

## Зміна активності дегідрогеназ, вмісту гормонів і стану ліпопероксидації в алогенній плаценті в залежності від дії низьких температур

В.І.Грищенко<sup>1</sup>, В.І.Шепітько<sup>2</sup>, В.І.Строна<sup>1</sup>, Т.М.Юрченко<sup>1</sup>, В.В.Рязанцев<sup>1</sup>, О.І.Щебржинський<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>2</sup>Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

## Change in Dehydrogenase Activity, Hormone Content and Lipoperoxidation State in Allogeneic Placenta Depending Upon Low Temperature Effect

GRISCHENKO V.I.<sup>1</sup>, SHEPIT'KO V.I.<sup>2</sup>, STRONA V.I.<sup>1</sup>, YURCHENKO T.M.<sup>1</sup>, RYAZANTSEV V.V.<sup>1</sup>, TSEBRZHINSKY O.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>Ukrainian Medical Stomathological Academy, Poltava

Представлено дані про метаболічні зміни в тканині плаценти при її гіпотермічному збереженні. Відзначено, що найбільш виражені метаболічні зміни в тканині плаценти при дії гіпотермії 1 добу (4°C), при збереженні 1 добу (-196°C) та подальшому зберіганні 1 рік (-20°C).

**Ключові слова:** плацента, кріоконсервування, гормони, ферменти, перекисне окислення.

Представлены данные о метаболических изменениях в тканях плаценты при ее гипотермическом хранении. Отмечено, что наиболее выраженные метаболические изменения в тканях плаценты при действии гипотермии в течение 1-х суток (4°C), при хранении в течение 1-х суток (-196°C) и дальнейшем хранении на протяжении 1-го года (-20°C).

**Ключевые слова:** плацента, крiоконсервирование, гормоны, ферменты, перекисное окисление.

The paper presented the data on metabolic alterations in placenta tissue during its hypothermic storage. The most manifested metabolic changes in placenta tissue were noted when being stored for 24hrs (4°C), 24hrs (-196°C) and further storage for 1 year (-20°C).

**Key-words:** placenta, cryopreservation, hormones, enzymes.

Виникнення і розвиток різного роду патологій та ушкоджень в значній мірі є наслідком вільно-радикального перекисного окислення (ВРПО) ліпідів.

Природним бар'єром для плоду, який захищає його від шкідливого впливу навколишнього середовища, є плацента [3, 8, 9]. З великою вірогідністю можна припустити наявність в ній особливих систем з антиоксидантною дією, які здатні охороняти клітини плоду від токсичного впливу вільних радикалів.

Відкривається перспектива використання плаценти як джерела біологічно активних речовин і в зв'язку з цим збереження тканини плаценти при низьких температурах.

Перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) є одним з основних процесів ушкодження ліпідів біологічних мембран [2, 7, 14], що відбувається при багатьох патологічних процесах [1, 3, 12], а також істотно активується в біологічних об'єктах після їхнього розморожування. Утворення й перетворення радикалів кисню є одним із процесів, що лежать в основі ушкодження клітин, біополімерів і субклітинних часток, і таких процесів, як ПОЛ, гіпоксичне

Appearance and development of various pathologies and tissue damages in a considerable degree is the result of free radical lipid peroxidation (LPO).

Placenta is known to be a natural barrier for a fetus, which protects it against harmful environment [3, 8, 9]. We may suppose the presence of special antioxidant effect systems, capable of protecting the fetal cells against free-radical toxic effect.

There is a perspective for using placenta as a source of biologically active substances and in this respect to preserve placenta tissues under low temperatures.

Formation and transformation of oxygen radicals is known to be one of the processes being in the base of a biopolymer cell damage as well as sub-cellular particles and such processes as LPO, inflammatory reaction etc. The initial stages of lipid oxidation are related to the formation of diene conjugates (DC), triene (TC), tetraene (TTC) and oxydiene conjugates (ODC). Lipid molecules are subjected to a multi-stage transformation into final LPO products: malone dialdehyde (MDA), Schiff bases (SB). In the majority of cases the presence of metal ions of a variable valency (Fe, Cu, etc.) is known to be the necessary condition for peroxide radical transformations.

**Адреса для кореспонденції:** Грищенко В.І., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 772-41-43, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Grischenko V.I., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7724143, fax: +38(057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ушкодження, запальна реакція та ін. Початкові стадії окислення ліпідів пов'язують з утворенням дієнових (ДК), трієнових (ТК), тетраєнових (ТТК) та оксидієнових кон'югатів (ОДК). Молекули ліпідів проходять багатостадійне перетворення в кінцеві продукти ПОЛ: малоновий діальдегід (МДА), шифові основи (ШО). У більшості випадків обов'язковою умовою перетворень перекисних радикалів є присутність іонів металів змінної валентності: Fe, Cu та ін. Важливо відзначити, що рівень вільнорадикальних процесів знаходиться в сильній залежності від присутності антиоксидантів – супероксиддисмутази (СОД), GSH-пероксидази (має селен), GSH-редуктази, каталази, хелаторів іонів металів, вітамінів Е, С, Р, глутатіону [1, 8, 9, 15].

Метаболічні зміни при кріоконсервуванні плаценти досліджені недостатньо. Однак ці зміни можуть впливати на активність плаценти, яка використовується як трансплантат для лікування різних захворювань. У процесі перебування плаценти під дією різних низьких температур, різної тривалості можливі утворення кристалів льоду, гальмування дифузії субстратів до ферментів, стабілізація мембран, їхнє руйнування, гіпоксія та ін. [6].

