

Влияние препаратов плаценты на морфофункциональное состояние органов и тканей старых крыс

Effect of Placental Preparations on Morphofunctional State of Organs and Tissues of Aged Rats

Исследовано влияние препаратов плаценты: криоконсервированного экстракта плаценты (КЭПл) и фрагмента человеческой плаценты на органы крыс, которые в первую очередь подвержены возрастным изменениям (надпочечники, яичники и костная ткань). Показано, что при введении КЭПл старым животным, как и при подсадке им фрагмента плаценты, наблюдается эффект “омоложения”, проявляющийся в улучшении морфофункционального состояния паренхиматозных органов.

Ключевые слова: старение, препараты плаценты, морфологические исследования.

Досліджено вплив препаратів плаценти: криоконсервованого екстракту плаценти (КЕПл) і фрагмента людської плаценти на органи пацюків, що у першу чергу піддаються віковим змінам (надниркові залізи, яєчники та кісткова тканина). Показано, що при введенні КЕПл старим тваринам, як і при підсадженні їм фрагмента плаценти, спостерігається ефект “омолодження”, що виявляється в поліпшенні морфофункціонального стану паренхіматозних органів.

Ключові слова: старіння, препарати плаценти, морфологічні дослідження.

The effect of placenta preparations: cryopreserved placenta extract (CPE) and fragment of human placenta on the organs of rats which are primarily subjected to age changes (adrenal glands, ovaries and bone tissue) is under study. It has been shown that during CPE injection to aged animals as well as during implantation to them of placental fragment there is observed the “rejuvenation” effect manifesting in the improvement of morphofunctional state of parenchymatous organs.

Key-words: ageing, placenta preparations, morphological studies.

Экспериментальные исследования на животных доказали возможность существенного увеличения не только средней, но и максимальной продолжительности жизни в результате применения геропротекторных средств, к которым относятся антиоксиданты, витамины, энтеросорбенты, иммуномодуляторы и гормоны [1]. Под действием этих веществ происходят ускорение обменных процессов, усиление адаптационных механизмов [5].

Среди геропротекторов особое место занимают плацентарные препараты, богатые плацентарными протеинами, ростовыми факторами, иммуномодуляторами, ферментами, микроэлементами, аминокислотами, витаминами, гормонами и др. [3].

Старение организма, в частности климактерические расстройства, связано со сложной возрастной перестройкой, в первую очередь нейрогуморальной регуляции, и угасанием репродуктивной функции. Особенностью климактерия является то, что в этот период развиваются возрастные и патологические изменения не только в репродуктивной системе организма, но и во многих других органах и тканях [4].

Experiments in animals have proved the possibility of significant extending of not only average but also maximum life duration as a result of application of geroprotective means, comprising antioxidants, vitamins, enterosorbents, immune modulators and hormones [1]. Under the effect of these agents there is an acceleration of exchange processes, strengthening of adaptation mechanisms [5].

Among geroprotectants a special place is taken by placental preparations rich with its proteins, growth factors, immune modulators, enzymes, microelements, aminoacids, vitamins, hormones etc. [3].

Organism ageing, in particular climacteric disorders are related to a complicated age re-arrangement first of all neurohumoral regulation and reproductive function fading away. Climacterium peculiarity is the development of age and pathological changes in not only reproductive system of an organism, but also in many other organs and tissues within this period [4].

The research aim was morphological study of the effect of placental preparations on rat's organs and tissues, which primarily are subjected to age alterations (adrenal glands, ova and bone tissue).

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Цель работы – морфологическое изучение влияния препаратов плаценты на органы и ткани крыс, которые в первую очередь подвергаются возрастным изменениям (надпочечники, яичники и костная ткань).

Материалы и методы

Работа выполнена на 28 старых (более 2-х лет) самках крыс линии Аугуста массой 180-200 г и 7 молодых (до 1 года) крысах массой 150-180 г.

