

Влияние криоконсервирования на сохранность ультраструктуры плаценты

Н.В. РЕПИН, Т.П. ГОВОРУХА, В.И. СТРОНА, Т.Н. ЮРЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation Effect on Placental Ultrastructure Integrity

N.V. REPIN, T.P. GOVORUKHA, V.I. STRONA, T.N. YURCHENKO

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

Исследовали ультраструктуру плаценты после криоконсервирования. Показано, что низкотемпературное консервирование с криопротектором ДМСО обеспечивает лучшую сохранность ультраструктуры клеток плаценты.

Ключевые слова: плацента, криоконсервирование, ультраструктура, ДМСО.

Досліджували ультраструктуру плаценти після криоконсервування. Показано, що низькотемпературне консервування з криопротектором ДМСО забезпечує краще збереження ультраструктури клітин плаценти.

Ключові слова: плацента, криоконсервування, ультраструктура, ДМСО.

Placental ultrastructure was studied after cryopreservation. It has been shown that low temperature preservation with DMSO as cryoprotectant provides better integrity of placenta cells' ultrastructure.

Key-words: placenta, cryopreservation, ultrastructure, DMSO.

Последнее десятилетие характеризуется интенсивным развитием нового направления в медицине – клеточной и тканевой трансплантации – и использованием для этих целей тканей и клеток фетоплацентарного комплекса [1,2]. Ранее проведенные исследования позволили определить, что краткосрочное (до 1-х суток) хранение ткани плаценты при гипотермических температурах (4°C) приводит к незначительным изменениям в структуре клеток. Однако уже после 2-х суток хранения в ее клетках появляются выраженные деструктивные изменения [4].

Использование для консервирования плаценты низких температур (-196°C) существенно ограничивает спектр изменений, происходящих в ней при гипотермии. Вместе с тем цикл замораживания-оттаивания сам оказывает повреждающее действие на структуру ткани и в первую очередь за счет процессов кристаллообразования [5, 7].

Применение криопротекторов позволяет смягчить действие факторов криповреждения, однако привносит дополнительные проблемы, связанные с их токсичностью [3], характером взаимодействия с биологическим объектом до этапа охлаждения [5], оценкой их проникающей способности, т.е. их преимущественной локализации в клетке или внеклеточной среде. Ворсинчатый хорион плаценты является гетерогенной структурой как по плотности собственно ткани, так и по клеточному составу. Предполагается, что клетки, различаю-

Last decade is characterised with an intensive development of new direction in medicine: cell and tissue transplantation, as well as usage for these aims of tissues and cells of fetoplacental complex [1, 2]. Previously conducted studies allowed to determine that short-term (up to 24 hrs) storage of placenta tissue under hypothermic temperatures (4°C) results in slight changes in the cell structure. However even after 48 hrs' storage in its cells marked destructive changes appeared [4]. Usage of low temperatures (-196°C) for placenta cryopreservation significantly limits the spectrum of changes, occurring in it after hypothermia. Moreover freeze-thawing cycle itself causes damaging effect on tissue structure and primarily due to the processes of crystal formation [5, 7].

Application of cryoprotectants allows to make milder the effect of cryodamage factors, but introduces additional problems related to their toxicity [3], the character of interaction with biological objects before cooling stage [5], the estimation of their penetration ability, *i.e.* their predominant localization in a cell or extracellular medium. Placenta villous chorion is heterogenous structure both on density of the tissue itself and cellular composition. It is supposed that the cells differing on their physiological status and permeability of their membranes for water will survive low temperature effect in a different way.

The aim of this work was studying the placental ultrastructure after low temperature preservation under DMSO protection.

Адрес для корреспонденции: Репин Н.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-42-85, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Repin N.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 4285, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

щиеся своим физиологическим статусом и проницаемостью их мембраны для воды, будут по-разному переносить низкотемпературное воздействие.

Целью настоящей работы явилось изучение ультраструктуры плаценты после низкотемпературного консервирования под защитой ДМСО.

Материалы и методы

Объект исследования – фрагменты плаценты, полученные после операции кесарево сечение у здоровых женщин с нормально протекающей беременностью и криоконсервированные по технологии, разработанной в ИПКиК НАН Украины [6]. Для замораживания использовали фрагменты плаценты как инкубированные в течение 20 мин в 8%-м растворе ДМСО, так и без криопротектора. Замороженные образцы отогревали на водяной бане при температуре 40°C.

Подготовка образцов к электронно-микроскопическому исследованию проводилась аналогично работе [4].