Мета роботи – дослідження зміни активності дегідрогеназ, вмісту гормонів і стану ліпопероксидації в залежності від дії низьких температур.

### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження була плацента, одержана при нормальному перебігу вагітності після кесаревого розтину.

Фрагменти плаценти зберігались: 1 добу при 4°C; 1 добу при -20°C; 1 добу при -20°C і з подальшим збереженням 1 рік при -196°C; 1 добу при -196°C і з подальшим збереженням при -20°C; контроль.

З фрагментів плаценти були приготовані заморожені зрізи товщиною 10 мкм. Зрізи інкубувалися з відповідними субстратами і офарблювалися нитросинім тетразолієм (НСТ). Внаслідок фарбування в препаратах утворювався осад диформазану, кількість якого і була критерієм оцінки ферментів. У результаті проведених гістохімічних реакцій у тканині нативної плаценти і плаценти, яку зберігали, були досліджені такі ферменти: сукцинат-дегідрогеназа (СДГ), лактатдегідрогеназа (ЛДГ),  $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогеназа ( $\alpha$ -ГФДГ), а також НАДН- і НАДФН-дегідрогенази (НАДНДГ, НАДФНДГ).

Для визначення вмісту кінцевих продуктів ПОЛ використовують нагрівання зразка біопроби в присутності 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК) при кислому рН і вимір оптичної щільності продукту,

Importantly, the level of free radical processes was noted to be strongly dependent upon the presence of antioxidants: superoxide dismutase (SOD), GSH-peroxidase (comprises selenium), GSH-reductases, catalases, metal ion chelators, E,C,P vitamins, glutathione [1,8, 9, 15].

Metabolic changes during placenta cryopreservation have not been studied completely. These changes however are able to affect the placenta activity used as a transplant with the aim of various diseases treatment. Placenta storage under low temperature effect of various duration there might cause the ice crystal formations, the suppression of substrate diffusion to enzymes, membrane stabilization, their damage, hypoxia *etc.* [6].

Studying the change of dehydrogenase, hormone content and lipoperoxidation state depending on low temperature effect was the aim of the work.

### Materials and methods

Placenta procured after normal pregnancy course followed by cesarean section served as the research material.

Placenta fragments were stored for 24hrs at 4°C; 24hrs at -20°C; 24hrs at -20°C with following storage for 1 year at -196°C; 24hrs at -196°C and further storage at -20°C; control.

Using placenta fragments there were prepared the frozen sections of 10 $\mu$ m width. The sections were incubated with certain substrates and stained by nitroblue tetrazolium (NBT). Due to the staining in the preparations there was formed diformazan supernatant, the amount of which served as a criterion for enzymes estimation. As a result of histochemical reactions performed in native placenta tissue and the one stored there were studied such enzymes as succinate dehydrogenase (SDG), lactate dehydrogenase (LDG),  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GPDG), as well as NADH and NADPH-dehydrogenases.

To evaluate the content of final LPO products one uses heating the sample of bioassay in the presence of 2-thiobarbituric acid (TBA) at acidic pH and optic density evaluation in the product formed at 532 nm. MDA or its derivatives are known to be the products, which interact with TBA. MDA and TBA complex is easily extracted by butanol that allows avoiding the spectrophotometry in a strongly diffused environment. MDA and its precursors (TBA-products) were determined by the method [10] in modification: 0.5 ml of purified placenta homogenate was added with 2 ml of 0.6% TBA on 1% orthophosphoric acid solution, the vials were heated on boiling water bath within 45 min. After cooling there was performed the extraction of TBA products with 3ml of n-butanol. Butanol extracts were subjected to photometry on SF-46 spectrophotometer within the wave length range of

що утворився, при 532 нм. Продуктом, який взаємодіє з ТБК, є МДА або його похідні. Комплекс МДА з ТБК легко екстрагується бутанолом, що дозволяє уникнути спектрофотометрування в сильно розсіяному середовищі. МДА і його попередників (ТБК-продуктів) визначали за методом [10] у модифікації: до 0,5 мл проясненого гомогенату плаценти додавали 2 мл 0,6%-ї ТБК на 1%-му розчині ортофосфорної кислоти, пробірки нагрівали на киплячій водяній бані протягом 45 хв. Після охолодження проводили екстракцію ТБК-продуктів 3 мл н-бутанолу. Бутанольні екстракти фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 у діапазоні довжин хвиль  $\lambda=535$  та 580 нм проти н-бутанолу. Концентрацію ТБК-продуктів розраховували відповідно до методики [12] за різницею оптичних щільностей  $\lambda=532$  та 580 нм з урахуванням розведення МДА в мікромольх на 1 л. У роботі використовували ТБК фірми „Серва” (Германія), інші реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації „х. ч.”.

Інший метод оцінки інтенсивності реакцій ПОЛ – це вимір первинних продуктів ДК [4]. Окислення ненасичених жирних кислот, що мають два і більше подвійних зв'язків, приводить до зсуву подвійного зв'язку й утворення сполучених кон'югованих подвійних зв'язків, що поглинають світло при  $\lambda=233$  нм. Однак у складних системах вимірювання ДК вимагає попередньої екстракції ліпідів. ДК визначали за методом [4] з незначною модифікацією: до 0,5 мл проясненого гомогенату плаценти, отриманого після центрифугування, додавали 3 мл екстрагуючої суміші гептану з ізопропіловим спиртом (у співвідношенні 1:1 за об'ємом). Після екстракції до суміші додавали 0,5 мл дистильованої води і відбирали 1 мл з верхньої фази розшарованої проби, змішуючи їх з 2 мл етанолу. Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при  $\lambda=233$  нм проти етанолу. В отриманих екстрактах первинні і кінцеві продукти ПОЛ вимірювали за методом [4] у модифікації [1]. Концентрацію подвійних зв'язків у ненасичених ліпідах вимірювали при  $\lambda=220$  нм, вміст ТК при довжині хвилі  $\lambda=268$  нм, ОДК при  $\lambda=287$  нм, кінцеві молекулярні продукти ПОЛ типу ШО при  $\lambda=400$  нм.