Животные были разделены на 5 экспериментальных групп: I группа – интактные старые животные – служила контролем; II группа – старые крысы, которым в течение 5 дней 1 раз в сутки внутримышечно вводили криоконсервированный экстракт плаценты (КЭПл) человека из расчета 0,1 мл на 100 г массы животного [8]; III группа – старые животные, которым под местной новокаиновой анестезией подкожно вводили фрагмент человеческой плаценты в области бедра; IV группа – животные, которым под эфирным наркозом была произведена лапаротомия с двухсторонней аднексэктомией. Через 21 сутки после кастрации животным, как и крысам II группы, вводили КЭПл по аналогичной методике; V группа – молодые интактные животные.

Перед началом эксперимента ежедневно в течение недели у всех групп животных для контроля эстрального цикла брали из влагалища мазки с последующим нанесением их на стекло и окраской метиленовой синью. У крыс первых четырех групп фаза эструса отсутствовала. Операцию аднексэктомии все крысы перенесли хорошо.

После эксперимента у животных всех групп в течение недели брали вагинальные мазки. Через 4 недели после опыта животных декапитацией выводили из эксперимента.

Взятые на исследование участки органов фиксировали в 10%-м нейтральном формалине с последующей заливкой в парафин. Для изучения костной ткани выделяли бедренную кость со стороны подсадки плаценты. С целью удаления минеральных компонентов после фиксации в 10%-м формалине ее помещали в декальцинирующий раствор ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). После декальцинирования исследуемый образец кости подвергали обезвоживанию в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Срезы из парафиновых блоков толщиной 6-8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином для получения обзорных гистологических препаратов [2].

Вся работа с животными проводилась в соответствии с положениями IV Европейской Конвенции (ETS 123, 1986) по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и

Materials and methods

The research was performed in 28 aged (older than 2 years) Augusta female rats of 180-200g weight and 7 young (under a year) rats of 150-180g.

The animals were divided into 5 experimental groups: 1st group comprised intact aged animals and served as the control; 2nd group made aged rats which were for 5 days once a day intramuscularly injected with cryopreserved placenta extract (CPE), human one, in respect of 0.1 ml per 100 g of animal's mass [8]; 3rd group was aged animals which were intramuscularly injected with human placenta fragment into hip area under local novocaine anaesthesia; 4th group made the animals which were under ether narcosis subjected to laparotomy with two-side adnexectomy. In 21 days after castration these animals as well as the rats from the 2nd group were injected with CPE by the same methods; 5th group comprised young intact animals.

Prior to the experiment start daily for a week in all groups of animals for the control of estrous cycle the vaginal smears were taken with following placing them on a glass and staining with methylene blue. In rats of the first four groups estrus phase was absent. All the rats survived well an adnexectomy operation.

After experiment in the animals of all groups for a week vaginal smears were taken. In 4 weeks after the experiments the animals were decapitated.

Taken for examination the sites of organs were fixed in 10% neutral formalin with following embedding into paraffin. To investigate bone tissue a femur bone was isolated from a side of placenta implantation. With the aim of removal of mineral components after fixation in 10% formalin it was placed into decalcinated EDTA solution (ethyl diamine tetraacetate). After decalcination the bone sample under study was dehydrated in alcohols of ascending concentrations, enlightened in xylol and embedded into paraffin. The slices of 6-8 μm width from paraffin blocks were stained with haematoxylin and eosin for obtaining of visual histological preparations [2].

All investigations in animals were performed according to the statements of the 4th European Convention (ETS 123, 1986) on protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. The animals were maintained under standard vivarium conditions for 1.5 months. During the experiment the animals' state was visually assessed.

The obtained results were statistically processed using the softwares Microsoft Excel and Statistica.

