

Экспериментальное обоснование эффективности мультифакторных программ криоконсервирования плацентарной ткани

В.Ю. ПРОКОПЮК, О.С. ПРОКОПЮК, О.В. ФАЛЬКО, В.В. ЧИЖЕВСКИЙ, В.В. ВОЛИНА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Experimental Substantiation of Efficiency of Multifactor Cryopreservation Programs for Placental Tissue

V.YU. PROKOPYUK, O.S. PROKOPYUK, O.V. FALCO, V.V. CHIZHEVSKY, V.V. VOLINA
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В современной медицине применяют препараты плаценты в форме криоконсервированных фрагментов к способам криоконсервирования которых предъявляются два основных требования: сохранение отдельных молекул, клеток, межклеточных взаимодействий, а также структуры ткани в целом; содержание только тех веществ, которые разрешены к клиническому применению.

Ткань плаценты получали во время операции кесарева сечения и доставляли в стерильной транспортной среде в течение 1 ч, фрагментировали до размеров 0,5×0,5 см. В работе исследовали влияние различных криопротекторов (диметилсульфоксид (ДМСО), полиэтиленоксид, диметилформамид, пропандиол, сахароза), их комбинаций, криозащитных сред, режимов криоконсервирования на сохранность фрагментов плаценты. В криозащитные среды добавляли высокомолекулярные соединения, обладающие свойствами криопротекторов и которые применяют в клинической практике как противошоковые вещества, способные выводить жидкость из тканей (полиглюкин, поливинил-пирролидон, гидроксиэтилкрахмал). Для уменьшения криоповреждений использовали многоэтапные программы криоконсервирования с применением сидинга, которые разрабатывали после изучения термограмм, полученных для каждого из растворов. Проводили витальное окрашивание, гистологический анализ фиксированных препаратов.

Выявлено, что полиэтиленоксид, диметилформамид, пропандиол токсичны, вызывают разрушение структуры ткани, не обеспечивают достаточную сохранность клеток при криоконсервировании. Оптимальный в данном случае криопротектор ДМСО не полностью предотвращал разрушение структуры ткани в виде разрывов межклеточного вещества и десквамации трофобласта, что можно объяснить повышенной гидрофильностью эмбриональной мезенхимы. При добавлении в криозащитные среды поливинилпирролидона и полиглюкина структура ткани сохранялась частично. Наибольшая сохранность фрагментов ткани достигалась при введении в состав среды гидроксиэтилкрахмала и сахарозы. Использование режима сидинга в программе замораживания позволило повысить сохранность фрагментов плаценты. Состояние ткани после размораживания приближалось к нативному после кратковременной инкубации в среде DMEM.

В результате проведенной работы показано, что наилучшие результаты были получены при применении многоэтапных программ криоконсервирования с сидингом, а оптимальными криозащитными свойствами обладали среды, включающие ДМСО, сахарозу, альбумин, гидроксиэтилкрахмал.

Modern medicine utilizes the placental preparations as cryopreserved fragments. Applied cryopreservation methods should meet two main requirements: individual molecules, cells, intercellular relations and tissue structure in a whole should be preserved; and the preparation should contain only the substances, approved to clinical use.

Placental tissue was derived during Caesarean section and delivered in sterile transport medium within 1 hr, cut to 0.5×0.5 cm fragments. In the research we studied the effect of different cryoprotectants (dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene oxide, dimethyl formamide, propane diol, sucrose), their combination, cryoprotective media, cryopreservation regimens on integrity of placental fragments. To cryoprotective media we added high molecular compounds possessing the properties of cryoprotectants and used in clinical practice as anti-shock means, capable to remove liquid from tissues (polyglucinum, polyvinyl pyrrolidone, hydroxyethyl starch). To reduce cryodamages the multi-step cryopreservation programs and seeding were used. The programs were designed after examining the thermograms obtained for each solution. Vital staining and histological investigation of fixed preparations were carried-out.

It was found that polyethylene oxide, dimethyl formamide, propane diol were quite toxic, caused the disorder in tissue structure, and did not provide the essential cell integrity during cryopreservation. Cryoprotectant DMSO was shown to be more optimal in this context, however it did not completely prevent the destruction of tissue structure such as ruptures of intercellular substance and desquamation of trophoblast, that could be explained by an increased hydrophilicity of embryonic mesenchyma. Adding of polyvinyl pyrrolidone and polyglucinum to cryoprotective media lead to a partial preservation of the tissue structure. The highest integrity of tissue fragments was achieved by introduction of hydroxyethyl starch and sucrose into the medium. Use of seeding in freezing program enables the increase of integrity of placental fragments. Post-thaw state of the tissue approached to native one after short-time incubation in DMEM.

As the result of the work performed it has been shown that the highest results were achieved when using multi-step cryopreservation protocols with seeding. Herewith the optimal cryoprotective properties were shown by the media, containing DMSO, sucrose, albumin and hydroxyethyl starch.