Вміст біологічно активних речовин у плаценті (гормони – пролактин, тестостерон і гідрокортизон) визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу, використовуючи готові тест-системи „Алькор-біо” (СПб, Росія) [12].

Білок кількісно визначали біуретовим методом. Іони  $\text{Cu}^{2+}$  у лужному середовищі утворюють комплекс з пептидною групою синьофіолетового кольору, інтенсивність якого прямо пропорційна кількості білка у пробі [10]: 0,5 мл препарату

$\lambda=535$  and 580 nm in contrast to n-butanol. Concentration of TBA-products was calculated according to the method [12] on the difference of optic densities  $\lambda=532$  and 580 nm taking into consideration the MDA dilution in micromoles per 1l. In the work we have used the TBA produced by Serva (Germany), other reagents were of Ukrainian production, of grade “chemically pure”.

Evaluation of the DC primary products is known to be another method for estimation of the intensity of LPO reactions [4]. Oxidation of unsaturated fatty acids, which have two or more double bonds, results in a double bond shift and formation of conjugated double bonds, absorbing the light at  $\lambda=233$ nm. In complex systems however the DC evaluation requires lipid preliminary extraction. DC was evaluated by the method [4] with a slight modification: up to 0.5 ml of purified placenta homogenate was obtained by centrifuging, there was also added 3 ml of extracting heptane-isopropyl alcohol mixture (1:1 ratio on volume). Following the extraction the mixture was supplemented with 0.5 ml of distilled water and 1 ml was taken off the top phase of a layered off sample, and mixed with 2 ml ethanol. Optical density was evaluated in CF-46 spectrophotometer at  $\lambda=233$ nm versus ethanol. In the extracts obtained the primary and final LPO products were measured by the method [4] in modification [1]. Concentration of double bonds in non-saturated lipids was measured at  $\lambda=220$ nm, the content of TC was done at a wavelength of  $\lambda=268$ , the one of ODC was evaluated at  $\lambda=287$ nm, LPO final molecular products of SB type were measured at  $\lambda=400$ nm.

Content of biologically active substances in placenta (hormones: prolactin, testosterone and hydrocortisone) was measured by the method of a dense-phase immune-enzyme analysis using the “Alcorbio” ready-to-use test-systems (St-Petersburg, Russia) [12].

Protein was evaluated quantitatively using biuretic method. In acidic environment  $\text{Cu}^{2+}$  ions form the complex with peptide group of blue-violet color which intensity is proportional to the amount of protein in a sample [10]: 0.5ml of the preparation is placed into a 50 ml measure container, the solution volume is supplemented by 0.9% sodium chloride solution up to the mark and replaced afterwards. The obtained solution (5 ml) is placed into a 20 ml vial, then 5ml of biuretic reagent is added (State Pharmacopoeia) and replaced. In 30 min the optical density is measured for the solution obtained at spectrophotometer at a wavelength of  $\lambda=540$ nm in a cuvette with the layer width of 10mm, using as the control for the reagents of comparison the solution, which comprises 5 ml of 0.9% sodium chloride solution and 5 ml of biuretic reagent.

All the absolute values of biologically active substances measured in placenta, content of LPO

вміщують у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину 0,9%-м розчином хлориду натрію до мітки і перемішують. Отриманий розчин (5 мл) вміщують у пробірку місткістю 20 мл, додають 5 мл біуретового реактиву (Державна Фармакопея XI, вип. 2, с. 35) і перемішують. Через 30 хв вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі  $\lambda=540$  нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, застосовуючи для контролю на реактиви порівняння розчин, що містить 5 мл 0,9%-го розчину хлориду натрію і 5 мл біуретового реактиву.

Усі обмірювані в плаценті абсолютні величини біологічно активних речовин, вміст продуктів ПОЛ були пронормовані на концентрацію білка в пробі.

Дане дослідження є фрагментом НДР „Розробка нових кріобіологічних технологій використання кріоконсервованих ембріональних клітин, тканин людини та тварини в медицині”, № державної реєстрації 0199U000323.

### Результати та обговорення

Гістохімічним методом нами виявлено (рис. 1) прогресуюче зниження активності ЛДГ при дії гіпотермії (4°C) на першу і другу добу ( $P<0,01$ ). Це вказує на порушення анаеробного гліколізу і можливості виходу пірувату без запасу в лактат, в аеробне окислення. Активність СДГ циклу трикарбонових кислот залишалася на рівні контролю без гіпотермічного збереження, при цьому аеробне окислення в мітохондріях зберегло свою функцію. В електронно-транспортному ланцюзі мітохондрій до кінця першої доби збільшилася активність у плаценті НАДНДГ. НАДФНДГ, що бере участь у мікросомальному окисленні, зв'язаному з цитохромом P-450, істотно втратила свою активність на 2-у добу ( $P<0,05$ ). Активність  $\alpha$ -ГФДГ істотно не змінилася. Дія гіпотермії (4°C) на плаценту протягом двох діб найбільш істотно виявляється в зниженні активності ЛДГ і НАДФНДГ [16].