Results and discussion

Under microscopic investigation of adrenal gland preparations of the 1st group control intact animals there have been found the signs of age alterations. In adrenal glands of aged rats during staining with

других научных целей. Животных содержали в стандартных условиях вивария в течение 1,5 месяцев. Во время эксперимента наблюдали за самочувствием животных визуально.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета компьютерных программ Microsoft Excel и Statistic.

Результаты и обсуждение

При микроскопическом исследовании препаратов надпочечников контрольных интактных животных I группы обнаруживаются признаки возрастных изменений. В надпочечниках старых крыс при окраске гематоксилином и эозином преобладает базофилия. Наблюдается редукция отчасти клубочковой и, главным образом, сетчатой зоны, что может свидетельствовать об ослаблении продукции андрогенов [7]. В адренокортикоцитах пучковой зоны, очевидно, уменьшаются количество и размеры липосом, за счет чего ткань надпочечников в этой зоне выглядит более плотной. Синусоидные кровеносные капилляры пучковой зоны коры, расположенные между тяжами спонгиоцитов, местами сужены, что нарушает правильный ход тяжей. Соединительно-тканые прослойки между эпителиальными тяжами коркового вещества утолщены. В сосудах и строме обнаруживаются признаки склероза. Синусоиды мозговой части надпочечников несколько расширены и заполнены кровью (рис. 1).

У старых животных II и III групп после введения КЭПл и подсадки фрагмента плаценты признаков возрастных изменений не наблюдалось. В паренхиме надпочечников обнаруживались морфофункционально активные спонгиоциты с вакуолизированной цитоплазмой и множеством пигментных гранул. При окраске гематоксилином

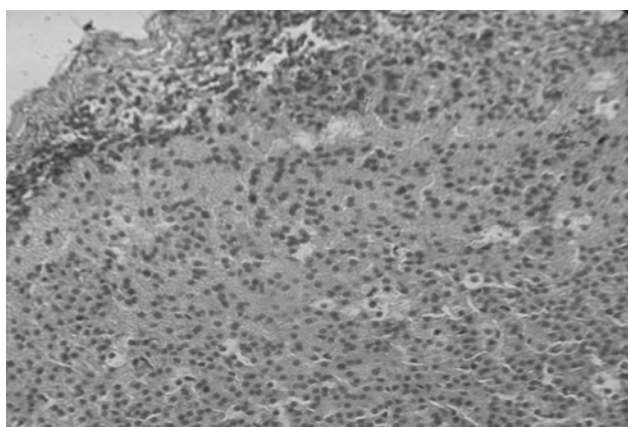


Рис. 1. Надпочечники старых интактных крыс (I группа). Частичная редукция клубочковой зоны. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 240$.

Fig. 1. Adrenal glands of aged intact rats (the 1st group). Partial reduction of glomerular zone. Staining with haematoxylin and eosin, $\times 240$.

haematoxylin and eosin basophilia predominates. The reduction of some part of glomerular and mainly reticular zone was observed, that might testify to weakened production of androgens [7]. In adrenocorticoocytes of fascicular zone the number and sizes of liposomes are evidently reduced due to this fact the adrenal gland tissue looks denser in this zone. Sinusoid blood capillaries of fascicular cortex zone located between the bands of spongiocytes are somewhere narrowed that impairs a correct location of bands. Connective tissue interlayers between epithelial bands of cortex substance are compacted. In vessels and stroma there are found a sclerosis signs. Sinusoids of brain part of adrenal glands are somewhat widened and blood-filled (Fig. 1).

In aged animals of the 2nd and 3rd groups after introduction of CPE and implantation of placenta fragment no signs of age changes were found. In parenchyma of adrenal glands there were observed morphofunctionally active spongiocytes with vacuolated cytoplasm and multiple pigment granules. During staining with haematoxylin and eosin eosinophilia prevailed (Fig. 2). Sinusoids of brain part of adrenal glands providing venous drainage of cortex were strongly widened and blood-filled.

