

## Влияние длительности хранения ткани плаценты при 4°C на ультраструктуру ворсинчатого хориона

Н.В. РЕПИН, О.М. ЦУПИКОВ, Т.П. ГОВОРУХА, Т.Н. ЮРЧЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Effect of Placenta Tissue Storage Term Under 4°C on Chorion Villi Ultrastructure

REPIN N.V., TSUPIKOV O.M., GOVORUKHA T.P., YURCHENKO T.N.

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

Изучено влияние длительности хранения ткани плаценты при 4°C на ультраструктуру ворсинчатого хориона. Отмечено, что после 2-х суток гипотермического хранения ткани плаценты происходят ультраструктурные изменения хориальных ворсин, которые носят деструктивный характер.

Вивчено вплив тривалості зберігання тканини плаценти при 4°C на ультраструктуру ворсинчатого хоріону. Відзначено, що після 2-х діб гіпотермічного зберігання тканини плаценти відбуваються ультраструктурні зміни хоріальних ворсин, які мають деструктивний характер.

The effect of storage duration of placenta tissue under 4°C on the chorion villi ultrastructure has been studied. It has been noted, that after 2 days of hypothermic storage of placenta tissue the ultrastructural changes in chorion villi, being of destructive character, occur.

Одной из важнейших функционально активных структур плаценты является ворсинчатый хорион. Как наиболее чувствительное и динамичное образование он претерпевает ряд структурных изменений при различных патологических состояниях плаценты [1-4]. В литературе отсутствуют данные о влиянии экстремальных факторов на ткань плаценты *in vitro*.

Цель работы – изучение влияния длительности хранения ткани плаценты при 4°C на ультраструктуру ворсинчатого хориона. Объектом исследования служили фрагменты плацент, полученных после операции кесарево сечение у здоровых женщин с нормально протекающей беременностью. Материал для исследований брали в первые минуты после извлечения последа. Для гипотермического хранения (1 и 2 сут) кусочки ткани объемом 0,4 см<sup>3</sup> помещали во влажную камеру (закрытая чашка Петри объемом 15 см<sup>3</sup>) при температуре 4°C. Для электронно-микроскопического исследования кусочки плаценты фиксировали в 2%-м растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH 7,3-7,4) в течение 2 ч. Затем материал отмывали фосфатным буфером и постфиксировали в 1%-м растворе четырехоксида осмия в течение 1 ч. После обезвоживания спиртами возрастающей концентрации кусочки ткани пропитывали смесью эпон-аралдита. Ультратонкие срезы для электронной микроскопии контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу [7]. Ультраструктуру ворсинчатого хориона исследовали с помощью электронного

Chorion villi are one of the most important functional and active placenta structures. As the most sensitive and dynamic formations it undergoes the series of structural changes at different pathological states of placenta [1-4]. In the literature there are no data on the effect of extreme factors on placenta tissue *in vivo*.

The aim of this work was to study the effect of long-term storage of placenta tissue under 4°C on the chorion villi ultrastructure. Placenta fragments, procured after cesarean section in healthy women with normal pregnancy course, were the subject for the investigation. The material for investigations was taken during the first minutes after the afterbirth extraction. For hypothermic storage (1 and 2 days) the pieces of tissue of 0.4 cm<sup>3</sup> were placed into a humid chamber (closed Petri dish of 15 cm<sup>3</sup> volume) under the temperature of 4°C. For electron-microscopic investigation the placenta pieces were fixed in 2% glutar aldehyde solution on phosphate buffer (pH 7.3-7.4) during 2 hours. Afterwards material was washed out by means of phosphate buffer and post-fixed in 1% solution of osmium tetroxide during 1 hour. After dehydration using alcohols of ascending concentration the pieces of the tissue were saturated with epon-araldite mixture. The ultrathin sections for electron microscopy were contrasted using the uranyl acetate saturated aqueous solution and lead citrate according to Reynolds [7]. Chorion villi ultrastructure was investigated using electron microscope PEM-125K under accelerating voltage of 75 kV.

