

УДК 615.361.013.85.014.41

Т.П. ГОВОРУХА\*, Л.Н. МАРЧЕНКО, Н.В. РЕПИН

## Структурные изменения деконсервированной плаценты при гипотермическом хранении

UDC 615.361.013.85.014.41

T.P. GOVORUKHA\*, L.N. MARCHENKO, N.V. REPIN

## Structural Changes of Frozen-Thawed Placenta at Hypothermic Storage

Методами оптической и электронной микроскопии изучали структурное состояние деконсервированной плаценты при ее гипотермическом хранении. Показано, что гипотермическое хранение фрагментов плаценты до 24-х часов не оказывает существенного влияния на структуру ткани терминальных ворсин. Пролонгирование хранения до 48 ч сопровождается значительными изменениями структуры деструктивного характера.

**Ключевые слова:** плацента, ультраструктура, гипотермическое хранение.

Методами оптичної та електронної мікроскопії вивчали структурний стан деконсервованої плаценти при її гіпотермічному зберіганні. Показано, що гіпотермічне зберігання фрагментів плаценти до 24-х годин суттєво не впливає на структуру тканини термінальних ворсин. Пролонгування зберігання до 48 год супроводжується значними змінами структури деструктивного характеру.

**Ключові слова:** плацента, ультраструктура, гіпотермічне зберігання.

Structural state of frozen-thawed placenta at its hypothermic storage was studied by the methods of optic and electron microscopies. Hypothermic storage of placenta fragments up to 24 hrs has been shown as not causing a significant effect on terminal villi tissue structure. Prolonged storage up to 48 hrs is accompanied by considerable rearrangements of destructive character.

**Key-words:** placenta, ultrastructure, hypothermic storage.

Плаценте и ее производным принадлежит значительная роль в комплексной терапии различных заболеваний в связи с высоким содержанием в ней биологически активных веществ [3, 4]. В настоящее время созданы методы низкотемпературного хранения биологического материала, позволяющие обеспечить высокий уровень сохранности структуры ткани и биологически активных веществ в криоконсервированном материале [1, 2, 5]. В то же время в практической медицине существует проблема сохранения деконсервированного материала в гипотермических условиях.

Цель работы – изучение структуры ткани фрагментов деконсервированной плаценты при ее последующем гипотермическом хранении.

### Материалы и методы

Объект исследования – фрагменты плаценты 5 доноров, полученные после операции кесарево сечение у здоровых женщин с нормально протекающей беременностью.

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

The main role in complex therapy of different diseases is played by placenta and its derivatives with high content of biological active agents [3, 4]. Nowadays, there have been created the methods of low temperature storage of biological material permitting to provide high structure preservation level for tissue and biological active agents in cryopreserved material [1, 2, 5]. At the same time in practical medicine there is the problem of preserving frozen-thawed material at hypothermic conditions.

Research aim is to study the structure of tissue of frozen-thawed placenta fragments at its following hypothermic storage.

### Materials and methods

Research object was placenta fragments of 5 donors obtained after Caesarian operation in healthy women with normally proceeding pregnancy.

Placenta fragments were cryopreserved by the technology [5] with previous incubation for 20 min with 8% DMSO solution. Frozen samples were thawed on water bath at 40°C.

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Фрагменты плаценты криоконсервировали по технологии [5] с предварительной инкубацией в течение 20 мин в 8%-м растворе ДМСО. Замороженные образцы отогревали на водяной бане при температуре 40°C.

Размороженные фрагменты плаценты хранили во влажной камере (закрытая чашка Петри объемом 15 см<sup>3</sup>) при температуре 4°C в течение 12, 24 и 48 ч.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки плаценты фиксировали в течение 2 ч в 2%-м растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,3-7,4) и 1 ч – в 1%-м растворе четырехоксида осмия. После обезвоживания этанолом возрастающей концентрации кусочки ткани заключали в эпон-аралдит. Полутонкие срезы толщиной 0,5 мкм получали на ультрамикротоме УМТП-7, окрашивали полихромным красителем на основе метиленового синего и основного фуксина, просматривали на микроскопе МБР-3, снабженном цифровой видеокамерой Panasonic WV-CP 470. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца.