Under microscopic study of adrenal glands of castrated after CPE introduction in their cortex site there were observed parallel bands of large polygonal endocrine cells of fascicular zone, spongiocytes. Between them there are located sinusoid blood capillaries with a widened lumen. As a result of multiple lipid inclusions cytoplasm of spongiocytes are strongly vacuolated, testifying to their increased functional activity (Fig. 3). The attention is attracted by very extended and blood-filled adrenal arteries. In reticular zone on the boundary with brain site of adrenal glands there are observed quite big adrenocorticoocytes and

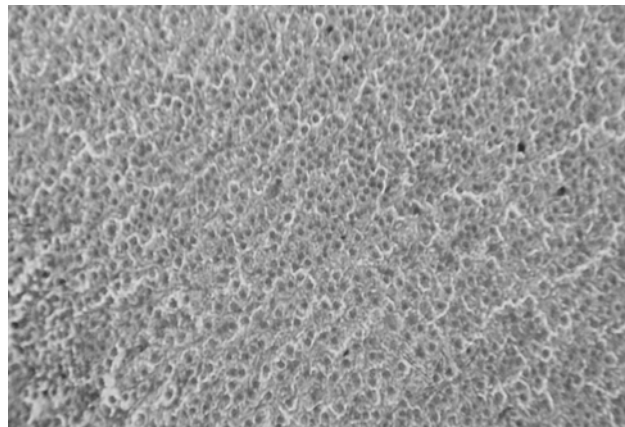


Рис. 2. Надпочечники крыс после введения КЭПл (II группа). Морфофункционально активные спонгиоциты паренхимы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 240$.

Fig. 2. Adrenal glands of rats after CPE injection (the 2nd group). Morphofunctionally active parenchyma spongiocytes. Staining with haematoxylin and eosin, $\times 240$.

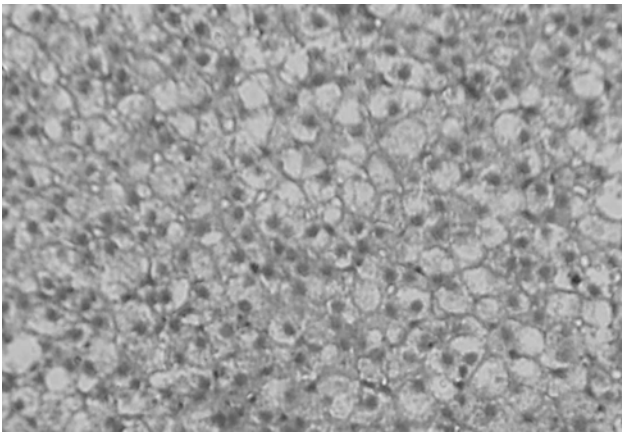


Рис. 3. Надпочечники кастрированных крыс после введения КЭПл (IV группа). Сильно вакуолизованная цитоплазма аденокортикоцитов пучковой зоны коры. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 480$.

Fig. 3. Adrenal glands of castrated rats after CPE injection (the 4th group). Strongly vacuolated cytoplasm of adrenocorticocytes of fascicular cortex zone. Staining with haematoxylin and eosin, $\times 480$.

и эозином преобладала эозинофилия (рис. 2). Синусоиды мозговой части надпочечников, обеспечивающие венозный дренаж коры, были сильно расширены и заполнены кровью.

При микроскопическом изучении надпочечников кастрированных крыс после введения КЭПл в корковой их части обнаруживаются параллельные тяжи крупных многоугольных эндокринных клеток пучковой зоны – спонгиоцитов. Между ними располагаются синусоидные кровеносные капилляры с расширенным просветом. В результате многочисленных липидных включений цитоплазма спонгиоцитов сильно вакуолизована, что свидетельствует об их повышенной функциональной активности (рис. 3). Обращают на себя внимание сильно расширенные и заполненные кровью надпочечниковые артерии. В сетчатой зоне на границе с мозговой частью надпочечников обнаруживаются аденокортикоциты сравнительно крупных размеров и ацидофильной цитоплазмой. Многие из клеток мозгового вещества надпочечника, занимающего центральное положение в железе, содержат мелкие гранулы.