During the electron-microscopic study of mature placenta chorion villi at the initial state on the syncytiotrophoblast surface, orientated to mother's

микроскопа ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кВ.

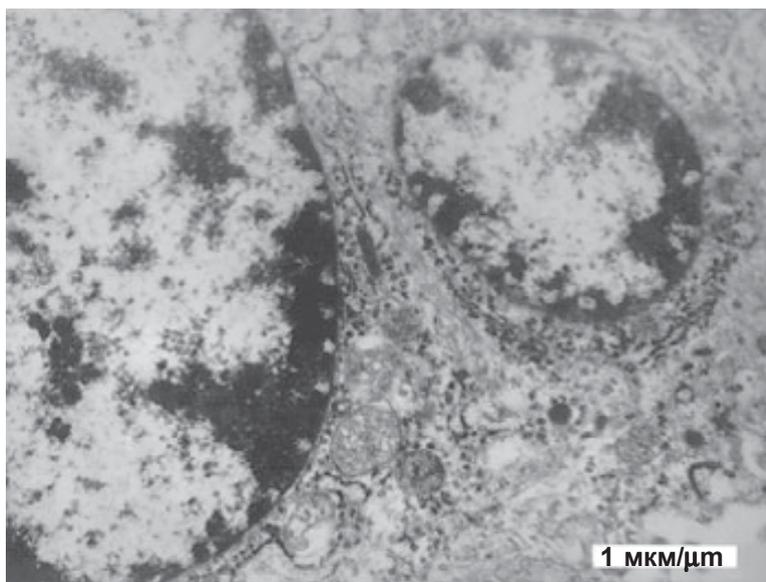
При электронно-микроскопическом исследовании ворсин хориона зрелой плаценты в исходном состоянии на поверхности синцитиотрофобласта, обращенной к материнскому кровотоку, наблюдаются многочисленные микроворсинки в виде нитевидных отростков средней электронной плотности. Некоторые из них обладают терминальными расширениями. В структуре синцития по характеру распределения ядер выделяются безъядерные зоны, участки с монослойным их распределением и полинуклеарные зоны с характерным скоплением плотно прилегающих друг к другу ядер полигональной формы. В безъядерных зонах часто можно видеть расширенные капилляры стромы. Ядра синцитиотрофобласта имеют четкие контуры мембран с узким перинуклеарным пространством равномерной ширины. Диффузный хроматин рассеян по всей нуклеоплазме, его глыбчатые скопления наблюдаются вдоль внутренней ядерной мембраны, а также небольшими островками распределены по всему объему ядра (рис. 1). В ядрах синцитиотрофобластических почек преобладает гетерохроматин. Митохондрии характеризуются разнообразием формы, размеров и внутренней структуры. В основном они имеют овальную или округлую форму. Матрикс их низкой или умеренной электронной плотности содержит единичные четкие кристы. Эндоплазматическая сеть (ЭПС) синцития гетерогенна по форме, размерам и плотности распределения ее элементов в различных участках. Зернистая ЭПС представлена узкими или резко расширенными цистернами, на которых равномерно располагаются многочисленные рибосомы. Незернистая ЭПС имеет вид гладкоконтурных пузырьков.

Вдоль апикальной поверхности синцития обнаруживается большое количество различных по величине пиноцитозных пузырьков и вакуоли с хлопьевидным содержимым, размер которых увеличивается по мере приближения к глубоким слоям. В синцитии наблюдается небольшое количество хаотически распределенных мелких липидных включений и лизосом, ограниченных одноконтурной мембраной.