В работе было исследовано 5 плацент по 3 образца каждой плаценты при разных сроках гипотермического хранения. Ультраструктуру клеток плаценты изучали при ускоряющем напряжении 75 кВс помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К, оснащенного системой съема и анализа изображения САИ – 01А (АО “SELMI”, г. Сумы) на основе CCD камеры DX-2 и пакета программ фирмы “KAPPA”, Германия.

### Результаты и обсуждение

Из всех структурных элементов плаценты ворсинки хориона – наиболее чувствительные и динамичные образования, поэтому особое внимание в исследованиях обратили на эту структуру.

Морфологический анализ ворсинчатого хориона деконсервированной плаценты выявил определенные изменения ультраструктуры клеточных и неклеточных элементов терминальных ворсин, связанных, в основном, с влиянием глубокого замораживания и последующего отогрева фрагментов плаценты.

Анализ полутонких срезов фрагментов деконсервированной плаценты после гипотермического хранения в течение 12 ч свидетельствует, что синцитиальный покров ворсин хориона представлен в виде четкой цитоплазматической каймы с гиперхромными глыбчатыми ядрами, расположенными в один ряд, часто с извилистыми контурами (рис. 1). Встречаются ворсины, в которых синцитиальный покров сохраняется только в виде обрывков или полностью отсутствует.

Thawed placenta fragments were kept in humid chamber (closed 15cm<sup>3</sup> Petri dish) at 4°C during 12, 24 and 48 hrs.

For electron microscopic examination the placenta pieces were fixed for 2 hrs in 2% glutaric aldehyde solution on phosphate buffer (pH 7.3-7.4) and 1 hr in 1% solution of osmic acid. Tissue pieces were placed into epon-araldit after dehydration by ethanol of increasing concentration. Semi-thin slices of 0.5 μm were obtained with UMTP-7 ultramicrotome, and stained by polychrome dye basing on methylene blue and main fuchsin, were investigated with MBR-3 microscope, equipped with Panasonic WV-CP 470 digital camera. Ultrathin slices were contrasted by saturated aqueous solution of uranyl acetate and lead citrate solution.

In this work there were studied five placentas by three samples of each at various terms of hypothermic storage. Ultrastructure of placenta cells was studied at 75kV accelerating voltage with PEM-125K electron microscope fitted with SAI-01A image analysis and retrieval system (SELMI, Ukraine) on the base of CCD DX-2 camera and “KAPPA” software (Germany).

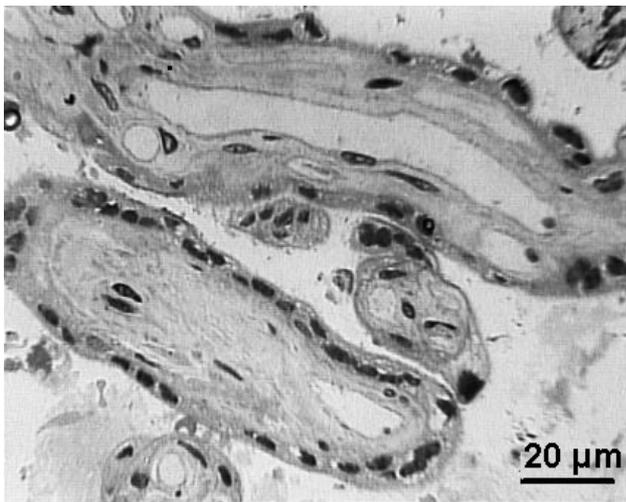
### Results and discussion

From all structural elements the placenta chorion villi are the most sensitive and dynamic formations, therefore our researches are basically targeted to this structure.

Morphological analysis of villous chorion of frozen-thawed placenta revealed certain changes of cells ultrastructure and non-cellular elements of terminal villi mainly related to deep freezing influence and following thawing of placenta fragments.

Analysis of semi-thin slices of placenta frozen-thawed fragments after hypothermic storage during 12 hrs testifies to the fact that villi syncytial cover of chorion is represented as distinct cytoplasmic edging with hyperchrome block-like nuclei, with twisting contours (Fig. 1). There are found the villi, where syncytial cover is kept as fragments or completely missing. Villi stroma is formed of loose connective tissue comprising fibrocytes of spindle-like shape with outgrowings branching-off in collagen net. Villi blood vessels vary. Along with plethoric, filled with form blood elements capillaries there are those with sclerotic walls.