Мітохондріальне і мікросомальне окислення – джерела активних форм кисню, які викликають деструкцію біополімерів шляхом активації неферментативного ВРПО (рис. 2). Нами виявлено, що в фрагментах плаценти протягом однієї доби (4°C) збільшується концентрація первинних і проміжних продуктів ліпопероксидації (ДК, ТК, ТТК, ОДК) при порівнянні з контролем лише з тенденцією до вірогідності ( $P<0,1$ ), а також збільшується вміст вторинного продукту в плаценті МДА (рис. 3) і різко зростає вміст ШО ( $P<0,01$ ) (див. рис. 2).

Глутатіон є сильним захисником від пероксидації ліпідів у тканині плаценти. Його вміст суттєво знижується при збереженні 1 добу при 4°C та 1 добу при -196°C, а потім рік при -20°C на 15 та

products were compared with the norm for protein concentration in a sample.

This study is the fragment of R&D work “Elaboration of new cryobiological techniques for the use of cryopreserved embryonic cells, tissues derived from a human being and animals in medicine”, state registration N 0199U000323.

### Results and discussion

Using histochemical methods we revealed the progressing fall of LDH activity under hypothermia effect (4°C) by the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> day ( $P<0.01$ ). It points to the impairments of anaerobic glycolysis and the possibility of pyruvate release with no stocks into lactate, in aerobic oxidation. SDG activity of the cycle of tricarboic acids remained at the control level, without hypothermic integrity, in this case aerobic oxidation in mitochondria was noted to keep its function. In electron-transporting link of mitochondria the activity in placenta of NADNDG increased by the end of the week. NADPHDG participates in macrosomal oxidation, related to cytochrome P-450 and considerably lost its activity by the 2-4<sup>th</sup> day ( $P<0.05$ ). Activity of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase did not significantly change. Effect of hypothermia (4°C) on placenta within 2 days is considerably manifested in reducing the LDG and NADPH DG activity [16].

Mitochondrial and microsomal oxidation is known to be the source for active oxygen forms, which cause biopolymers destruction by activating non-enzymic free-radical lipid peroxidation (Fig. 2). We established that in placenta fragments the concentration of initial and intermediate lipoperoxidation products (DC, TC,

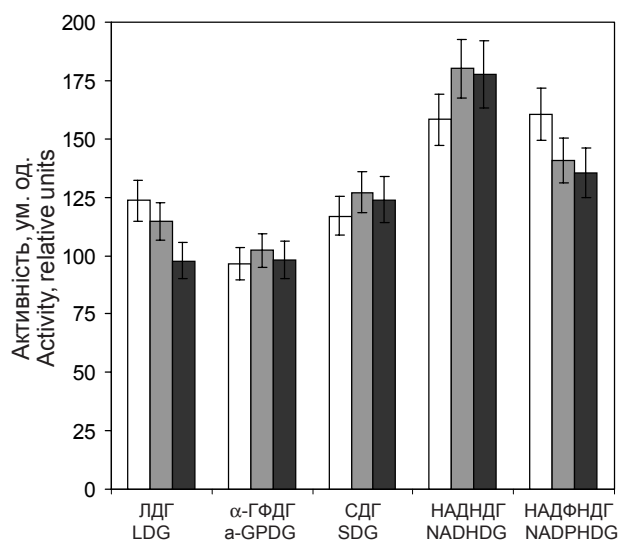
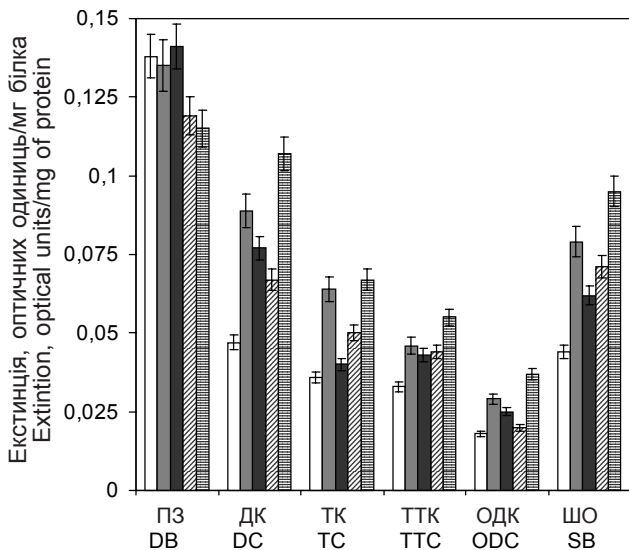


Рис. 1. Активність дегідрогеназ плаценти при дії гіпотермії. □ – контроль; ■ – 1-а доба; ■ – 2-а доба.

Fig. 1. Placenta dehydrogenase activity under hypothermia effect. □ – control; ■ – 1st day; ■ – 2nd day.



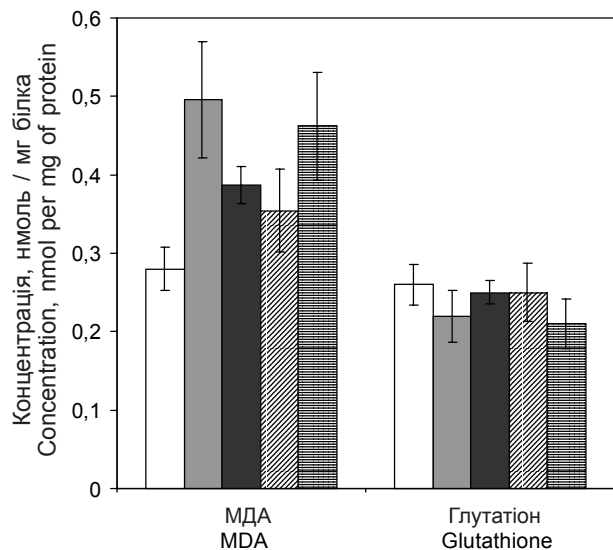


**Рис. 2.** Вміст продуктів ПОЛ в плаценті при різних режимах низькотемпературного збереження. □ – контроль; ■ – 1 добу при 4°C; ▒ – 1 добу при -20°C; ▨ – 1 добу при -20°C і 1 рік при -196°C; □ – 1 добу при -196°C і 1 рік при -20°C.

