

УДК 618.36–092.9:615.361:618.46]:57.086.13-089.6

И.Ю. Кузьмина*, О.А. Кузьмина, Г.И. Губина-Вакулик, И.В. Добрунова

Состояние плацент беременных крыс после имплантации криоконсервированных фрагментов аллогенной плаценты

UDC 618.36–092.9:615.361:618.46]:57.086.13-089.6

I.Yu. Kuzmina*, O.A. Kuzmina, G.I. Gubina-Vakulik, I.V. Dobrunova

State of Placentas in Pregnant Rats After Implantation of Cryopreserved Allogenic Placental Fragments

Ключевые слова: криоконсервирование, плацента, имплантация, беременность, крысы.

Ключові слова: криоконсервування, плацента, імплантація, вагітність, щури.

Key words: cryopreservation, placenta, implantation, pregnancy, rats.

Благодаря достижениям криобиологии и криомедицины арсенал лечебных средств регенеративной медицины пополнился криоконсервированными биопрепаратами плацентарного происхождения, созданы их запасы, верифицирована биобезопасность [1, 3]. Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований показали позитивный терапевтический эффект введения плацентарных препаратов на восстановление пораженных или патологически измененных органов и тканей [4, 6, 7, 9, 11]. Однако влияние имплантации фрагментов аллогенной плаценты на состояние плаценты реципиента во время беременности, как на наиболее динамично развивающуюся биоструктуру, изучено недостаточно и представляет особый научно-практический интерес. Препараты плаценты широко используются в регенеративной медицине, однако в последнее время в Европе и США усиливаются акты, регулирующие их применение [10]. В связи с вышеизложенным являются актуальными дополнительные исследования по влиянию имплантации фрагментов плаценты на здоровые органы.

С этой целью были исследованы морфологические изменения плаценты при физиологической беременности у крыс на фоне имплантации криоконсервированных фрагментов аллогенной плаценты (КФП).

Работу выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными VI Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2016) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных живот-

Progress in cryobiological and cryomedical investigations allowed to supplement medicinal products used for regenerative medicine with cryopreserved biological products of placental origin, to establish the collections and low temperature banks of the samples with verified biosafety [2, 4]. Numerous experimental and clinical studies have shown a positive therapeutic effect of the introduced placental products on restoration of both either affected or pathologically altered organs and tissues [1, 6, 7, 9, 11]. However, the effect of implantation of allogenic placenta fragments on the recipient's placenta during pregnancy as the most dynamically developing biological structure has been poorly studied and is of special scientific and practical interest. Placental preparations are widely used in regenerative medicine, however recently in Europe and the USA the regulatory acts of their application have been strengthened [10]. Due to the above-mentioned additional studies on the effect of placental fragments on healthy organs are quite relevant.

With this aim we have studied the morphological changes in the rat placenta during physiological pregnancy after implantation of cryopreserved placental fragments (CPF).

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2016) and statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The research was performed in pregnant female white outbred rats ($n = 30$). The animals of the main group

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

*Автор, которому необходимо отправлять корреспонденцию:
просп. Науки, 4, г. Харьков, Украина 61022;
тел.: (+38 057) 705-07-11
электронная почта: irina.u.kuzmina@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
4, Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine 61022;
tel.: +380 57 705 0711
e-mail: irina.u.kuzmina@gmail.com

Поступила 21.11.2016

Принята в печать 19.12.2016

Received November, 21, 2016

Accepted December, 19, 2016

© 2017 I.Yu. Kuzmina et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Эксперимент проводили на беременных самках белых беспородных крыс ($n = 30$). Животным основной группы ($n = 20$) в сроке одной недели гестации (оплодотворение определяли по наличию сперматозоидов во влажалищном мазке) под кожу в области спины имплантировали КФП. Биоматериал получали в асептических условиях у беременных крыс той же популяции в конце срока беременности, затем его фрагментировали и криоконсервировали по разработанной ранее программе [5]. Контрольную группу составили 10 интактных беременных крыс.