Ultrastructure of placenta tissue elements, its villi chorion for 12 hrs after thawing is not undergone significant changes. Microvilli on syncytium surface are mainly kept and have thread-like shape, exfoliation of brush edging from epithelium layer surface is frequently observed. Syncytium nuclei of different shapes are filled predominantly with compact chromatine, their perinuclear lumen is sometimes widened. Cytoplasm is of moderate electron density



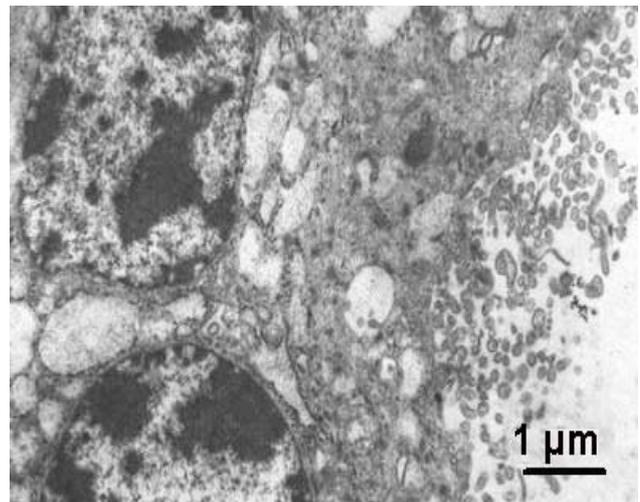
**Рис. 1.** Структура терминальных ворсин хориона после 12 ч гипотермического хранения фрагментов деконсервированной плаценты.

**Fig. 1.** Structure of terminal villi of chorion after 12 hrs' hypothermic storage of frozen-thawed placenta fragments.

Строма ворсин образована рыхлой соединительной тканью, содержащей фиброциты веретенообразной формы с отростками, расходящимися в коллагеновой сети. Кровеносные сосуды ворсин отличаются разнообразием. Наряду с полнокровными, заполненными форменными элементами крови, встречаются капилляры со склерозированными стенками.

Ультраструктура элементов ткани плаценты, ее ворсинчатого хориона в течение 12 ч после размораживания не претерпевает значительных изменений. Микроворсинки на поверхности синцития, в основном, сохраняются, имеют нитевидную форму, часто наблюдается отслоение щеточной каемки от поверхности эпителиального слоя. Ядра синцития различной формы, заполнены преимущественно компактным хроматином, их перинуклеарное пространство иногда расширено. Цитоплазма – умеренной электронной плотности с редкими округлыми митохондриями, имеющими слабо выраженные кристы в просветленном матриксе (рис. 2). Очаговое разрыхление и расслоение базальной мембраны также характерны для этого срока хранения фрагментов плаценты. Строма ворсин сохраняет строение клеточных и неклеточных компонентов, типичное для плаценты после размораживания.

Капиллярная сеть хориальных ворсин, наиболее чувствительное звено в субэпителиальном слое, характеризуется нарастанием признаков реактивности: выпячиванием ядер в просвет сосуда, подтягиванием периферических фрагментов цитоплазмы в околядерную область, расхождением плотных контактов, а также образованием микровилл поверхностью эндотелиоцитов (рис. 3).



**Рис. 2.** Ультраструктура фрагмента ядра и цитоплазмы синцитиотрофобласта после 12 ч гипотермического хранения деконсервированной плаценты.

**Fig. 2.** Ultrastructure of nucleus fragments and cytoplasm of syncytiotrophoblast after 12 hrs' hypothermic storage of frozen-thawed placenta.