Единичные клетки цитотрофобласта располагаются между синцитием и базальной мембраной. Они имеют более низкую электронную плотность ядра и цитоплазмы. Ядра их значительно крупнее синцитиальных и

blood flow, the numerous microvilli in the form of filamentous outgrowths of the medium electron density are observed. Some of them have terminal enlargements. Nucleus-free zones, sites with their monolayer distribution and polynuclear zones with characteristic accumulation of tightly fitted to each other nuclei of polygonal form are found in the syncytium structure by the nuclei distribution character. In the nucleus-free zones we can often see the extended stroma capillaries. The syncytiotrophoblast nuclei have the distinct membrane contours with narrow perinuclear space of the uniform width. Diffusive chromatin is dispersed all over the nucleoplasm, its compact accumulations are observed along the internal nuclear membrane as well as are distributed as small islets all over the nuclear volume (Fig. 1). Heterochromatin is predominant in the nuclei of syncytiotrophoblast knots. Mitochondria are characterised by the diversity of form, size and internal structure. They are mostly of an oval or roundish shape. The matrix of their low or moderate electron density has single distinct crystals. Endoplasmic reticulum (EPR) of syncytium is heterogeneous by form, sizes and density of distribution of its elements in different sites. Granular EPR is represented by narrow or sharply extended cisterns where the numerous ribosomes are uniformly placed. Non-granular EPR looks like the smoothly contoured vesicles.

Along the syncytium apical surface there is revealed a big number of different by size pinocytosis vesicles and vacuoles with floccular content, which size increases when approaching to deep layers. A few number of chaotically distributed small lipid inclusions and lysosomes, limited by monocontour membrane, is observed in syncytium.



**Рис. 1.** Ультраструктура ядер синцитиального слоя плаценты в исходном состоянии.

**Fig. 1.** Ultrastructure of nuclei of syncytial placenta layer in an initial state.

имеют округлую форму. Перинуклеарное пространство на всем протяжении узкое, равномерной ширины. Конденсированный хроматин в виде узкой, почти непрерывной ленты распределяется вдоль внутренней ядерной мембраны и в виде небольших сгущений ядерного материала в средней части ядра. В цитоплазме обнаруживаются немногочисленные митохондрии со светлым матриксом и четкими кристами. В непосредственной близости от митохондрий располагаются расширенные цистерны зернистой ЭПС.

Подэпителиальная базальная мембрана, как правило, неравномерной толщины, хорошо выражена в виде полосы гомогенного вещества умеренной электронной плотности. Иногда в ней определяется тонковолокнистая структура.

Поверхность эндотелия, обращенная в просвет капилляра, неровная с большим числом выпячиваний цитоплазмы. Цитоплазма эндотелиоцитов содержит хорошо выраженные фибриллы цитоскелета, множество мелких пиноцитозных пузырьков и многочисленные рибосомы, которые располагаются обособленно, в виде полисом и на мембранах зернистой ЭПС. Вокруг капилляров выявляется собственная базальная мембрана, которая в некоторых участках истончена.

У апикальной и базальной поверхностей эндотелия обнаруживается большое количество пиноцитозных пузырьков.

В области плацентарного барьера базальные мембраны разделены тонким слоем соединительно-тканной стромы, содержащей небольшое количество коллагеновых волокон. Клеточные элементы стромы в этих участках встречаются редко.

Таким образом, результаты исследования показали, что в ткани плаценты, полученной от здоровых женщин при нормально протекающей беременности, наблюдаются структурные изменения, соответствующие физиологической норме зрелой плаценты [2, 6].

При электронно-микроскопическом исследовании ткани плацент после суток гипотермического хранения ультраструктура ворсинчатого хориона существенно не отличается от исходного состояния (рис. 2). Поверхность синцитиотрофобласта также представлена многочисленными микроворсинками различной длины и электронной плотности. В то же время встречаются участки с единичными ворсинками, которые имеют вид разрыхленных структур. Как и в исходном состоянии, характер распределения ядер гетерогенен. Обращает на себя внимание

Single cells of cytotrophoblast are located between syncytium and basal membrane. They have a low electron density of nucleus and cytoplasm. Their nuclei are considerably bigger than the syncytial ones and have a roundish shape. Perinuclear space along the whole length is narrow, of uniform width. Condensed chromatin in the form of narrow, quite continuous band is distributed along the internal nuclear membrane and in the form of slight condensations of nuclear material is presented in the middle part of the nucleus. Few mitochondria with a light matrix and distinct crystals are revealed in cytoplasm. The extended cisterns of granular EPR are placed in immediate proximity to mitochondria.