На 7- и 14-е сутки после введения КФП животных выводили из эксперимента и извлекали имплантат. Было исследовано 20 участков имплантации КФП, 20 образцов плацент крыс основной группы (с имплантацией КФП) и 10 образцов плацент крыс контрольной группы (без имплантации КФП).

Для морфологического исследования фрагментов плаценты (имплантированных под кожу и извлеченных из матки) использовали оптический микроскоп «Axiostar Plus» («Carl Zeiss», Германия). Препараты изучали после заливки в парафин и окраски гематоксилином и эозином по Эйнарсону на нуклеиновые кислоты и постановки ШИК-реакции [2].

Результаты морфологических исследований показали, что имплантированный материал был подвержен лизису. Через 7 суток после имплантации в кусочке подсаженного КФП микроскопическим методом обнаруживали сегментоядерную инфильтрацию и фрагменты ядер, свидетельствующие о кариорексисе. Через 14 суток лабиринтная часть КФП имела вид эозинофильного конгломерата. В губчатой (материнской) части обнаруживали сохраненные пласты децидуальных и трофобластных клеток, синцитотрофобласта, несмотря на наличие лейкоцитарной сегментоядерной инфильтрации в строме. Ядра трофобласта КФП имели крупный размер (8–20 мкм), овальную форму с диффузно расположенным мелкодисперсным хроматином. Цитоплазма эозинофильная с незначительной порозностью. При окрашивании образцов по Эйнарсону на нуклеиновые кислоты в ядрах клеток выявлялась ДНК, а в цитоплазме – небольшое количество РНК.

Ткань плаценты крыс-реципиентов при доношенной беременности имела лабиринтное гемохориальное строение, свойственное грызунам. В плодовой части на гистологическом срезе она имела соответствующий мелкоячеистый вид. Определялись широкие плодовые капилляры. Ядра эндотелиоцитов имели овальную форму, строма балок – многоклеточную структуру (гистиоциты).

($n = 20$) got the CPF under the skin in the back area after the first week of gestation (fertilization was determined by the presence of spermatozoa in vaginal smear). The biological samples were derived under aseptic conditions from pregnant rats of the same population at the end of pregnancy, then fragmented and cryopreserved according to the previously developed protocol [5]. The control group consisted of 10 intact pregnant rats.

At days 7 and 14 after the CPF administration, the animals were sacrificed and the implant was taken out. Twenty sites of CPF implantation, 20 samples of rat placentas of the main group (with implanted CPF) and 10 placental samples of the control rats (without CPF implanted) were examined.

Morphological study was performed in the placental fragments (implanted under the skin and removed from the uterus) using Axiostar Plus optical microscope (Carl Zeiss, Germany). Paraffin embedded specimens were studied after staining with hematoxylin and eosin, Einarsson technique for revealing nucleic acids, and PAS reaction [2].

The results of morphological studies showed that the implanted material was subjected to lysis. Seven days after implantation, we have found in the graft of transplanted CPF an infiltration of segmented neutrophils and presence of nuclei fragments, the indicators of karyorrhexis. After 14 days the labyrinth part of the CPF appeared as an eosinophilic conglomerate. In the spongy (maternal) part, we have observed the preserved layers of decidual and trophoblast cells, syncytiotrophoblast, at the same time there was a segmented neutrophils infiltration in stroma. The nuclei of the CPF trophoblast were large (8–20 microns) and had an oval shape and a diffusely arranged fine-dispersed chromatin. The cytoplasm was eosinophilic and slightly porous. Einarsson staining for nucleic acids allowed to reveal DNA in the nuclei of the cells and a small amount of RNA in cytoplasm.

The placenta tissue of the recipient rats in case of full-term pregnancy had a labyrinth hemochoric structure peculiar to rodents. In histological section of fetal part we saw specific fine mesh pattern. Wide fetal capillaries were found. The nuclei of the endotheliocytes were of oval shape, stroma of the bands had a multicellular structure (mainly of histiocytes).