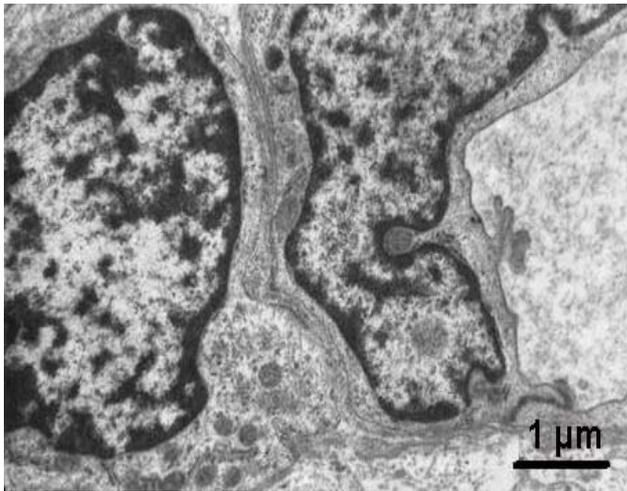
with infrequent roundish mitochondria with slightly manifested cristas in brightened matrix (Fig. 2). Focus loosening and exfoliation of basal membrane are also characteristic for this storage term of placenta fragments. Villi stroma preserves the structure of cell and non-cell components which are typical for placenta after thawing.

Chorial villi capillary net being the most sensitive link in subepithelial layer is characterized by accumulation of reactivity signs: nuclei protrusion into vessel lumen, indrawing of cytoplasm peripheric fragments into the area around nuclei, separating of dense contacts as well as the formation of microvilli by endotheliocytes surface (Fig. 3).

There are observed ruptures and exfoliation of syncytial layer from stroma after 24 hrs of hypothermic storage of placenta fragments (Fig. 4). Villi stroma is formed by loose connective tissue where fibrocytes with long outgrowings are located; cavities and sometimes empty spaces are found.

Electron and microscopic analyses of placenta fragments preparations after 24 hrs' hypothermic storage testify to the beginning of development of destructive changes in chorion villi structure. Villi surface, formed by syncytial layer, just sometimes preserves microvilli, the major part of those is destroyed. Nuclei electron density of syncytium increases perinuclear space considerably expands, and for some nuclei karyolemma fragmentation is characteristic (Fig. 5).

Syncytial layer exfoliation is observed more often, subepithelial membrane loosening increases. Cytoplasm syncytial organoids are not numerous, mitochondria cristas are absent. EPR cisterns widening and ribosome loss by membranes of granular net are found.

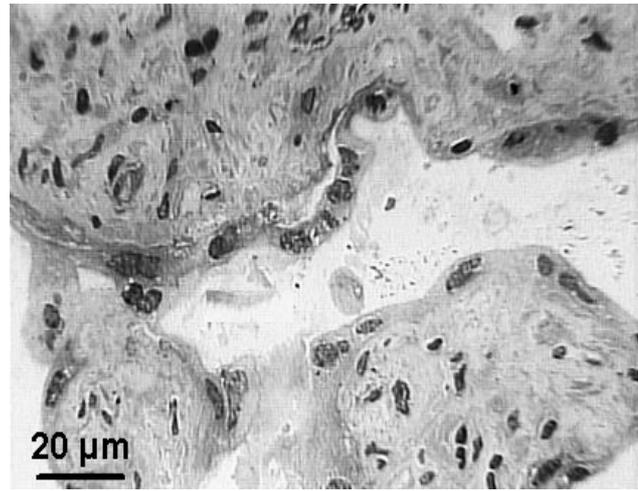


**Рис. 3.** Реактивное состояние эндотелия fetal capillary после 12 ч гипотермического хранения фрагментов деконсервированной плаценты.

**Fig. 3.** Reactive state of endothelium of fetal capillary after 12 hrs' hypothermic storage of frozen-thawed placenta fragments.

После 24 ч гипотермического хранения фрагментов плаценты, как и в предыдущем сроке, в некоторых местах наблюдаются разрывы и отслоение синцитиального слоя от стромы (рис. 4). Строма ворсин образована рыхлой соединительной тканью, в которой расположены фиброциты с длинными отростками; обнаруживаются полости, иногда пустоты.