**Fig. 2.** Content of LPO products in placenta at various regimens of low temperature preservation. □ – control; ■ – 1 day at 4°C; ▒ – 1 day at -20°C; ▨ – 1 day at -20°C and 1 year at -196°C; □ – 1 day at -196°C and 1 year at -20°C.

19% відповідно. При збереженні 1 добу при -20°C та 1 добу при -20°C і 1 рік при -196°C активність глутатіонредуктази підтримує його нормальний рівень (рис. 3).

Аналогічна ситуація спостерігається при дії на фрагменти плаценти низьких температур (1 добу при -196°C, а потім рік при -20°C). При збереженні тканини плаценти 1 добу при -20°C і 1 рік при -196°C істотних змін у стані ліпопероксидації не встановлено. В умовах гіпотермії при 4°C це пов'язано з дисбалансом НАДН- і НАДФН-дегідрогеназ, які починають транспорт водню на кисень. Навпаки, найбільше посилення ВРПО в тканинах плаценти відбувається при дії низьких температур: 1 добу при 4°C і 1 добу при -196°C, а потім 1 рік при -20°C. Очевидно, при 4°C біохімічні процеси послабляються, сповільнюється дифузія субстратів до ферментів, що створює умови для альтернативного неферментативного процесу ВРПО. В умовах заморожування до -196°C протягом 1-ї доби та подальшого знаходження впродовж 1-го року при -20°C не виключена деструкція кристалами льоду мембран клітин, яка підсилює їхній контакт зі зв'язаним, розчиненим у біосередовищах і навколишній тканині киснем. При цьому можливі контакт  $O_2$  з іонами заліза, ферментів і індукція утворення активних форм кисню. Утворені продукти ПОЛ можуть бути стресинами, факторами променевої патології, тобто інтоксикантом організму і фактором, який викликає деструкцію



**Рис. 3.** Вміст МДА і глутатіону в плаценті при різних режимах низькотемпературного збереження. □ – контроль; ■ – 1 добу при 4°C; ▒ – 1 добу при -20°C; ▨ – 1 добу при -20°C і 1 рік при -196°C; □ – 1 добу при -196°C і 1 рік при -20°C.

**Fig. 3.** MDA and glutathione content in placenta at various regimens of low temperature preservation. □ – control; ■ – 1 day at 4°C; ▒ – 1 day at -20°C; ▨ – 1 day at -20°C and 1 year at -196°C; □ – 1 day at -196°C and 1 year at -20°C.

TTC, ODC) increased within one day (4°C) comparing to the control tended only to statistical significance ( $P < 0.1$ ), as well as the content of secondary product in placenta MDA (Fig. 3) and SB content sharply decreased ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2).

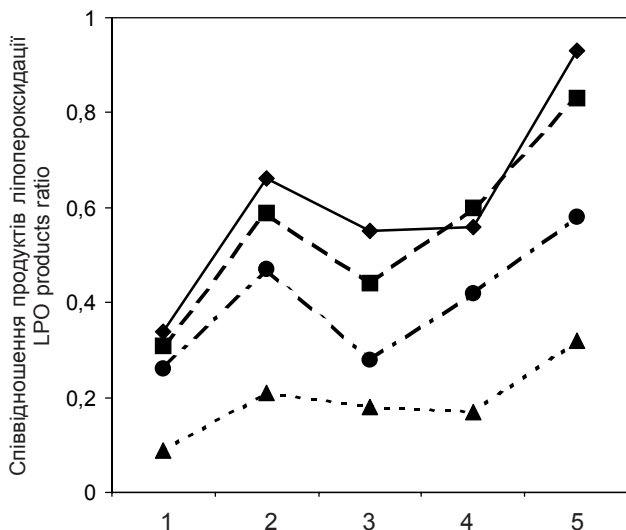
Glutathione is known to be a strong protector against lipid peroxidation in placenta tissue. Its content significantly falls during 1 day storage at 4°C and 24hrs at -196°C, then during 1 year at -20°C by 15 and 19%. During a 24hrs storage at -20°C and 1 year at -196°C glutathione reductase activity keeps its normal level (Fig. 3).

Similar situation is noted under low temperature effect on placenta fragments (24hrs at -196°C, and afterwards 1 year at -20°C). During placenta tissue storage for 24hrs at -20°C and 1 year at -196°C no significant changes in lipoperoxidation state were noted. Under hypothermia conditions at 4°C this fact is related to misbalance in NADP- and NADPH-dehydrogenases, which start hydrogen transport towards oxygen. In contrast, the highest increase of free-radical lipid peroxidation in placenta tissue was noted to occur under the effect of low temperatures: 1 day at 4°C and 1 day at -196°C, then 1 year at -20°C. Biochemical processes might be weaker under 4°C, substrate diffusion to enzymes is getting slower, making the conditions for alternative non-enzymic process of free-radical lipid peroxidation. Under freezing conditions down to -196°C during the 1<sup>st</sup> day and further storage at -20°C during a year the cell membrane

біологічно активних речовин трансплантованої плаценти.