It was found that after the implantation of CPF to pregnant rats the number of trophoblast cells with a large dark nucleus of irregular shape with the nucleolus was increased in the placenta, whereas in the most placental trophoblast cells of the control animals no nucleoli were present. This fact may indicate a slowed placental tissue aging, the preservation of its



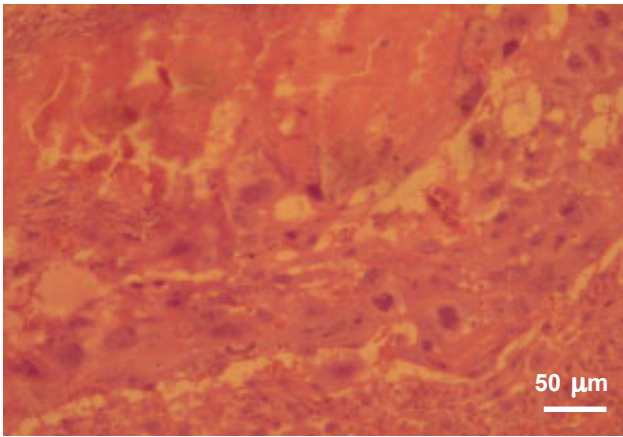


Рис. 1. Слабо представленный клеточный элемент материнской части плаценты у крыс без имплантации КФП. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 1. Poorly presented cell element of maternal part of placenta of rats with implanted CPF. Hematoxylin-eosin staining.

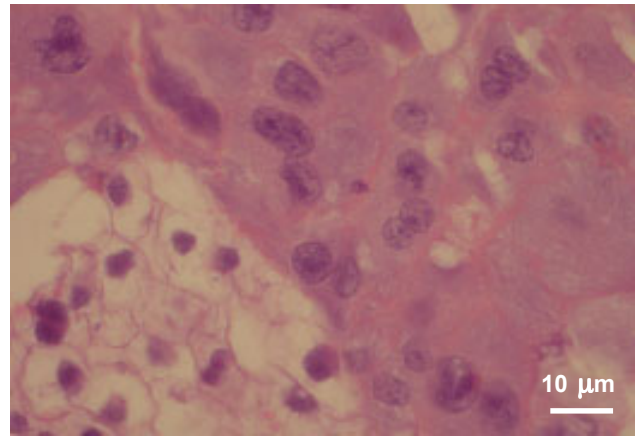


Рис. 2. Хорошо сохранившиеся клетки материнской части плаценты у животных с имплантацией КФП. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 2. Well preserved cells of maternal part of placenta of animals with implanted CPF. Hematoxylin-eosin staining.

Установлено, что после имплантации КФП в плаценте беременных крыс увеличивалось количество трофобластных клеток, имеющих крупное темное ядро неправильной формы с ядрышком, тогда как в клетках трофобласта плацент животных контрольной группы в большинстве случаев ядрышко отсутствовало. Этот факт может свидетельствовать о замедлении старения плацентарной ткани, сохранении ее гормональных и других функций. Кроме того, после имплантации КФП в плодовой части плаценты и просвете лабиринта резко уменьшались количество и объем очагов фибриноида, что может служить доказательством уменьшения повреждений и замедлении старения синцитиотрофобластной выстилки балок лабиринтной части плаценты. Трофобласт губчатой части в основном сохранялся, при этом, если у животных без имплантации КФП ядра трофобласта чаще имели вытянутую форму и интенсивную гиперхромную окраску (рис. 1), то после имплантации КФП размер ядер увеличивался, более четко просматривались ядрышки с мелкодисперсным хроматином и определялось небольшое количество двуядерных трофобластных клеток (рис. 2). Выявлялись также клетки неправильной формы с темными круглыми ядрами и крупными оптически прозрачными вакуолями в цитоплазме. Цитоплазма трофобластных клеток плацент основной группы животных под действием ультрафиолетовых лучей имела выраженное бело-желтое свечение, которое свидетельствовало о значительном содержании РНК, характерном для активных синтетических процессов. Свечение в клетках трофобласта плацент животных контрольной группы было менее интенсивным.