Электронно-микроскопический анализ препаратов фрагментов плаценты после 24 ч гипотермического хранения свидетельствует о начале развития деструктивных изменений в структуре ворсинчатого хориона. Поверхность ворсин, образованная синцитиальным слоем, лишь иногда сохраняет микроворсинки, большая часть которых разрушена. Электронная плотность ядер синцития увеличивается, перинуклеарное пространство значительно расширяется, для части ядер характерна фрагментация кариолеммы (рис. 5). Все чаще наблюдается отслоение синцитиального слоя, возрастает разрыхление подэпителиальной мембраны. Органоиды синцитиальной цитоплазмы малочисленны, кристы митохондрий отсутствуют. Отмечаются расширение цистерн ЭПР и потеря рибосом мембранами гранулярной сети. Цитоплазматические органеллы цитотрофобласта характеризуются дезорганизацией крист митохондрий и незначительной фрагментацией цистерн ЭПР. При гипотермическом хранении деконсервированных фрагментов плаценты структурные элементы стромы ворсин, клетки соединительно-тканной природы и коллагеновые волокна мало изменяются. Однако увеличивается количество полостей и разрывов в соединительной ткани. Более значительные изменения происходят



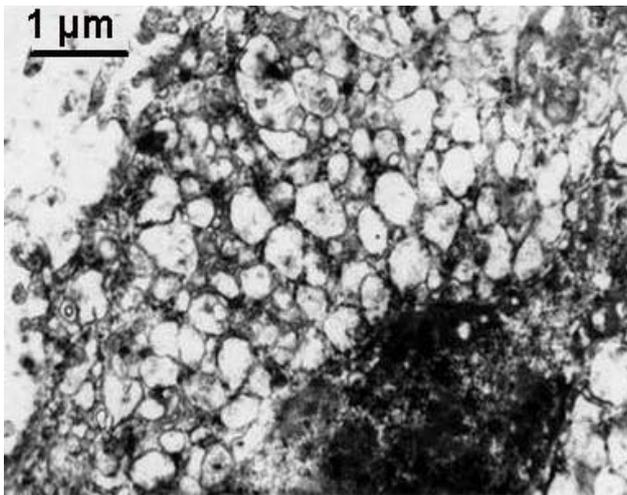
**Рис. 4.** Отслоение синцитиального слоя от стромы ворсин хориона после 24 ч гипотермического хранения фрагментов деконсервированной плаценты.

**Fig. 4.** Exfoliation of syncytial layer from villi chorion stroma after 24 hrs' hypothermic storage of frozen-thawed placenta fragments.

Cytoplasm organellas of cytotrophoblast are characterized by disorganization of mitochondria cristas and slight EPR cistern fragmentation. Under hypothermic storage of frozen-thawed placenta fragments the structural elements of stroma villi, cells of connective tissue origin and collagen fibers are not considerably altered. However, the number of cavities and ruptures in connective tissue enhances. More profound changes occur in blood capillaries structure of terminal villi. Further loosening and hydration of basal membranes, impairment of the integrity of endothelial cells result in narrowing of earlier plethoric capillary lumens. Endotheliocytes are gradually destroyed, there is observed hydration and focus lysis of cytoplasm organoids, impairment of intercellular contacts.

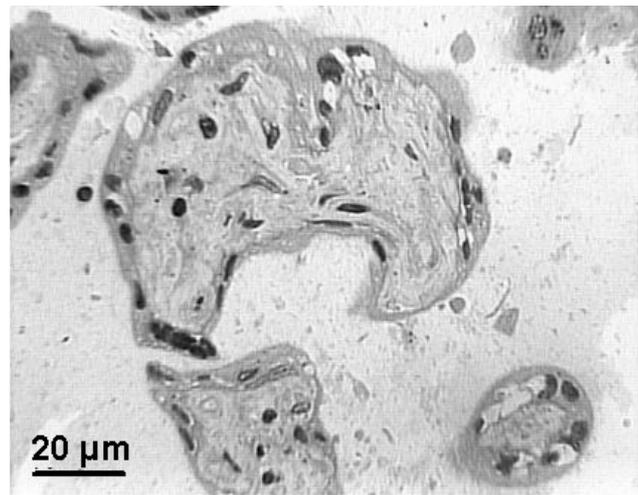
After 48 hrs of hypothermic storage of placenta fragments a microscopic picture points to sharply manifested destructive changes: exfoliation of syncytial layer of stromal villi with destruction of nuclei as well as detachment of growth nodules from stroma of terminal villi. There is found a focus destruction of chorion villi. There is a local lysis of connective tissue of stroma with the formation of big cavities. There are frequently found capillaries with slightly manifested lumen (Fig. 6).