Результаты и обсуждение

После низкотемпературного консервирования плаценты без криопротектора наблюдается ряд существенных ультраструктурных изменений ворсинчатого хориона. На поверхности синцитиотрофобласта обнаруживаются участки, лишенные синцитиальных выростов, а также отслоение микроворсинок от поверхности синцития (рис. 1). Ядра эпителия ворсин имеют изрезанные контуры, неравномерно расширенное перинуклеарное пространство и плотный, конденсированный хроматин, располагающийся по всему их объему. Большинство митохондрий синцития с просветленным матриксом и выраженной деструкцией крист. В значительной степени изменениям подвергается эндоплазматическая сеть (ЭПС), которая состоит из расширенных цистерн и вакуолей (рис. 2). Нарушается упорядоченность расположения рибосом на ее мембранах. Внутренний сетчатый аппарат вакуолизирован. Цитоплазма синцития содержит много замкнутых везикул, свободных рибосом и гранул различной электронной плотности. По сравнению с синцитиотрофобластом изменения ультраструктуры цитотрофобласта менее выражены, хотя и в этих клетках встречаются митохондрии с просветленным матриксом, разупорядоченной структурой крист и набухшие цистерны ЭПС.

Базальная мембрана, отделяющая эпителий от стромы ворсин, практически на всем протяжении неравномерно расширена и разрыхлена. Для данного режима замораживания характерно частичное отслоение эпителиального пласта от стромы (рис.3). Наблюдается разрыхление межклеточного

Materials and methods

Research objects are placenta fragments obtained after operation of Caesarian section in healthy women with normally proceeding pregnancy and cryopreserved according to the technique, developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [6]. For freezing we used the fragments of placenta both incubated for 20 min in 8% DMSO solution and without cryoprotectant. Frozen samples were thawed on water bath at 40°C.

The preparing of samples for electrone-microscopic investigation was performed similar to the described protocol [4].

Results and discussion

After low temperature preservation of placenta without cryoprotectant there is observed the series of considerable ultrastructural changes of villous chorion. On the surface of syncytiotrophoblast there were found the sites deprived of syncytial outgrowings as well as exfoliation of microvilli from the surface of syncytium (Fig. 1). Nuclei of villi epithelium have jagged contours, unevenly widen perinuclear space and dense, condensed chromatin, located along their volume. The major part of syncytium mitochondria with enlightened matrix and expressed destruction of crystals. In a considerable extent to the changes endoplasmatic reticulum (ER), consisting of extended cisterns and vacuoles is subjected to the changes (Fig. 2). There is disorder of ribosomes localization on its membranes. Internal reticular apparatus is vacuolized. Cytoplasm syncytium contains a lot of closed vesicles, free ribosomes and granules of various electrone density. In comparison with syncytiotrophoblast the changes

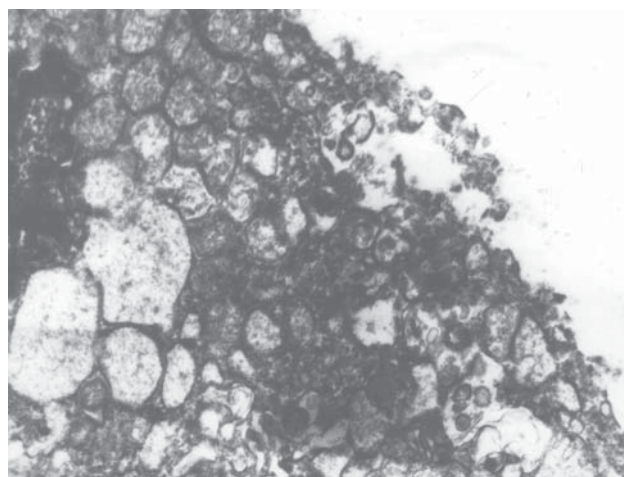


Рис. 1. Участок отслоения микроворсинок от поверхности синцитиотрофобласта после замораживания без ДМСО, $\times 25100$.

Fig. 1. Site of microvilli exfoliation from a surface of syncytiotrophoblast after freezing without DMSO, $\times 25100$.

