

Морфофункциональная сохранность фрагментов плаценты при различных схемах криоконсервирования

О.С. Прокопюк, В.Ю. Прокопюк

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphofunctional Integrity of Placental Fragments After Using Different Cryopreservation Protocols

O.S. PROKOPYUK, V.YU. PROKOPYUK

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

Необходимость криоконсервирования фрагментов плаценты с сохранением как клеток, так и межклеточных взаимодействий связана с их востребованностью в клинической практике [Грищенко В.И. и соавт., 2011] как источников стволовых клеток для банкирования [Lee L.K. *et al.*, 2010] и создания моделей для экспериментальных исследований новых фармакологических препаратов [Soorana S.R. *et al.*, 1999]. Имеющиеся методы криоконсервирования фрагментов плаценты [Huppertz B. *et al.*, 2011] основаны на использовании высоких концентраций диметилсульфоксида (ДМСО), который оказывает ингибирующее влияние на цитотрофобласт [Thirkill T.L., Douglas G.C., 1997], и не всегда обеспечивают сохранность ткани.

Цель работы – разработка метода криоконсервирования фрагментов плаценты, позволяющего максимально сохранить морфофункциональные свойства как отдельных клеток, так и ворсин в целом.

В качестве компонентов криозащитных сред использовали ДМСО, пропандиол, диметилформамид, полиэтиленоксид, поливинилпирролидон, декстран, гидроксипропилкрахмал (ГЭК), сахарозу, альбумин. Исследована двухэтапная программа криоконсервирования без и с применением сидинга. Структурную сохранность фрагментов изучали методами световой и электронной микроскопии, функциональные свойства – методами прижизненной окраски, определения уровней секреции альфа-фетопротеина и хорионического гонадотропина человека.

Показано, что все изученные вещества обладают криозащитным действием различной степени выраженности в отношении фрагментов плаценты. Наибольшая сохранность клеток плаценты отмечена при использовании ДМСО, однако при этом выявлены отслаивания цитотрофобласта и разрывы стромы ворсин. Сохранности структуры ткани удалось добиться при внесении в криозащитную среду ГЭК. Использование режима сидинга повысило эффективность криопрограммы: получена почти полная сохранность криоконсервированных фрагментов плаценты при минимальной концентрации криопротекторов.

Двухэтапная программа криоконсервирования с применением сидинга, диметилсульфоксида и гидроксипропилкрахмала позволяет достичь высокой степени морфофункциональной сохранности криоконсервированных фрагментов плаценты. Предложенные методы криоконсервирования и низкотемпературного хранения фрагментов плаценты позволят более эффективно их использовать в исследовательских и клинических целях.

The necessity in cryopreservation of placental fragments with preserving both cells and cell-to-cell interactions is associated to their relevance in clinical practice [Grischenko V.I. *et al.*, 2011] as the source of stem cells for banking [Lee L.K. *et al.*, 2010] and creating the models for experimental studies of novel pharmaceutical preparations [Soorana S.R. *et al.*, 1999]. Available methods for placental fragment cryopreservation [Huppertz B. *et al.*, 2011] are based on the use of high concentrated dimethyl sulfoxide (DMSO), causing an inhibitory effect on cytotrophoblast [Thirkill T.L., Douglas G.C., 1997], and not always providing the tissue integrity.

The research purpose was to design the method for placental fragment cryopreservation, enabling the maximum preservation of morphofunctional properties of both single cells and villi on the whole.

As components of cryoprotective media there were used DMSO, propanediol, dimethylformamide, polyethylene oxide, polyvinylpyrrolidone, dextran, hydroxyethyl starch (HES), sucrose and albumin. The two-stage program of cryopreservation without/with seeding was investigated. Structural integrity of fragments was studied with light and electron microscopy, functional properties were investigated with methods of supravital staining, determination of secretion level of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin.

All the studied substances were demonstrated to possess a cryoprotective effect of different manifestation rates towards placental fragments. The highest integrity of placental cells was noted when using DMSO, but in this case there were revealed the cytotrophoblast exfoliation and villous stroma breaks. We managed to achieve the integrity of tissue structure by introducing HES into cryoprotective media. The use of seeding regimen increased the efficiency of cryoprograms: quite a complete integrity of cryopreserved placental fragments under a minimum concentration of cryoprotectants was obtained.

The two-stage cryopreservation program with application of seeding, dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch enables to achieve a high degree of morphofunctional integrity in cryopreserved placental fragments. The proposed methods for cryopreservation and low temperature storage of placental fragments enable their more efficient application in research and clinical purposes.