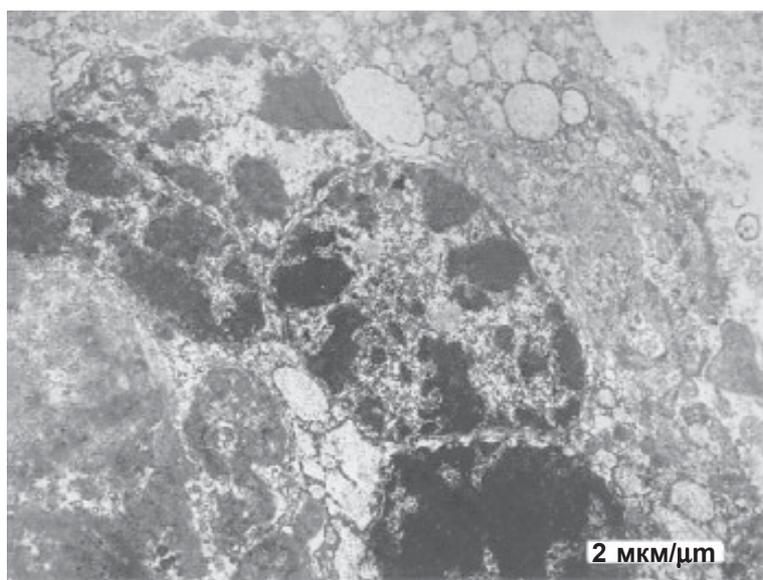
Subepithelial basal membrane, as a rule, of a uniform thickness is well manifested in the form of the band of homogeneous substance of moderate electron density. Sometimes a fine-fibrous structure is found in it.

The endothelium surface, directed to the capillary lumen, is uneven with a big number of cytoplasm protrusions. The cytoplasm of endotheliocytes contains well-manifested cytoskeletal fibrils, numerous small pinocytosis vesicles and ribosomes, placed apart, in the form of polysomes and on the membranes of granular EPR. Own basal membrane, somewhere getting thinner is found out around the capillaries.

A large number of pinocytosis vesicles is revealed near the apical and basal surfaces of endothelium.

In the area of placental barrier the basal membranes are divided by a thin layer of connective stroma, containing a few number of collagenic fibrils. The stroma cellular elements are rarely found in these sites.

Thus, the results of the investigations have demonstrated, that in placenta tissue, obtained from



**Рис. 2.** Ультраструктура ядер синцитиального слоя плаценты после суток гипотермического хранения ткани.

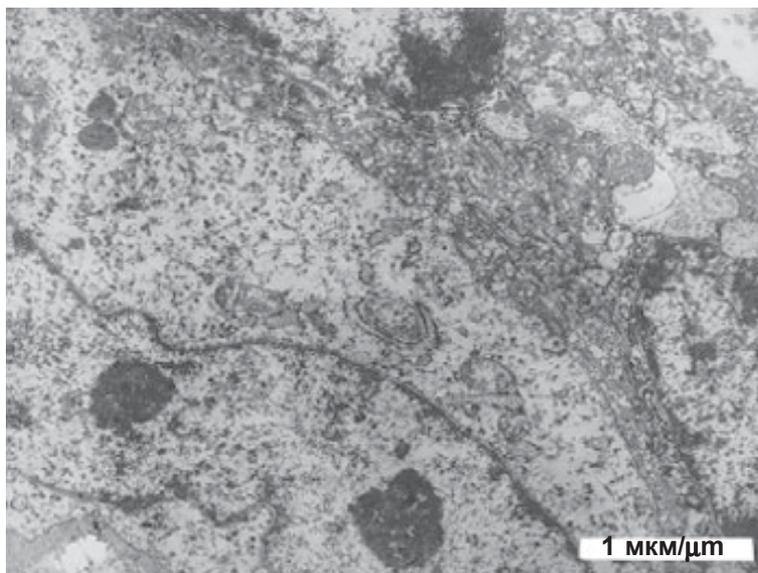
**Fig. 2.** Ultrastructure of nuclei of syncytial placenta layer after one day of tissue hypothermic storage.