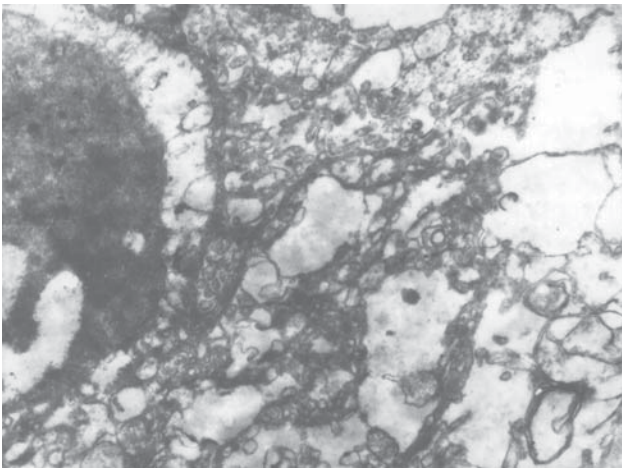


Рис.2. Ультраструктура цитоплазмы синцитиотрофобласта после замораживания без ДМСО, $\times 16300$

Fig. 2. Ultrastructure of syncytiotrophoblast cytoplasm after freezing without DMSO, $\times 16300$.

вещества стромы с образованием больших, вакуолеобразных, без внутреннего содержимого, полостей. В то же время элементы стромы менее подвержены структурным изменениям.

Таким образом, отмеченные после отогрева в структуре ткани плаценты морфологические изменения в виде ее разрыхления и образования полостей, лишенных внутреннего содержимого, являются прямым свидетельством образования внутриканальных и внутриклеточных кристаллов льда. Это подтверждает и значительное снижение доли гемоглобина в эритроцитах, расположенных в просветах капилляров. Однако клетки различных слоев ткани по-разному реагируют на низкотемпературное воздействие.

При низкотемпературном консервировании плаценты с ДМСО поверхность синцитиотрофобласта содержит микроворсинки различной длины и электронной плотности. Реже наблюдаются участки без ворсин. Ядра синцития гетерогенны по степени сохранности своей структуры. В цитоплазме синцития преобладают хорошо сохранившиеся митохондрии овальной или округлой формы с матриксом средней электронной плотности и четкими кристами (рис. 4). Элементы зернистой ЭПС представлены в виде расширенных цистерн с относительно равномерным распределением рибосомы. Внутренний сетчатый аппарат (комплекс Гольджи) состоит из гладкостенных цистерн, окруженных пузырьками. В меньшей степени и меньших размеров наблюдаются участки десквамации эпителия. В ядрах цитотрофобластов доминируют преимущественно эухроматин и узкое равномерной ширины перинуклеарное пространство. Их цитоплазма содержит немногочисленные расширенные каналцы ЭПС и митохондрии с

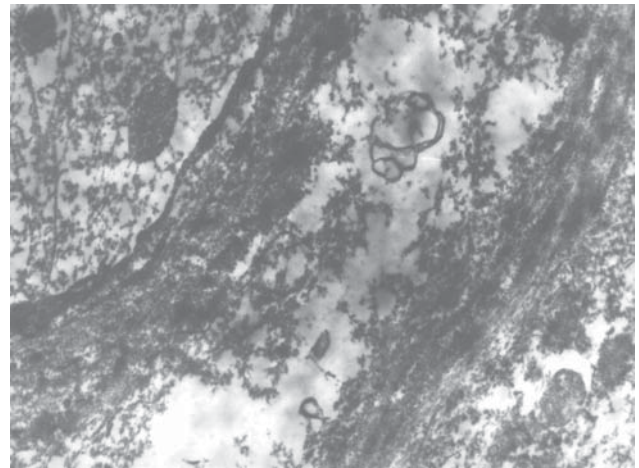


Рис.3. Участок отслоения эпителиального пласта от стромы после замораживания без ДМСО, $\times 14600$.

Fig. 3. Site of epithelial layer exfoliation from stroma after freezing with DMSO, $\times 14600$.

of cytotrophoblast ultrastructure are less manifested, although in these cells there are found mitochondria with enlightened matrix, disordered structure of crystals and swollen ER cisterns.

Basal membranes separating epithelium from villi stroma is practically along the whole length widen and loosen. For this freezing regimen is characteristic partial exfoliation of epithelial layer from stroma (Fig. 3). There is observed loosening of intercellular substance of stroma with the formation of large, vacuole-like, inner content-free cavities. At the same time the stroma elements are less subjected to structural changes.

Noted after thawing in placenta tissue structure morphological changes as its loosening and formation of cavities deprived of inner contents, are direct evidence of the formation of intratissue and intracellular ice crystals. This confirms also considerable decrease of hemoglobin share in erythrocytes located in lumen of capillaries. However the cells of different layers response to low temperature effect in a different way.