При гистологическом исследовании яичников старых крыс I группы обнаруживалось отсутствие примордиальных фолликулов, фолликулов на разных стадиях нормального развития или атрезии, а также свежих желтых тел. Ткань яичников замещалась фиброзной тканью (рис. 4).

При гистологическом изучении яичников животных II и III групп после введения КЭПл и подсадки фрагмента плаценты было установлено, что в корковом веществе яичника непосредственно под белочной оболочкой выявляются единичные примордиальные фолликулы, определяются растущие (первичные и вторичные) фолликулы, а

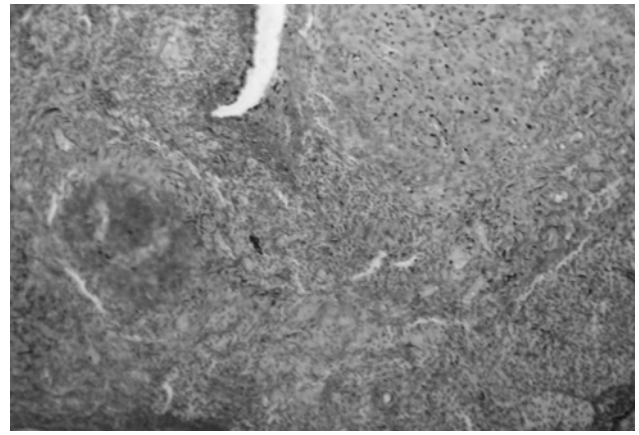


Рис. 4. Яичники старых интактных крыс (I группа). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 240$.

Fig. 4. Ovaries of aged intact rats (1st group). Staining with haematoxylin and eosin, $\times 240$.

with acidophilic cytoplasm. Many of the cells of adrenal gland brain substance taking a central position in a gland contain small granules.

During histological study of ovaries of aged rats of the 1st group there was found an absence of primordial follicles, the ones at various stages of either normal development or atresia as well as fresh yellow bodies. The tissue of ovaries was substituted with fibrous one (Fig. 4).

When histologically studying the ovaries of the animals of the 2nd and 3rd groups after CPE introduction and implantation of placenta fragment there has been established that in cortex substance of ovary directly under protein membrane single primordial follicles were found, growing (primary and secondary) follicles as well as atretic ones and fresh yellow bodies were observed (Fig. 5).

Bone tissue of the 1st group animals have the signs of dystrophy. Age alterations are manifested in the fact that from the side of bone-brain cavity in a bone hollows, cavities, lacunas are formed.

Compact part of tubular bone is thinned, the number of osteons reduces, osteon channels are narrowed. In metaphysial part of trabeculae of spongy bone are also strongly thinned (Fig. 6).

Hystological study of bone tissue of the 2nd group animals which were injected with CPE has shown a normal structure of bone compact part. No signs of age changes were found. In epiphysis area there is noticed the system of cross-pieces and beams, as the consequence of this morphological structure in epiphysis gains a spongy structure. From the side of periosteum into a bone dense substance under various angles perforating collagen fibres penetrate (Fig. 7.), branching in outer layer of general bone plates that testifies to the growth process in a bone [6]. Bone trabeculae of spongy bone entering into bone-brain cavity in the 2nd group animals were wider if compared with those for aged control animals.