появление ядер с большим количеством глыбчатого гетерохроматина (рис. 2) и содержащих участки расширенного перинуклеарного пространства. Цитоплазма синцитиотрофобласта характеризуется наличием умеренно расширенных канальцев ЭПС и митохондрий. В некоторых участках появляются неравномерно расширенные канальцы в виде крупных цистерн и набухшие митохондрии с просветленным матриксом.

Направленность изменений ультраструктуры цитотрофобласта во многом идентична синцитиотрофобласту. Клетки имеют немногочисленные канальцы ЭПС и просветленные митохондрии с четкими кристами (рис. 3). Подэпителиальная базальная мембрана существенно не изменяется. Однако, по сравнению с исходным состоянием, в ней чаще встречаются фрагменты с разрыхленной структурой.

Как и в исходном состоянии в структуре капилляров наблюдаются участки истончения базальной мембраны. Эндотелиальные клетки в основном сохраняют свои ультраструктурные особенности. Они имеют много выпячиваний в просвет капилляра. Их ядра небольшие, слегка вытянуты вдоль базальной мембраны. В апикальной части цитоплазмы обнаруживаются немногочисленные митохондрии с плотным матриксом и короткими кристами.

Анализ проведенных электронно-микроскопических исследований показывает, что в плаценте после 2-х суток гипотермического хранения ткани происходят ультраструктурные изменения хориальных ворсин, которые носят деструктивный характер. Для данного срока характерно наличие участков с набухшими микроворсинками, которые имеют неравномерно просветленный матрикс, и участки, лишенные синцитиальных выростов (рис. 4). В цитоплазме синцитиотрофобласта происходит комплекс изменений, проявляющихся в виде множественных очагов набухания и деструкции цитоплазматических органелл. Ядра синцития нередко имеют неровные контуры и расширенное перинуклеарное пространство. Увеличивается доля гетерохроматина, который становится более грубым и уплотненным. Митохондрии имеют просветленный матрикс и частично разрушенные кристы. В расширенных канальцах ЭПС часто наблюдаются скопления хлопьевидного материала. Цистерны внутреннего сетчатого аппарата увеличены, с деструкцией мембранных структур.



**Рис. 3.** Ультраструктура цитотрофобласта плаценты после суток гипотермического хранения ткани.

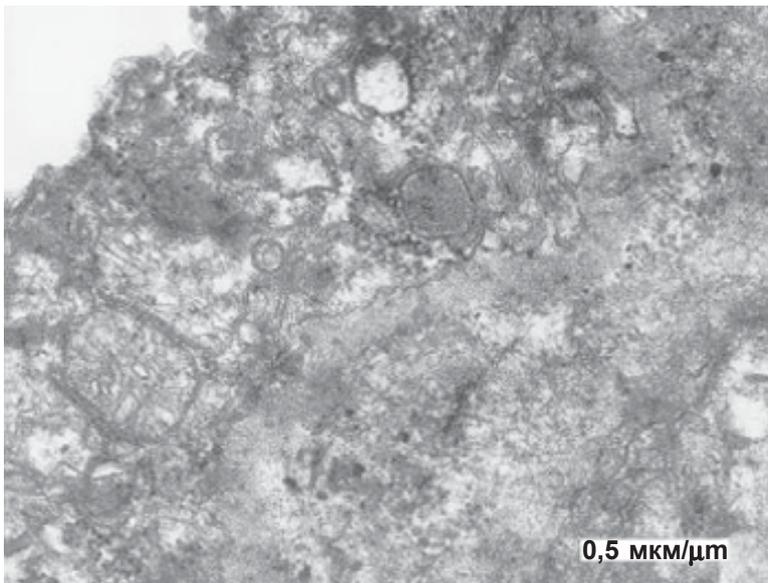
**Fig. 3.** Ultrastructure of placenta cytotrophoblast after one day of tissue hypothermic storage.