Важливу інформацію про процеси ліпопероксидації в тканині плаценти дає відносний вміст в ній первинних, вторинних і кінцевих продуктів ПОЛ (рис. 4), що демонструє нам близькі до контрольного величини у випадку використання режиму збереження плаценти 1 добу при  $-20^{\circ}\text{C}$  і з наступним зануренням у рідкий азот. На активацію процесів пероксидації фосфоліпідів у тканині плаценти вказує збільшення показника відносного вмісту продуктів ліпопероксидації майже вдвічі (ДК/ПЗ, ТК/ПЗ, ОДК/ПЗ, ДК/ОДК і ШО/ПЗ) у порівнянні з контролем при збереженні 1 добу при  $4^{\circ}\text{C}$  та 1 добу при  $-196^{\circ}\text{C}$  і 1 рік при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Продукти ліпопероксидації є регуляторами клітинних реакцій за допомогою зміни проникності клітинних мембран тканини плаценти для різних медіаторів і ефекторних молекул. Накопичення продуктів ПОЛ в тканині плаценти супроводжується порушенням їх структури, деградацією клітин і втратою клітинами їх вмісту, зокрема біологічно активних речовин.

В умовах різних режимів і тривалості дії низьких температур вміст білка (рис. 5) у плаценті вірогідно не змінився в порівнянні з нативною плацентою (контроль), однак знизився вміст пролактину і кортизолу (рис. 6) за 1 добу при  $4^{\circ}\text{C}$ , а при витримуванні плаценти 1 добу при  $-196^{\circ}\text{C}$ , а потім 1 рік при  $-20^{\circ}\text{C}$  також вірогідно понизилися концентрації тестостерону і кортизолу (рис. 6).

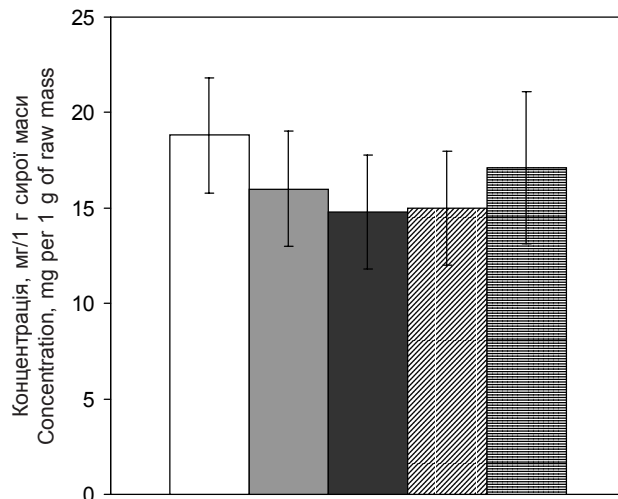


**Рис. 4.** Відносний вміст продуктів ліпопероксидації в плаценті при різних режимах низькотемпературного збереження. 1 – контроль; 2 – 1 добу при  $4^{\circ}\text{C}$ ; 3 – 1 добу при  $-20^{\circ}\text{C}$ ; 4 – 1 добу при  $-20^{\circ}\text{C}$  і 1 рік при  $-196^{\circ}\text{C}$ ; 5 – 1 добу при  $-196^{\circ}\text{C}$  і 1 рік при  $-20^{\circ}\text{C}$ ; ◆ – ДК/ПЗ; ● – ШО/ПЗ; ▲ – ОДК/ПЗ; ■ – ТК/ПЗ; ◼ – ОДК/ПЗ.

**Fig. 4.** Relative content of LPO products in placenta at various regimens of low temperature preservation. 1 – control; 2 – 1 day at  $4^{\circ}\text{C}$ ; 3 – 1 day at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; 4 – 1 day at  $-20^{\circ}\text{C}$  and 1 year at  $-196^{\circ}\text{C}$ ; 5 – 1 day at  $-196^{\circ}\text{C}$  and 1 year at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; ◆ – DC/DB; ● – SB/DB; ▲ – TC/DB; ■ – ODC/DB.

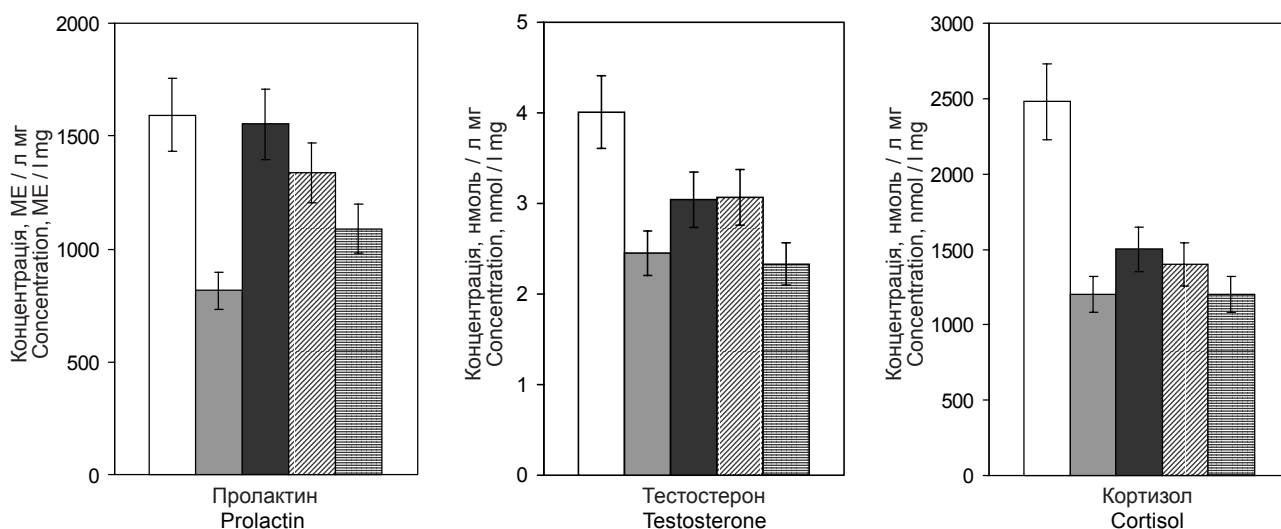
destruction by ice crystals which makes stronger their contact with bound, diluted in biological media and surrounding tissue oxygen, is considered to be obvious. In this case is thought to be possible the  $\text{O}_2$  contact with Fe ions, enzymes and induction of active oxygen forms formation. LPO products formed may be stress factors, the ones of irradiation pathology, i.e. organism intoxicant and the factor that causes the destruction of biologically active substances of the placenta transplanted.