At low temperature preservation of placenta with DMSO the surface of syncytiotrophoblast contains microvilli of various length and electrone density. More seldom there are observed the sites with no villi. Syncytia nuclei are heterogenous on the degree of integrity of their structure. In syncytium cytoplasm well preserved mitochondria of oval or roundish shape with the matrix of average electrone density and distinct crystals predominate (Fig. 4). Elements of granular ER are presented as widen cisterns with quite an even distribution of ribosomes. Internal reticular apparatus comprises smooth-wall cisterns, surrounded by vesicles. There are observed the sites of epithelium desquamation in less extent and of less sizes. In nuclei of cytotrophoblasts predominate mainly euchromatin and narrow perinucleaer space of uniform width. Their

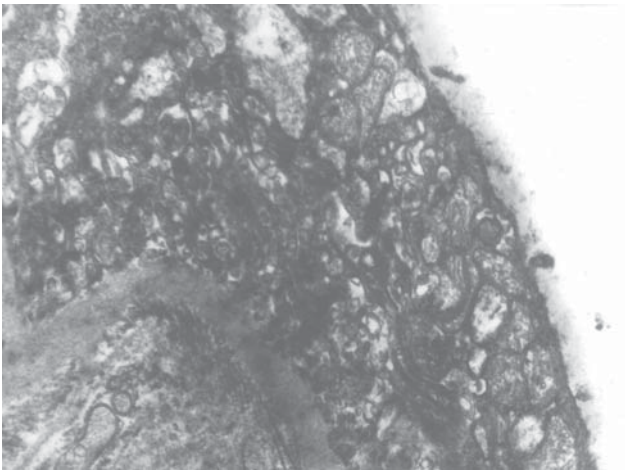


Рис. 4. Ультраструктура цитоплазмы синцитиотрофобласта после замораживания с ДМСО, $\times 24300$.

Fig. 4. Ultrastructure of syncytiotrophoblast cytoplasm after freezing with DMSO, $\times 24300$.

просветленным матриксом. Базальная мембрана имеет относительно равномерную ширину и более однородную плотность (рис. 4). Иногда наблюдаются участки разрыхления межклеточного вещества стромы (рис. 5). Эндотелиальные клетки, в основном, сохраняют свои ультраструктурные характеристики. Их небольшие ядра слегка вытянуты вдоль базальной мембраны, а немногочисленные митохондрии апикальной части цитоплазмы имеют плотный матрикс и короткие кристы. Однако и в этих условиях нередко можно наблюдать отслоение эндотелиальных клеток от прилегающих к сосудам участков.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования позволяют сказать, что низкотемпературное консервирование без защиты ДМСО приводит к существенным изменениям в структуре ткани плаценты, наблюдаемым в виде общего ее разрыхления, отслоения эпителия. Эти изменения на ультраструктурном уровне наиболее выражены в поверхностном слое ворсинчатого хориона – синцитиотрофобласте. Они проявляются в виде увеличения доли гетерохроматина, деструкции мембран ЭПС, митохондрий, внутреннего сетчатого аппарата. Морфологическим нарушениям подвержены все структуры ткани: цитотрофобласты, базальная мембрана и эндотелий сосудов, а также межклеточное вещество.

В то же время при низкотемпературном консервировании плаценты с ДМСО отмечаются менее выраженные ультраструктурные изменения клеток, т.е. проникающий криопротектор ДМСО оказывает защитный эффект и обеспечивает лучшую сохранность ультраструктуры клеток

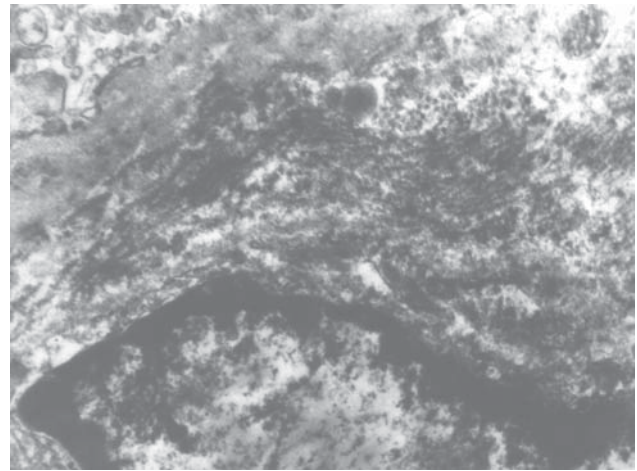


Рис. 5. Разрыхление межклеточного вещества стромы после замораживания с ДМСО, $\times 26300$.

Fig. 5. Loosening of intercellular substance of stroma after freezing with DMSO, $\times 26300$.

cytoplasm comprises non-numerous widen canaliculi of ER and mitochondria with enlightened matrix. Basal membrane has relatively even width and more uniform density (Fig. 4). Sometimes the sites of loosening of intercellular substance are observed (Fig. 5). Endothelial cells mainly preserve their ultrastructural characteristics. Their small nuclei are slightly elongated along basal membrane and not numerous mitochondria of apical part of cytoplasm have a dense matrix and short crystals. However even under these conditions sometimes one can observe the exfoliation of endothelial cells from adjacent to vessels sites.