Electron and microscopic analysis of ultrastructure of frozen-thawed placenta fragments of present term of hypothermic storage testifies to the development of the changes of destructive character, especially concerning of syncytiotrophoblast and capillary channel of terminal chorion villi. So, brush edging on syncytium surface is absent (Fig. 7). Syncytium nuclei gain a wrong shape, their chromatin is quite condensed and perinuclear space is widened. Nuclear accumulations in proliferation nodules form even conglomerates of



**Рис. 5.** Ультраструктура синцитиотрофобласта после 24 ч гипотермического хранения фрагментов деконсервированной плаценты.

**Fig. 5.** Ultrastructure of syncytiotrophoblast after 24 hrs' hypothermic storage of frozen-thawed placenta fragments.



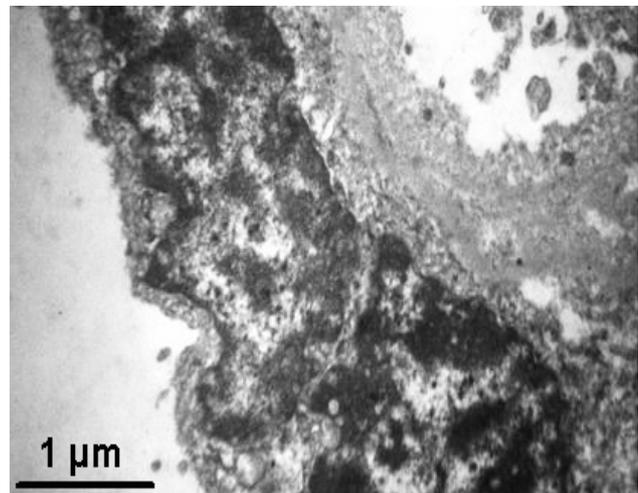
**Рис. 6.** Отсутствие просветов капилляров в терминальных ворсинах хориона после 48 ч гипотермического хранения фрагментов деконсервированной плаценты.

**Fig. 6.** Absence of capillaries lumens in terminal chorion villi after 48 hrs' hypothermic storage of frozen-thawed placenta fragments.

в структуре кровеносных капилляров терминальных ворсин. Дальнейшее разрыхление и гидратация базальных мембран, нарушение целостности эндотелиальных клеток приводят к сужению ранее полнокровных просветов капилляров. Эндотелиоциты постепенно разрушаются, наблюдаются гидратация и очаговый лизис органоидов цитоплазмы, нарушение межклеточных контактов.

После 48 ч гипотермического хранения фрагментов плаценты микроскопическая картина указывает на резко выраженные деструктивные изменения: отслоение синцитиального слоя стромальных ворсин с разрушением ядер, а также отрыв узелков роста от стромы терминальных ворсин. Обнаруживается очаговая деструкция ворсин хориона. Происходит локальный лизис соединительной ткани стромы с образованием крупных полостей. Часто встречаются капилляры со слабо выраженным просветом (рис. 6).

Электронно-микроскопический анализ ультраструктуры фрагментов деконсервированной плаценты данного срока гипотермического хранения свидетельствует о развитии изменений деструктивного характера, особенно касающихся синцитиотрофобласта и капиллярного русла терминальных ворсин хориона. Так, щеточная каемка на поверхности синцития отсутствует (рис. 7). Ядра синцития приобретают неправильную форму, значительно конденсируется их хроматин и существенно расширяется перинуклеарное пространство. Ядерные скопления в узелках пролиферации образуют сплошные конгломераты неоформленной массы гетерохроматина, сопровождающиеся разрушением



**Рис. 7.** Ультраструктура ядер синцитиотрофобласта после 48 ч гипотермического хранения фрагментов деконсервированной плаценты.

**Fig. 7.** Ultrastructure of syncytiotrophoblast nuclei after 48 hrs' hypothermic storage of frozen-thawed placenta fragments.

unshaped heterochromatin mass, accompanying by karyolemma. Further loosening of basal membrane leads to the separation of syncytial layer from villi surface. Villi stroma connective tissue is hydrated, loosened, with forming large electron transparent cavities. Chorion villi capillary structure is quite changed. Lysis and desquamation of endothelium, basal layer loosening result to disappearance of capillary lumens.