Important information on lipid peroxidation processes in placenta tissue we can get from a relative content of initial, secondary and final LPO products (Fig. 4), that demonstrates the values close to the control ones in the case of using the regimen of placenta storage for 24hrs at  $-20^{\circ}\text{C}$  and with further immersion into liquid nitrogen. Two times' growth of the index of a relative content of lipid peroxidation products (DC/DB, TC/DB, ODC/DB, DC/ODC and SB/DB) if compared to the control during a 1 day storage at  $4^{\circ}\text{C}$  and 24hrs at  $-196^{\circ}\text{C}$  and 1 year at  $-20^{\circ}\text{C}$  points to the activation of phospholipid peroxidation processes in placenta tissue. Lipid peroxidation products are known to be the regulators of cell reaction due to the change of cell membrane permeability of placenta tissue for different mediators and effector molecules. Accumulation of lipid peroxidation products in placenta tissue is accompanied by damage of its structure, cell degradation and loss of the content by cells, in particular, of biologically active substances.



**Рис. 5.** Вміст білка в плаценті при різних режимах низькотемпературного збереження. □ – контроль; ■ – 1 добу при  $4^{\circ}\text{C}$ ; ■ – 1 добу при  $-20^{\circ}\text{C}$ ; ◼ – 1 добу при  $-20^{\circ}\text{C}$  і 1 рік при  $-196^{\circ}\text{C}$ ; ◻ – 1 добу при  $-196^{\circ}\text{C}$  і 1 рік при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Fig. 5.** Content of protein in placenta at various regimens of low temperature preservation. □ – control; ■ – 1 day at  $4^{\circ}\text{C}$ ; ■ – 1 day at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; ◼ – 1 day at  $-20^{\circ}\text{C}$  and 1 year at  $-196^{\circ}\text{C}$ ; ◻ – 1 day at  $-196^{\circ}\text{C}$  and 1 year at  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Рис. 6.** Вміст гормонів в плаценті при різних режимах низькотемпературного збереження. □ – контроль; ■ – 1 добу при 4°C; ■ – 1 добу при -20°C; ▨ – 1 добу при -20°C і 1 рік при -196°C; ▩ – 1 добу при -196°C і 1 рік при -20°C.

**Fig. 6.** Content of hormones in placenta at various regimens of low temperature preservation. □ – control; ■ – 1 day at 4°C; ■ – 1 day at -20°C; ▨ – 1 day at -20°C and 1 year at -196°C; ▩ – 1 day at -196°C and 1 year at -20°C.

Очевидно, в процесі заморожування і розморожування від 4 до -20°C відбувається розрив кристалами води лізосом, у результаті чого активуються ферменти обмеженого протеолізу, які здатні частково розщеплювати білок, у тому числі і пролактин аж до амінокислот. Не виключено вплив активних форм кисню, здатних руйнувати мембрани і вивільнити другі протеази. Нами показано, що ПОЛ в плаценті істотно збільшується саме в тих серіях дослідів, в яких з тенденцією до вірогідності виявлено зниження вмісту в плаценті пролактину, тестостерону, кортизолу. Існує можливість активації (у тому числі обмеженим протеолізом) ферментів детоксикації – цитохрому P-450 і трансфераз, у результаті чого знижується концентрація стероїдних гормонів тестостерону і кортизолу. Можливо, зниження вмісту кортизолу сприяє активації імунної системи реципієнта, оскільки кортизол є сильним імуносупресором [5, 11, 13].

### Висновок

Таким чином, найбільш виражені метаболічні зміни в тканині плаценти характерні при дії гіпотермії 1 добу при 4°C і 1 добу при -196°C та 1 рік при -20°C. Виходячи з відсутності вірогідних змін досліджуваних показників, найбільш оптимальними способами низькотемпературного збереження плаценти є її збереження 1 добу при -20°C і 1 добу при -20°C з наступним збереженням 1 рік при -196°C.

### Література

1. Аношина М.Ю., Суховій М.В., Ющенко П.В., Яговдік М.В. Вільнорадикальне окислення ліпідів та стійкість до

Under the conditions of various regimens and duration of low temperature effect the protein content (Fig. 5) in placenta did not considerably change if compared with a native placenta (the control), prolactin and cortisol content however was noted to decrease (Fig. 6) during 24 hrs at 4°C, but during 24 hrs at -196°C and then 1 year at -20°C testosterone and cortisol concentrations decreased considerably as well (Fig. 6).