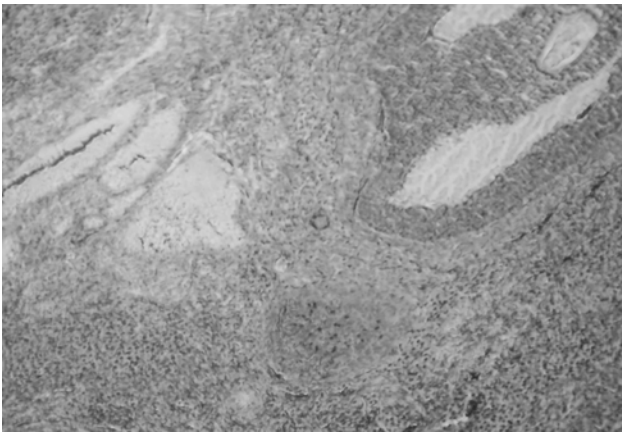


Рис. 5. Яичники крыс после введения КЭПл (II группа). Граафов пузырек, атретические фолликулы и свежие желтые тела. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 240$.

Fig. 5. Ovaries of rats after CPE injection (2nd group). Graafian vesicle, atretic follicles and fresh yellow bodies. Staining with haematoxylin and eosin, $\times 240$.

также атретические фолликулы и свежие желтые тела (рис. 5).

Костная ткань животных I группы имеет признаки дистрофии. Возрастные изменения выражаются в том, что со стороны костномозговой полости в кости образуются углубления, выемки, лакуны.

Компактная часть трубчатой кости истончается, становится меньше остеонов, каналы остеонов сужены. В метафизарной части трабекулы губчатой кости также сильно истончены (рис. 6).

Гистологическое исследование костной ткани животных II группы, которым вводился КЭПл, показало нормальное строение компактной части кости. Признаков возрастных изменений не обнаружено. В области эпифиза обнаруживается система перекладин и балок, вследствие чего морфологическая структура в эпифизе приобретает губчатое строение. Со стороны надкостницы в плотное вещество кости под разными углами проникают прободающие коллагеновые волокна (рис. 7), которые разветвляются в наружном слое общих костных пластинок, что свидетельствует о процессе роста в кости [6]. Костные трабекулы губчатой кости, вдающиеся в костномозговую полость, у животных II группы более широкие, чем у старых контрольных животных.

В костной ткани животных III группы по сравнению с контрольными старыми крысами-самками наблюдаются прогрессивные изменения, аналогичные тем, которые обнаруживались у животных II группы. Они выражаются в утолщении компактного вещества диафиза, что происходит вследствие увеличения количества остеонов, причем их каналы имеют больший диаметр. Углублений и выемок в компактной кости диафиза

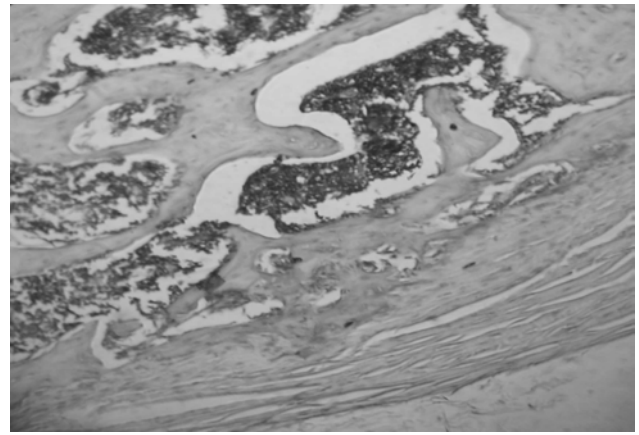


Рис. 6. Костная ткань старых интактных крыс (I группа). Дистрофические изменения компактной части трубчатой кости. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 240$.

Fig. 6. Bone tissue of aged intact rats (1st group). Dystrophic changes of tubular bone compact part. Staining with haematoxylin and eosin, $\times 240$.

In bone tissue of the 3rd group animals if compared with aged female rats there are observed progressive changes close to those found in the 2nd group animals. They are manifested in the thickening of compact substance of diaphysis due to a rise in the number of osteons, herewith their channels are of larger diameters. No hollows and cavities were found in compact bone of diaphysis from a side of bone-brain cavity.