Conclusions

Thus performed studies allow to conclude that low temperature preservation without DMSO protection results in significant changes in the structure of placenta tissue, observed as its general loosening, epithelium exfoliation. These changes at ultrastructural level are the most manifested in surface layer of villous chorion, syncytiotrophoblast. They are manifested as an increase in the share of heterochromatin, destruction of membranes of endoplasmatic net, mitochondria, internal reticular apparatus. All tissue structures are subjected to morphological impairments: cytotrophoblasts, basal membrane and endothelium of vessels as well as intercellular substance.

At the same time under low temperature preservation of placenta with DMSO there are noted manifested ultrastructural changes of cells, *i.e.* penetrating cryoprotectant DMSO renders a protective effect and provides higher integrity of placenta cell ultrastructure. However that fact that in DMSO presence we observe morphological changes as a partial loosening of structure, formation of small, content-deprived cavities, testify to crystallization processes in tissue

плаценты. Однако тот факт, что и в присутствии ДМСО мы наблюдаем морфологические изменения в виде частичного разрушения структуры, образования небольших, лишенных содержимого полостей, свидетельствует о кристаллизационных процессах в ткани при замораживании. Это может быть связано как с малой концентрацией криопротектора, так и с не полным его проникновением в структуру ткани за время эквilibрации.

Литература

1. Грищенко В.И. Роль криобиологии в создании клеточной и тканевой трансплантации // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 7-8.
2. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С. 54-58.
3. Копейка Ю.Е., Грищенко В.И., Копейка Е.Ф. и др. Влияние ДМСО и продуктов его распада на сперматозоиды и выживаемость эмбрионов вьюнов *Misgurnus fossilis* L // Пробл. криобиологии.– 2003.– №2.– С. 45-56.
4. Репин Н.В., Цупиков О.М., Говоруха Т.П., Юрченко Т.Н. Влияние длительности хранения ткани плаценты при 4°C на ультраструктуру ворсинчатого хориона // Пробл. криобиологии.– 2002.– №4.– С. 80-85.
5. Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А. и др. Влияние криопротекторов на биологические системы.– Киев: Наук. думка, 1989.– 240 с.
6. Пат. України № 30808 А01N1/02. Спосіб консервування тканин фетоплацентарного комплексу // В.И. Грищенко, Т.М. Юрченко, О.С. Прокопюк, В.І. Строна, В.П. Козлова, В.Ю. Прокопюк.– Заявлено 05.06.98; Опубл. 15.12.2000, Бюл. № 7.– С.11.
7. Day S.H., Nicoll D.A., Silve J.M. Cryopreservation of rat and human liver slices by rapid freezing // Cryobiology.– 1999.– Vol.38, N2.– P. 154-159.

Поступила 17.05.2004

during freezing. This may be related to both low concentrations of cryoprotectant and its incomplete penetration into tissue structure during incubation time.

References

1. *Grischenko V.I.* The role of Cryobiology in Creation of Biotechnologies for Cellular and Tissue Transplantation // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 7-8.
2. *Grischenko V.I., Goltsev A.N.* Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P. 54-58.
3. *Kopeika Yu.E., Grischenko V.I., Kopeika E.F. et al.* Effect of DMSO and its decay products on spermatozoa and survival of loach *Misgurnus fossilis* L. // Problems of Cryobiology.– 2002.– N4.– P. 45-57.
4. *Repin N.V., Tsupikov O.M., Govorukha T.P., Yurchenko T.N.* Effect of placenta tissue storage term under 4°C on chorion villi ultrastructure// Problems of Cryobiology.– 2002. – N4. – P. 80-87.
5. *Yurchenko T.N., Kozlova V.F., Skorniyakov B.A. et al.* Effect of cryoprotectants on biological systems.– Kiev: Naukova dumka, 1989.– 240 p.
6. *Patent of Ukraine N 30808 A01N1/02.* The way of cryopreservation of fetoplacental tissue complex // V.I. Grischenko, T.M. Yurchenko, O.S. Prokopyuk, V.I. Strona, V.P. Kozlova, V.Yu. Prokopyuk.– Filed on 05.06.98; Publ. 15.12.2000, Bul. N 7.– P. 11.
7. *Day S.H., Nicoll D.A., Silve J.M.* Cryopreservation of rat and human liver slices by rapid freezing // Cryobiology.– 1999.– Vol.38, N2.– P. 154-159.

Accepted in 17.05.2004