Perhaps, during freeze-thawing process within the range of 4-20C there occurs the lysosome breakdown by water molecules that causes the activation of limited proteolysis enzymes, capable of partial splitting the protein, as well as prolactin towards amino acids. There believed to be possible the effect of active oxygen forms capable of membrane damaging and releasing the rest of proteases. We demonstrated the LPO content in placenta to increase considerably in those series of experiments tended to the probability, there was found the fall of prolactin, testosterone, cortisol in placenta content. There is the possibility of activation (as well as the use of limited proteolysis) of detoxication enzymes such as cytochrome P-450 and transferases, resulting in the fall of testosterone and cortisol steroid hormones. Reduction of cortisol content could probably affect the immune system activation in a recipient, as cortisol is known to be a strong immuno-suppressor [5, 11, 13].

### Conclusions

Thus the most manifested metabolic changes in placenta tissue occurred to be characteristic under a 24hrs hypothermia effect at 4°C and 24hrs at -196°C and 1 year at -20°C afterwards. Proceeding from the absence of considerable changes in the indices studied, the optimum methods for low temperature placenta

гемолізу еритроцитів у хворих на гемофілію в патогенезі розвитку ускладнень хвороби // Лаб. діагностика.– 2000.– №1.– С. 12-15.

2. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 256 с.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: Наука, 1972.– 252 с.
4. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопр. мед. химии.– 1989.– Т.35, №1.– С. 127-130.
5. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В.В. Серова и В.С. Пальцева.– М.: Медицина, 1995. – 640 с.
6. 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, №5.– С. 113-115.
7. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук. думка, 1988.– 206 с.
8. Козлов А.В. Изучение механизмов активизации перекисного окисления липидов при патологических процессах. Роль эндогенного железа: Автореф. дис... канд. биол. наук.– М., 1985.– 24 с.
9. Красноковский А.А. Синглетный кислород в фотобиологических процессах: Автореф. дис... д-ра биол. наук. – М., 1983. – 35 с.
10. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова.– М.: Медицина, 1987.– 366 с.
11. Мари Р., Кромени Д., Мейе Т., Родуэлл В. Биохимия человека.– М.: Мир, 1993.– Т.2.– 415 с.
12. Медицинская лабораторная диагностика / Под ред. А.И. Карпищенко.– СПб, 1997.– Т.2.– 304 с.
13. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы.– М.: Мир, 1989.– 656 с.
14. Цебржинский О.И. Некоторые аспекты антиоксидантного статуса // Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза, иммуногенеза.– Полтава, 1992.– С. 120-155.
15. Цебржинський О.І. Модифікація основ ДНК печінки при різних джерелах активних форм кисню в печінці при експериментальних інтоксикаціях // Мед. хімія.– 2000.– Т.2, №3.– С. 33-36.
16. Шепітько В.І. Порівняльна характеристика активності деяких дегідрогеназ у тканинах аlogenної плаценти при дії гіпотермії // Вісник пробл. біології і мед.– 2002.– Вип. 5.– С. 101-104.

Надійшла 02.02.2004

storage were found to be 24 hrs storage at -20°C and 24hrs at -20°C with following 1 year storage under -196°C.

## References

1. Anoshina M.Yu., Sukhoviy M.V., Yuschenko P.V., Yagovdik M.V. Lipid free-radical oxidation and resistance to erythrocytes hemolysis in patients with hemophilia in pathogenesis of the disease complications development // Lab. Diagnostika.– 2000.– N1.– P. 12-15.
2. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes of biological membranes during cooling.– Kiev: Naukova Dumka, 1982.– 256 p.
3. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Lipid peroxidation in biological membranes.– Moscow: Nauka, 1972.– 252.
4. Volchegorsky I.A., Nalimov A.G., Yarovinsky B.G., Lifshits R.I. Comparison of different approaches to determination of lipid peroxidation products in heptan-isopropanol blood extracts // Voprosy med. khimii.– 1989.– Vol.35, N1.– P. 127-130.
5. Inflammation. Manual for physicians / Edited by Serov V.V. and Paltsev V.S.– Moscow: Meditsina, 1995.– 640 p.
6. Grischenko V.I., Yurchenko T.N., Prokopyuk O.S. et al. Low temperature storage // International Med. Journal.– 1999.– Vol.5, N5.– P. 113-115.
7. Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Barrier properties of biomembranes under low temperatures.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 206 p.
8. Kozlov A.V. Studying the mechanism of lipid peroxidation activation at pathological processes. Role of endogenous iron: Author's abstract for obtaining of candidate's degree.– Moscow, 1985.– 24 p.
9. Krasnovsky A.A. Singlet oxygen in photobiological processes: Author's abstract for obtaining of doctor's degree.– Moscow, 1985.– 24 p.
10. Laboratory methods of investigation in clinics. Reference book / Ed. by Menshikov V.V.– Moscow: Meditsina, 1987.– 366 p.
11. Mary R., Kromenn D., Meye T., Roduell V. Biochemistry of human.– Moscow: Mir, 1993.– Vol.2.– 415 p.
12. Medicinal laboratory diagnostics / Edited by A.I. Karpishenko.– St-Petersburgh, 1997.– Vol.2.– 304 p.
13. Tepperman J., Tepperman H. Physiology of metabolism and endocrine system.– Moscow: Mir, 1989.– 656 p.
14. Tsebrzhinsky O.I. Some aspects of antioxidant status// Physiology and pathology of lipid peroxidation, hemostasis, immunogenesis.– Poltava, 1992.– P. 120-155.
15. Tsebrzhinsky O.I. Modification of liver DNA bases at various sources of active oxygen forms in liver at experimental intoxications // Med. Khimiya.– 2000.– Vol.2, N3.– P. 33-36.
16. Shepit'ko V.I. Comparative characteristics of the activity of some dehydrogenases in allogeneic placenta tissue under hypothermia effect // Visnyk probl. biol. i med.– 2002.– Issue 5.– P. 101-104.

Accepted in 02.02.2004