hormonal and other functions. In addition, the implantation of CPF resulted in sharp decrease of the number and volume of fibrinoid foci in the fetal part of the placenta and the labyrinth lumen, which could be the evidence of reduced injury and the aging slowing down of the syncytiotrophoblast lining of the labyrinthine part of placenta. The trophoblast of the spongy part was mostly preserved, whereas in the animals without implanted CPF the trophoblast nuclei were more often elongated and had intensive hyperchromic color (Fig. 1). After the implantation of CPF the size of the nuclei increased, nucleoli with finely dispersed chromatin were more clearly visible and a small number of binuclear trophoblast cells was found (Fig. 2). Irregularly shaped cells with dark round nuclei and large optically transparent vacuoles in the cytoplasm were noted. The cytoplasm of trophoblastic cells of placentas in the main group animals had a significant white-yellow fluorescence under the UV excitation, which indicated a significant presence of RNA, characteristic of active synthetic processes. Fluorescence in trophoblast placental cells of the animals in the control group was less intense.

In samples of the placenta of the animals with implanted CPF, the decidual cells that separated from the placenta were large and clearly structured. PAS reaction in the cytoplasm of placental cells of the animals of the main group revealed a higher number of glycogen granules comparing to the cytoplasm of the placental cells of intact animals.

The experiment allowed the comparison of morpho-functional state of own rat placenta and the one of implanted CPF. The changes in recipient's placentas were

В образцах плацент животных с имплантацией КФП децидуальные клетки, отделившиеся вместе с плацентой, были крупными и четко структурированными. При проведении ШИК-реакции в цитоплазме клеток плацент животных основной группы было выявлено большее количество гранул гликогена, чем в цитоплазме клеток плацент интактных животных.

Результаты эксперимента позволили сравнить морфофункциональное состояние собственных плацент крыс и имплантированных КФП. Изменения в плацентах животных-реципиентов отмечались как в ближайшие сроки после имплантации КФП (7-е сутки), так и в более отдаленные (14-е сутки). Полученные данные подтверждают функциональную сохранность имплантата КФП в указанные сроки и характеризуют его воздействие на организм не как одномоментное, а как пролонгированное. Обнаруженные эффекты могут быть объяснены поступлением в организм реципиента комплекса биологически активных соединений из КФП на протяжении всего периода наблюдения. Такое многоплановое, позитивное и продолжительное действие КФП обусловлено поступлением в организм реципиента репродуктивных иммуномодуляторов, гормонов, ростовых и пролиферативных, релизинг- и других регуляторных факторов, содержащихся в плаценте в физиологически сбалансированном соотношении [7, 8].

Следует отметить, что ни в одном из образцов плацент животных, которым во время физиологической беременности были имплантированы КФП, признаки гиперстимуляции, патологической пролиферации или атипические клетки не были обнаружены, что подтверждает биобезопасность данного вида терапии.

Таким образом, имплантация криоконсервированных фрагментов плаценты оказывает положительное влияние на морфофункциональное состояние плаценты крысы при физиологической беременности.

Наши дальнейшие исследования будут направлены на изучение влияния имплантации КФП на систему «мать-плацента-плод» в эксперименте, что может определить перспективу применения данного вида лечения беременных.

Литература

1. Грищенко В.И., Прокопюк О.С., Шепітько В.І. та ін. Використання криоконсервованої плаценти в лікувальній практиці // Трансплантологія. – 2002. – Т. 3, №2. – С. 32–37.
2. Грищенко В.И., Прокопюк О.С., Юрченко Т.Н., Грищенко Н.Г. Фундаментальные и клинические аспекты клеточной терапии // Doctor. – 2004. – № 4. – С. 5–8.

noted both shortly after implantation of CPF (day 7) and in more distant terms (day 14). The obtained data confirm the functional integrity of the CPF graft within the indicated time periods and characterize its effect on the body not as 'one-shot', but as broad one. The observed effects can be explained by the transfer of biologically active compounds from the CPF into the recipient body during the observation period. This versatile, positive and prolonged effect of CPF we could associate with the delivery of the reproductive immune modulators, hormones, growth and proliferative, releasing and other regulatory factors contained in the placenta in a physiologically balanced ratio [7, 8].