healthy women with normal pregnancy course, the structural changes, corresponded to physiological norm of mature placenta are observed [2, 6].

Under the electron-microscopic investigation of placenta tissue after one day of hypothermic storage the ultrastructure of chorion villi does not considerably differ from the initial state. The syncytiotrophoblast surface is also presented by numerous microvilli of different length and electron density. At the same time the sites with single villi in the form of porous structures are found. This character of nuclei distribution is heterogeneous in initial state as well. The appearance of nuclei with large number of compact chromatin (Fig. 2) and containing the sites of extended perinuclear space attracts the attention. The syncytiotrophoblast cytoplasm is characterised by the presence of moderately EPR small channels and mitochondria. In certain sites the ununiformly extended small channels in the form of large cisterns and the swollen mitochondria with a lightened matrix appear.

The orientation of changes in the cytotrophoblast ultrastructure is identical for the syncytiotrophoblast. Cells have a few number of EPR small channels and the lightened mitochondria with distinct crystals (Fig. 3). Subepithelial basal membrane does not considerably change. However in comparison with the initial state the fragments with a porous structure is found more often in it.

As at the initial state in the structure of capillaries there are observed the sites of basal membrane getting thinner. Generally the endothelial cells keep their ultrastructural peculiarities. They have a lot of protrusions into the capillary lumen. Their nuclei are small, slightly elongated along the basal membrane. In an apical part of cytoplasm there are revealed not



**Рис. 4.** Ультраструктура ядер синцития после суток гипотермического хранения ткани.

**Fig. 4.** Ultrastructure of nuclei of syncytial placenta layer after one day of tissue hypothermic storage.

Единичные клетки цитотрофобласта бедны органеллами: встречаются набухшие, просветленные митохондрии с разрушенными кристами и немногочисленные расширенные цистерны зернистой эндоплазматической сети, мембраны которых теряют часть рибосом.

В некоторых участках наблюдается отслоение базальной мембраны эпителия. Иногда в ней определяются участки с разволокненной структурой, содержащие вакуоли и гранулы (рис. 5).

В строме ворсин часто выявляется большое количество разрыхленных коллагеновых волокон, среди которых расположены клетки соединительно-тканной природы. Ультраструктурными показателями реакции этих клеток на охлаждение являются изменение соотношения конденсированных и диффузных участков хроматина ядер и набухание цитоплазматических структур. Однако эти изменения менее выражены в сравнении с эпителием ворсин.

Обнаруживаются выраженные деструктивные изменения и со стороны эндотелия капилляров – разрывы контактов между эндотелиальными клетками и размытие базальной мембраны. Цитоплазма эндотелия истончается. Пиноцитозная активность эндотелиальных клеток значительно ниже в сравнении с контролем. В результате повышения сосудистой проницаемости, в окружающие стромальные участки активно идет экссудация