Bone tissue of castrated animals after CPE injection (the 4th group) has normal structure inherent to the architecture of diaphysis compact substance for bones of young animals. This is expressed in a certain location order of bone plates. The number of osteons and their channel diameter is within the norm. From a side of bone-brain cavity in compact part of tubular bone inner

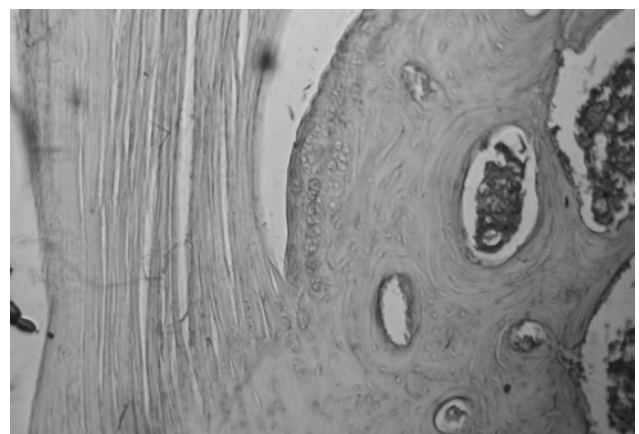


Рис. 7. Костная ткань крыс после введения КЭПл (II группа). Проникновение в плотное вещество кости прободающих коллагеновых волокон. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 240$.

Fig. 7. Bone tissue of rats after CPE injection (2nd group). Penetration into a bone dense substance of perforating collagen fibres. Staining with haematoxylin and eosin, $\times 240$.

со стороны костномозговой полости не обнаружено.

Костная ткань кастрированных животных после введения КЭПл (IV группа) имеет нормальное строение, присущее архитектонике компактного вещества диафиза костей молодых животных. Это выражается в определенном порядке расположения костных пластинок. Количество остеонов и диаметр их каналов – в норме. Со стороны костномозговой полости в компактной части трубчатой кости располагается внутренняя система общих костных пластинок, в слое которых не наблюдается выемок и лакун. Трабекулы губчатой кости, вдающиеся в костномозговую полость, не истончены и имеют гладкую поверхность (рис. 8). Местами отмечается базофильное окрашивание костной ткани.

Выводы

Таким образом, при введении КЭПл старым животным, как и при подсадке им фрагмента плаценты, наблюдается эффект “омоложения”, проявляющийся в улучшении морфофункционального состояния parenchymatous органов и, очевидно, обусловленный воздействием биологически активных веществ, гормонов и витаминов, содержащихся в плаценте, в первую очередь на эндокринную систему, осуществляющую в организме гуморальную регуляцию.

У кастрированных животных после введения им КЭПл отмечается выраженная компенсаторная морфофункциональная активность надпочечников. Этот эффект может быть в дальнейшем использован в клинической практике для предотвращения тяжелых последствий посткастрационного синдрома у женщин.

Литература

1. *Анисимов В.Н.* Средства профилактики преждевременного старения (геропротекторы) // Успехи геронтологии.– 2000.– Вып. 4.– С. 275-277.
2. *Меркулов Г.А.* Курс патологистологической техники. 4-е изд.– М.: Медгиз, 1961.– 340 с.
3. *Морозова Р.П., Козулина Е.П., Николенко И.А. и др.* Плацента – источник биологически активных веществ // Укр. біохім. журн.– 1999.– Т. 71, №4.– С. 21-29.
4. *Руководство по эндокринной гинекологии* / Под ред. Е.М. Вихляевой.– М., 2000.– 768 с.
5. *Спасокукоцкий Ю.А., Барченко Л.И.* Влияние биологически активных веществ на процессы старения. Биология старения / Под ред. В.В. Фролькиса.– Л.: Наука, 1982.– С. 586-600.
6. *Хэм А., Кормак Д.* Гистология: Пер. с англ. Т. 3.– Мир, 1983.– 293 с.
7. *Хэм А., Кормак Д.* Гистология: Пер. с англ. Т. 5.– Мир, 1983.– 294 с.
8. *Черемской А.К., Прокопюк О.С., Губина-Вакулик Г.И., Фалько О.В.* Адаптирующее влияние криоконсервиро-