### Conclusions

Morphological analysis of placenta fragments has shown that villous chorion during first 12 hrs of hypothermic storage after freeze-thawing mainly

кариолеммы. Дальнейшее разрыхление базальной мембраны приводит к отрыву синцитиального слоя от поверхности ворсин. Соединительная ткань стромы ворсин гидратируется, разрыхляется, образуя крупные электронно-прозрачные полости. Структура капилляров ворсин хориона существенно изменяется. Лизис и десквамация эндотелия, разрыхление базального слоя приводят к исчезновению просветов капилляров.

### Выводы

Морфологический анализ фрагментов плаценты показал, что ворсинчатый хорион в первые 12 ч гипотермического хранения после деконсервации в основном сохраняет свои особенности. Незначительные изменения его структуры свидетельствуют о механических повреждениях, связанных с процессом низкотемпературной консервации. Гипотермическое хранение фрагментов плаценты до 24 ч не приносит существенных изменений в архитектуру ткани терминальных ворсин. В то же время пролонгирование хранения до 48 ч сопровождается значительными перестройками в ткани плаценты деструктивного характера.

### Литература

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н.С. Пушкаря, А.М. Белоуса – Киев: Наук. думка, 1981. – 606 с.
2. *Грищенко В.И., Юрченко Т.Н.* Новые криобиологические технологии получения клеточных и тканевых фетоплацентарных трансплантатов и их использование в медицине // *Трансплантологія*. – 2004. – Т.7, №3. – С. 123-129.
3. *Юрченко Т.М., Строна В.І., Прокопюк О.С. та ін.* Обґрунтування використання тканин фетоплацентарного комплексу в лікувальній практиці // *Трансплантологія*. – 2003. – Т.4, №1. – С. 202-204.
4. *Юрченко Т.Н., Строна В.И., Говоруха Т.П. и др.* Биологически активные вещества в криоконсервированном и лиофилизированном экстрактах плаценты / Тез. докл. научно-практ. конф. "Актуальные вопросы тканевой терапии и перспективы применения естественных биологически активных веществ в современной медицине" – Одесса, 2003. – С. 41-42.
5. *Пат. України № 30808А.* Спосіб консервування тканин фетоплацентарного комплексу / В.І. Грищенко, Т.М. Юрченко, О.С. Прокопюк та ін. – Заявлено 05.06.98. Опубл. 15.12.2000. – Бюл. №7. – С. 11.

*Поступила 11.01.2005*

preserves its peculiarities. Insignificant changes of its structure testify to mechanical impairments related to the process of low-temperature preservation. Hypothermic storage of placenta fragments up to 24 hrs does not result in profound changes in architecture of terminal villi structure. At the same time prolonged storage up to 48 hrs is accompanied by considerable rearrangements of destructive character in placenta tissue.

### References

1. *Actual problems of cryobiology* / Ed. by N.S. Pushkar, A.M. Belous. – Kiev: Naukova dumka, 1981. – 606 p.
2. *Grischenko V.I., Yurchenko T.N.* New cryobiological technologies of cells and tissues fetoplacental transplants procurement and their usage in medicine // *Transplantologiya*. – 2004. – Vol. 7, N3. – P. 123-129.
3. *Yurchenko T.N., Strona V.I., Prokopyuk O.S. et al.* Substantiation of usage of fetoplacental complex tissue in treatment practice // *Transplantologiya*. – 2003. – Vol. 4, N1. – P. 202-204.
4. *Yurchenko T.N., Strona V.I., Govorukha T.P. et al.* Biologically active substances in cryopreserved and frozen-dried placenta extracts // *Proceedings of Scientific and practical conference "Actual questions of tissue therapy and perspectives of applications of natural biologically active substances in modern medicine"*. – Odessa, 2003. – P. 41-42.
5. *Patent of Ukraine N30808.* Method of cryopreservation of fetoplacental complex tissues / V.I. Grischenko, T.M. Yurchenko, O.S. Prokopyuk et al. – Filed 05.06.98, Pub. 15.12.2000. – Bull. N7. – P. 11.

*Accepted in 11.01.2005*