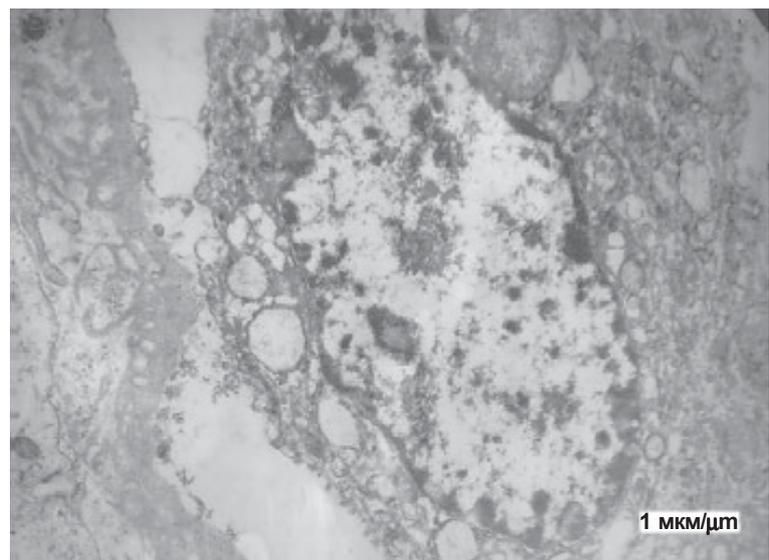
numerous mitochondria with a dense matrix and short crystals.

The analysis of the performed electron-microscopic investigations demonstrates, that in placenta after 2 days of tissue hypothermic storage the ultrastructural changes of chorion villi with destructive character occur. The presence of sites with swollen microvilli with an ununiformly lightened matrix and those without syncytial growths is characteristic for this term (Fig. 4). The complex of changes, manifesting as the multiple swelling and destruction points of cytoplasmic organelles, occurs in syncytiotrophoblast cytoplasm. Syncytium nuclei have quite often the irregular contours and extended perinuclear space. There is an increase in the part of heterochromatin, which getting more rough and dense. Mitochondria have a lightened matrix and partially destroyed crystals. The accumulations of flaky material are often observed in the extended small channels of endoplasmic reticulum. The cisterns of internal reticular apparatus are increased with the membrane structure destruction.

Single cells of syncytiotrophoblast are poor of organelles: there are met swollen, lightened mitochondria with destroyed crystals and not numerous extended cisterns of granular endoplasmic reticulum, which membranes loose a part of ribosomes.

The flaking of the epithelium basal membrane is noted in some sites. Sometimes we detect in it the sites with diffusive structure with vacuoles and granules (Fig. 5).

A big number of porous collagenic fibres, among



**Рис. 5.** Десквамация эпителия ворсинчатого хориона после 2-х суток гипотермического хранения плаценты.

**Fig. 5.** Fig.5. Desquamation of chorion villi epithelium after 2 days of placenta hypothermic storage.

плазмы с образованием гиалиноподобных масс.

Таким образом, после суток гипотермического (4°C) хранения плаценты наблюдаются незначительные изменения в ультраструктуре ворсинчатого хориона. Они свидетельствуют о способности к адаптационным перестройкам исследуемой системы в меняющихся условиях внешней среды. Предполагается [5], что в тканях в процессе их адаптации к неблагоприятным воздействиям происходят биохимические процессы, в результате которых могут образовываться вещества с выраженной биологической активностью, повышающие устойчивость системы к экстремальным условиям.

После 2-х суток гипотермического (4°C) хранения фрагментов плаценты наблюдаются выраженные деструктивные изменения ворсинчатого хориона. Они проявляются в виде увеличения доли гетерохроматина, деструкции мембран эндоплазматической сети, митохондрий и внутреннего сетчатого аппарата. Данные изменения ультраструктуры можно рассматривать как разобщение мембранных связей и нарушение способности клеток поддерживать неравновесное распределение веществ между клетками и окружающей средой.