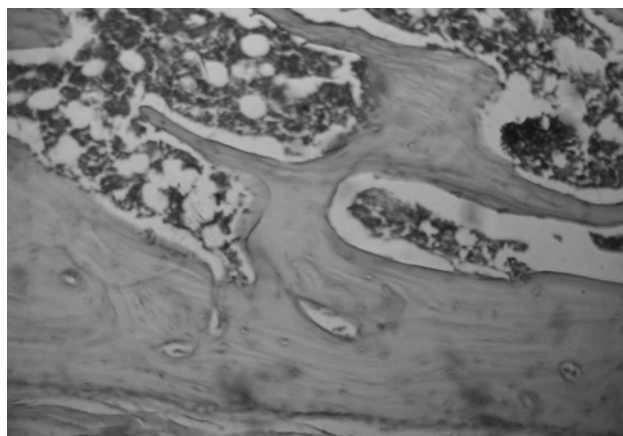


Рис. 8. Костная ткань кастрированных крыс после введения КЭПл (IV группа). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 240$.

Fig. 8. Bone tissue of castrated rats after CPE injection (4th group). Staining with haematoxylin and eosin, $\times 240$.

system of general bone plates is located, in the layer of which no hollows and lacunas are found. Tubular bone trabeculae entering into bone-brain cavity are not thinned and their surface is smooth (Fig. 8.). Somewhere basophilic staining of bone tissue is noted.

Conclusions

Thus when introducing CPE to aged animals as well as during implantation to them of placenta fragment there is observed an effect of “rejuvenation”, manifesting as an improvement of morphofunctional state of parenchymatous organs and is likely stipulated by the influence of biologically active substances, hormones and vitamins containing in placenta, firstly on endocrine system performing humoral regulation in an organism.

In castrated animals after the introduction of CPE to them there is found a manifested compensatory morphofunctional activity of adrenal glands. This effect may be further used in clinical practice for preventing severe consequences of post-castration syndrome in women.

References

1. *Anisimov V.N.* Preventive means of premature ageing (geropro-TECTANTS) // Uspekhi gerontologii.– 2000.– Issue 4.– P. 275-277.
2. *Merkulov G.A.* Course of pathologohistological technique. The 4th edition.– Moscow: Medgiz.– 1961.– 340 p.
3. *Morozova R.P., Kozulina E.P., Nikolenko I.A. et al.* Placenta is the source of biologically active substances // Ukr. Biokhim. Zhurn.– 1999.– V. 71, N4.– P. 21-29.
4. *Manual on endocrine gynaecology* / Ed. by E.M. Vikhlyeva.– Moscow, 2000.– 768 p.
5. *Spasokukotsky Yu.A., Barchenko L.I.* Effect of biologically active substances on ageing processes. Biology of ageing / Ed. by V.V. Frolkis.– Leningrad: Nauka, 1982.– P. 586-600.
6. *Ham A., Kormak D.* Histology: Translated from English. Vol. 3.– Mir, 1983.– 293 p.

ванного экстракта плаценты на морфофункциональные показатели организма при остром общем охлаждении // Світ медицини та біології.– 2005.– №1.– С. 34-35.

Поступила 30.06.2006

7. *Ham A., Kormak D.* Histology: Translated from English. Vol. 5.– Mir, 1983.– 294 p.
8. *Cheremskoy A.K., Prokopyuk O.S., Gubina-Vakulik G.I., Falko O.V.* Adapting effect of cryopreserved placenta extract on morphofunctional indices of an organism at acute general cooling // Svit meditsyny ta biologii. – 2005. – N1. – P. 34-35.

Accepted in 30.06.2006