It should be noted that none of the placental samples of the animals implanted with CPF during physiological pregnancy showed signs of hyperstimulation, pathological proliferation or atypical cells, that confirmed the biological safety of this type of therapy.

Thus, the implantation of cryopreserved fragments of placenta had a positive effect on morphofunctional state of rat placenta during physiological pregnancy.

Our further studies will be aimed at investigation of the CPF implantation effect on the 'mother-placenta-fetus' system in experiment, that could determine the prospect of using this type of treatment for pregnant women.

References

1. Goltsev A.N., Yurchenko T.N., editors. Placenta: cryopreservation, clinical application. Kharkiv; 2013.
2. Grischenko V.I., Prokopyuk O.S., Shepitko V.I. et al. Use of cryopreserved placenta in therapeutic practice. *Transplantologiya* 2002; 3(2): 32–37.
3. Grischenko V.I., Prokopyuk O.S., Yurchenko T.N., Grischenko N.G. Fundamental and clinical aspects of cell therapy. *Doctor* 2004; (4): 5–8.
4. Korzhevskiy D.E., Gilyarov A.V., Merkulov A.V. Bases of histological technique. St-Petersburg: SpetsLit; 2010.
5. Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S., Musatova I.B. et al. Estimation of preservation of placental explants, cord and fetal membranes after cryopreservation. *Cell and Organ Transplantology* 2015; 3(1): 28–38.
6. Trifonov V.Yu., Prokopyuk V.Yu., Zaychenko A.V. Cryopreserved cord blood serum for reproductive function restoration during antiphospholipid syndrome. *Probl Cryobiol* 2011; 21(1): 75–84.
7. Shevchenko N.O., Somova K.V., Volina V.V. et al. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals. *Morphologia* 2016; 10(2): 93–98.
8. Liu W., Morschauser A., Zhang X. et al. Human placenta-derived adherent cells induce tolerogenic immune responses. *Clin Transl Immunology* 2014; 3(5):14.



3. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В., Меркулов А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
4. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение / Под. ред. А.Н. Гольцева, Т.Н. Юрченко. – Харьков, 2013. – 318 с.
5. Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Мусатова И.Б. и др. Оценка сохранности эксплантов плаценты, пуповины и плодных оболочек после криоконсервирования // Клеточная и органная трансплантология. – 2015. – Т. 3, №1. – С. 28–38.
6. Трифонов В.Ю., Прокопюк В.Ю., Зайченко А.В. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфолипидном синдроме // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 75–84.
7. Шевченко Н.О., Сомова К.В., Воліна В.В. та ін. Динаміка активності та тривалості функціонування криоконсервованих криоекстракту, клітин та фрагментів плаценти у організмі експериментальних тварин // Морфологія. – 2016. – Т. 10, №2. – С. 93–98.
8. Liu W., Morschauser A., Zhang X. et al. Human placenta-derived adherent cells induce tolerogenic immune responses // Clin. Transl. Immunology. – 2014. – Vol. 3, №5. – P. 14.
9. Silini A.R., Cargnoni A., Magatti M. et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine // Biotechnology. – 2015. – Vol. 19, №3. – P. 162.
10. Tiedemann G., Sethe S. Regulatory frameworks for cell and tissue based therapies in Europe and the USA // Regen. Med. – 2010 – P. 937–968.
11. Zheng J. Recent advances in research on the human placenta. Croatia. [Electron resource]: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-research-on-the-human-placenta> (March 07, 2012).

