H <sup>2</sup>	$M \pm m$ P	158,2±7,4 0,999	202,5±6,0 0,999
	Достоверность различия P Statistical differences P	0,999	
	Фактор Factor F±f P	0,067±0,003 0,999	
НАДФ.Н <sup>2</sup> NADP.H <sup>2</sup>	$M \pm m$ P	158,4±6,3 0,999	153,9±5,7 0,999
	Достоверность различия P Statistical differences P	0,95	
	Фактор Factor F±f P	0,001±0,003 0,95	

том числе и находящиеся в ней ферменты, от действия пониженной температуры криостатной камеры, в результате чего реакция на срезах проходит более активно с образованием большего количества конечного продукта – диформаза.

Однако, учитывая то, что различные ферменты по-разному реагируют на процедуру инкубации с криопротектором, можно предположить наличие альтернативного варианта механизма действия криопротектора на протекание и результат гистохимических реакций. Возможно, вступая во взаимодействие с субстратом или красителем и являясь проникающим криопротектором,  $\text{Me}_2\text{SO}$  обеспечивает лучшее проникновение этих веществ в различные тканевые структуры, что облегчает их доступ к активным центрам ферментов, а это приводит к увеличению количества диформаза.

### Выводы

Выяснение действительного механизма действия криопротектора на активность окислительно-восстановительных ферментов требует дополнительных исследований.

### 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 // Междунар. 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., Шарлай Т.М. Динамика активности  $\alpha$ -ГФДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения // Пробл. криобиологии.– 1999.– N3.– С. 21-26.
5. 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.

Поступила 25.03.2003

histochemical reactions are carried-out, are prepared in cryostat chamber at the temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ . The temperature decrease of sample evidently results in the reduction of enzyme activity, following that the histochemical reactions proceed incompletely, stipulating the concentration decrease in a tissue of histochemical reaction product: diformazan. The cryoprotectant presence in a sample after its preliminary incubation in the solution protects tissue, including enzymes, being its part, against low temperature effect of cryostat chamber, as a result there is more active proceeding of the reaction on sections with formation of greater number of final product: diformazan.

However, taking into account the fact, that various enzymes respond in different ways on incubation procedure with cryoprotectant, we can assume the presence of alternative variant of cryoprotectant effect mechanism on the proceeding and the result of histochemical reactions. Maybe by interacting with a substrate or dye and being a penetrating cryoprotectant,  $\text{Me}_2\text{SO}$  provides a better penetration of these substances into different tissue structures, that facilitates their access to the active enzyme centres, resulting in an increase in diformazan number.

### Conclusions

The elucidation of real effect mechanism of cryoprotectant on the activity of reductive-oxidative enzymes requires additional research.

### 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.– Moscow: Meditsina.– 1978.– 246 p.
4. Yurchenko T.N., Belonozhko A.P., Sharlay T.M. Dynamics of  $\alpha$ -GPDG activity in cells of growing and regenerating epithelium of cornea in its hypothermical storage process // Problems of Cryobiology.– 1999.– N3.– P. 21-26.
5. 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.– N 1.– P. 3-6.

Accepted in 25.03.2003