### Литература

1. Аршавский И.А. Плацентарный барьер и антенатальное развитие // Успехи физиологических наук.— 1978.— № 4.— С. 45-66.
2. Брусилловский А.И. Плацентарный барьер человека в конце нормальной и при патологической беременности // Бюл. эксперим. биол. и мед.— 1970.— № 7.— С. 110-113.
3. Давиденко О.А., Голего Н.Г. Морфологические особенности плаценты и сердечно-сосудистой системы новорожденных при хронической гипоксии // Педіатрія, акушерство і гінекологія.— 1989.— № 2.— С. 13-15.
4. Калашникова Е.П. Морфогенез и особенности морфологии плаценты при хронической недостаточности // Плацентарная недостаточность. Патогенез, клиника, диагностика и терапия.— М., 1984.— С. 8-11.
5. Логай И.М., Сотникова Е.П. Тканевые препараты по В.П. Филатову в геронтологии и гериатрии // Матеріали 2-ї науково-практичної конф. з міжнародною участю.— Київ, 2001.— С. 11-14.
6. Kaufmann P. Development and differentiation of the human placental villous tree // Structural and functional organization of the Placenta. Intern. Symposium / Ed. P. Kaufmann.— Hamburg, 1981.— P. 29-39.
7. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH in electron microscopy // J. Cell Biology.— 1963.— V.17.— P. 208-213.

Поступила 16.04.2002

which there are the cells of connective origin, is often revealed in stroma of villi. The change in ratio of condensed diffusive sites of nuclei chromatin and swelling of cytoplasmic structures are the ultrastructural indices of these cells response to cooling. However these changes are less manifested in comparison with villi's epithelium.

Manifested destructive changes from the capillary endothelium are revealed: breaks of contacts between endothelial cells and the smearing of basal membrane. Endothelial cytoplasm gets thinner. Pinocytosis activity of endothelial cells is considerably lower in comparison with the control. As a result of an increase in vascular permeability the plasm exudation with hyalin-like mass formation actively occurs into the surrounding stromal sites.

Thus, after one day of placenta hypothermic storage (4°C) the slight changes in chorion villi ultrastructure were observed. They testify to the capability to the adaptational rearrangements of the investigated system under changing environmental conditions. One supposes [5], that in tissues during the process of their adaptation to unfavourable effects the biochemical processes, resulting in the formation of the substances with manifested biological activity, increasing the system resistance to extreme conditions, occur.

After 2 days of placenta fragment hypothermic (4°C) storage the manifested destructive changes in chorion villi are noted. They are manifested as an increase in heterochromatin part, membrane destruction of endoplasmic reticulum, mitochondria and internal reticular apparatus. These changes in ultrastructure can be considered as the dissociation of membrane bonds and the disorder of cell capability to maintain a non-equilibrium substances distribution between cells and environment.

### References

1. Arshavsky I.A. Placental barrier and antenatal development // Uspekhi fiziologicheskikh nauk.— 1978.— N4.— P. 45-66.
2. Brusilovskiy A.I. Human placental barrier at the end of normal and at pathological pregnancy // Bull. eksperim. biol. i med.— 1970.— N7.— P. 110-113.
3. Davidenko O.A., Golego N.G. Morphological peculiarities of placenta and cardiovascular system of neonates at chronic hypoxia // Peditriya, akusherstvo i ginekologiya.— 1989.— N2.— P. 13-15.
4. Kalashnikova E.P. Morphogenesis and peculiarities of placenta morphology at chronic insufficiency // Placental insufficiency. Pathogenesis, clinical picture, diagnostics and therapy.— Moscow, 1984.— P. 8-11.
5. Logaj I.M., Sotnikova E.P. Tissue preparations according to V.P. Filatov in gerontology and geriatrics // Materials for 2<sup>nd</sup> scientific conference with international participation.— Kyiv, 2001.— P. 11-14.
6. Kaufmann P. Development and differentiation of the human placental villous tree // Structural and functional organization of the Placenta. Intern. Symposium / Ed. P. Kaufmann.— Hamburg, 1981.— P. 29-39.
7. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH in electron microscopy // J. Cell Biology.— 1963.— V.17.— P.208-213.

Accepted in 16.04.2002